

---

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**“Una primera aproximación en la búsqueda de extractos procedentes de invertebrados marinos con potencial actividad antiproliferativa en dos modelos de cáncer de mama”**

**TRABAJO DE FIN DE GRADO**

**Realizado por:**

César Alonso Garrido

**Dirigido por:**

Vicente Micol Molina

Enrique Barraión Catalán

Verónica Ruiz Torres

**Junio 2017**

## Resumen

El cáncer de mama es uno de los tipos de cáncer más comunes a nivel mundial. El empleo de productos bioactivos naturales o sintéticos derivados de los anteriores para prevenir o suprimir la progresión de cánceres invasivos es una herramienta con gran potencial para reducir los efectos nocivos de la quimioterapia convencional. Una fuente relativamente poco explorada de agentes bioactivos naturales está representada por el medio marino.

El presente trabajo de investigación se ha centrado en cribar la capacidad antiproliferativa de extractos procedentes de organismos invertebrados marinos en dos modelos de cáncer de mama (MCF7 y JIMT-1), con el fin de seleccionar los extractos más activos y realizar una primera aproximación acerca de su modo de acción.

Los resultados muestran que los extractos de *Colochirus robustus* (holoturia) y *Hexabranchnus sanguineus* (nudibranquio), son inhibidores potenciales de la proliferación celular en los modelos de cáncer ensayados. Las primeras aproximaciones indican que las causas de la actividad antiproliferativa de estos extractos se basan en mecanismos de acción diferenciados.

## Palabras clave

- Cáncer de mama
- Antiproliferativo
- Bioactivo
- Extractos marinos
- *Hexabranchnus sanguineus*
- *Colochirus robustus*

## Abstract

Breast cancer is one of the most common types of cancer in the world. The use of natural bioactive products or synthetic derivatives to prevent or suppress invasive cancer progression is a great potential tool to reduce adverse effects of conventional chemotherapy. Marine environment represents a relatively few explored source of natural bioactive agents.

This research has focused on the screening of the antiproliferative capacity of marine invertebrate organisms extracts in two breast cancer models (MCF7 y JIMT-1), in order to select the most active extracts and carry out a first approach regarding their action mechanism.

Results have postulated *Colochirus robustus* (holothuria) and *Hexabranhus sanguineus* (nudibranch) extracts as potential proliferative inhibitors in the breast cancer assayed models. According to the first inquiries, the antiproliferative activity of these extracts is based on different action mechanisms.

## Keywords

- Breast cancer
- Antiproliferative
- Bioactive
- Marine extracts
- *Hexabranhus sanguineus*
- *Colochirus robustus*

# Índice

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Introducción</b>  | <b>5</b>  |
| 1.1 El cáncer   | 5         |
| 1.2 Ciclo celular y cáncer  | 7         |
| 1.3 El cáncer de mama   | 9         |
| 1.4 Mecanismos de muerte celular  | 10        |
| 1.5 Compuestos bioactivos naturales en organismos marinos   | 12        |
| <b>2. Marco de investigación y objetivos</b>  | <b>13</b> |
| <b>3. Procedimiento experimental</b>  | <b>14</b> |
| 3.1 Reactivos   | 14        |
| 3.2 Organismos invertebrados marinos y criterios de selección   | 14        |
| 3.3 Preparación de extractos  | 15        |
| 3.4 Cultivo celular   | 15        |
| 3.5 Ajuste de densidad de siembra   | 16        |
| 3.6 Ensayo de viabilidad celular por MTT  | 16        |
| 3.7 Análisis del ciclo celular  | 18        |
| 3.8 Análisis del tipo de muerte celular mediante Anexina-V  | 19        |
| 3.9 Determinación de la integridad de la membrana plasmática  | 20        |
| 3.10 Análisis estadístico de los datos  | 21        |
| <b>4. Resultados</b>  | <b>22</b> |
| 4.1 Selección de organismos y rendimiento de extractos  | 22        |
| 4.2 Ensayo de ajuste de densidad de siembra   | 22        |
| 4.3 Estudio de la capacidad antiproliferativa de los extractos  | 24        |
| 4.4 Estudio del mecanismo antiproliferativo de los extractos de <i>H. sanguineus</i> y <i>C. robustus</i> | 30        |
| 4.4.1 Análisis del ciclo celular  | 30        |
| 4.4.2 Análisis del tipo de muerte celular mediante Anexina-V. ¿Apoptosis?                                 | 31        |
| 4.4.3 Determinación de la integridad de la membrana plasmática. ¿Necrosis?                                | 32        |
| <b>5. Discusión</b>   | <b>34</b> |
| <b>6. Conclusiones y proyección futura</b>  | <b>37</b> |
| <b>7. Referencias</b>   | <b>38</b> |

# 1. Introducción

## 1.1 El cáncer

El cáncer es a día de hoy uno de los principales problemas de salud a nivel global, y una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo. Según la última publicación oficial de la **Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer**, en el año 2012 fue responsable de 8,2 millones de fallecimientos, diagnosticándose 14,1 millones de nuevos casos <sup>[1]</sup>. El envejecimiento de la población mundial y el incremento en la prevalencia de factores de riesgo como el sobrepeso o la inactividad física, motivados por la urbanización y el desarrollo económico actuales, son factores que impulsan y explican el actual incremento en la incidencia de cáncer.

El cáncer se origina cuando una o varias células sanas del organismo acumulan una serie de mutaciones genéticas que las hacen crecer de manera descontrolada, independientemente de toda señal externa del organismo. De esta manera se generan cúmulos de células llamadas tumorales que pueden llegar a ser capaces de promover la formación de vasos sanguíneos mediante los cuales son capaces de nutrirse y así seguir con su crecimiento desmesurado, lo que se conoce como **angiogénesis** <sup>[2]</sup>. En ocasiones estas células pasan a la circulación sanguínea o al sistema linfático donde son capaces de diseminarse por el cuerpo generando **metástasis** <sup>[3]</sup>.

La mayoría de los procesos tumorales son generados a partir de modificaciones genéticas en células somáticas, tales como sustituciones puntuales, inserciones, deleciones, duplicaciones, translocaciones o inversiones cromosómicas <sup>[4]</sup>. Sin embargo, ciertos cánceres infantiles se originan a partir de alteraciones genéticas o epigenéticas durante el desarrollo embrionario. También existen cánceres hereditarios cuyo origen se sitúa en células germinales.

Los tumores que se componen de cúmulos de células fenotípicamente diferentes entre sí se denominan **tumores policlonales**. Existen dos modelos teóricos que explican el comportamiento proliferativo de los tumores policlonales <sup>[5]</sup> (Fig.1):

- **Modelo estocástico.** Según este modelo, todas las subpoblaciones tumorales son capaces de desarrollar la progresión tumoral. Es la combinación de todas ellas la que genera la idiosincrasia del crecimiento tumoral.
- **Modelo jerárquico.** Según este modelo, solo un subgrupo de células del tumor, compuesto por las llamadas células madre tumorales o CSC (del inglés Cancer Stem Cells), es responsable de la progresión tumoral, encargándose de generar y renovar todas las subpoblaciones tumorales.

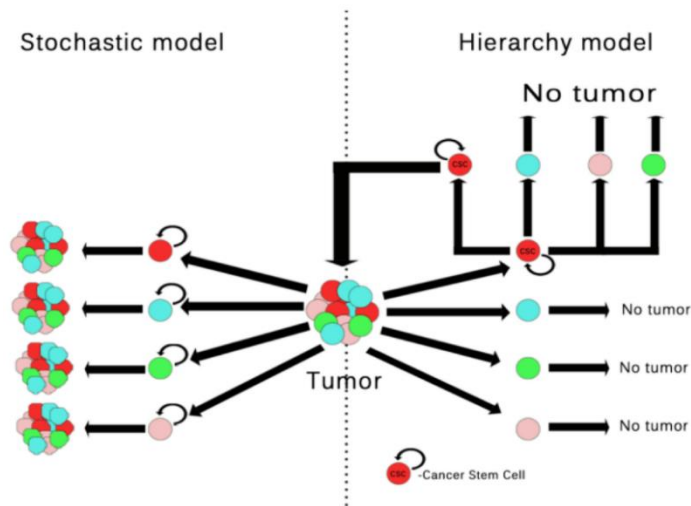


Fig. 1 - Modelos de heterogeneidad tumoral [6]

Las características que diferencian a las células cancerígenas del resto de células normales y sanas del organismo son entre otras (Fig.2) [7]: capacidad proliferativa ilimitada, presencia de mutaciones e inestabilidad genética, síntesis y liberación de factores de crecimiento, independencia ante señales externas de inhibición proliferativa, resistencia a la muerte celular programada o a otros tipos de muerte celular, resistencia contra el sistema inmunitario, capacidad invasiva, angiogénica, metastática y/o inflamatoria, y habilidad para la reprogramación metabólica.

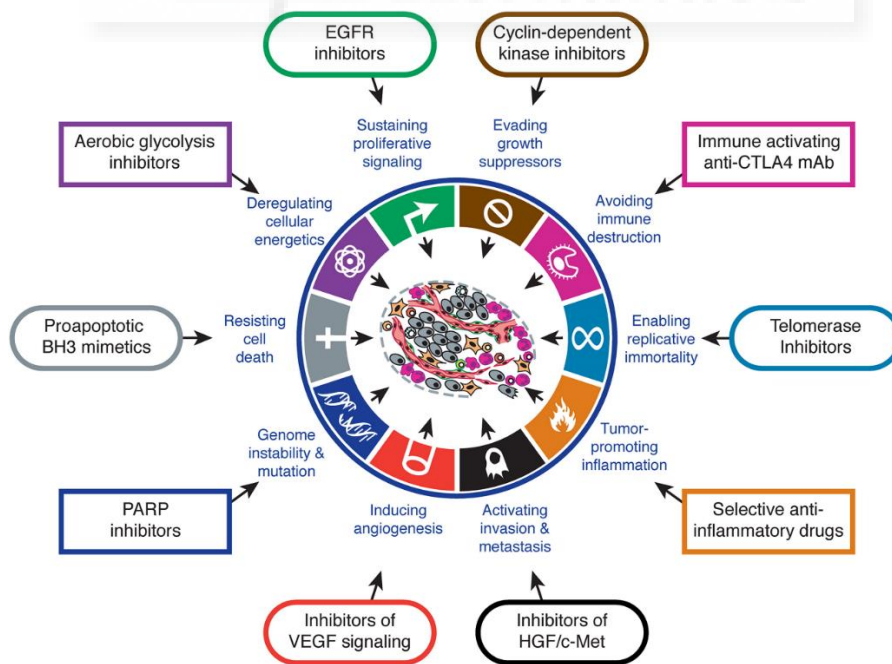


Fig. 2 - Características de las células tumorales y estrategias terapéuticas para abordarlas [7]

## 1.2 Ciclo celular y cáncer

Una célula somática cuando se reproduce genera dos células hijas genéticamente iguales a ella, las cuales se dividen de la misma manera. Este proceso se repite sucesivamente hasta dar lugar a una población celular amplia. El proceso por el cual una célula madre genera dos células descendientes es idéntico para todas las células somáticas de un organismo y se conoce como **ciclo celular**. Este proceso consta de una serie de etapas como se puede observar en la Fig. 3:

- **Fase G<sub>1</sub>**. Es la primera etapa del ciclo. En esta etapa la célula prepara todo lo necesario para entrar en fase S. Los genes se transcriben y traducen para sintetizar las proteínas necesarias para el crecimiento celular propio de esta fase.

- **Fase S**. Es la etapa que sigue a la fase G<sub>1</sub>, donde la célula inicia la replicación de los cromosomas cuando la célula ya ha doblado su tamaño.

- **Fase G<sub>2</sub>**. Es la etapa previa a la división celular en la que se expresan ciertos genes necesarios para esta. El material genético ya duplicado se empieza a condensar para generar

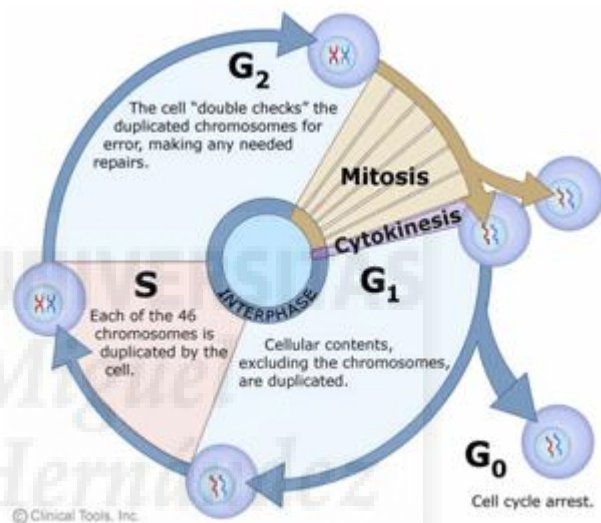


Fig. 3 – Esquema de las etapas del ciclo celular

los cromosomas metafásicos compuestos por dos cromátidas hermanas.

- **Fase M**. Es la última etapa del ciclo. En ella, tanto los cromosomas como el material citoplasmático se dividen equitativamente entre las células hijas, dando lugar a dos células genéticamente iguales. La fase M consta de dos etapas: la **mitosis** o cariocinesis (división nucleica), subdividida en **profase**, **metafase**, **anafase**, y **telofase**; y la **citocinesis** (división citoplasmática).

- **Fase G<sub>0</sub>** o de **diferenciación celular**. Puede suceder dentro de la fase G<sub>1</sub>. Se conoce como "fase de reposo", ya que las células se mantienen ajenas a la división celular. Sin embargo, las células siguen metabólicamente activas, ya que desempeñan las funciones típicas de su especialidad. El tiempo de desarrollo de esta fase es muy variado, ya que depende del tipo celular y de la existencia o no de estímulos mitogénicos extracelulares.

Para que todas las etapas del ciclo celular se sucedan correctamente y en orden existen una serie de **puntos de control del ciclo celular** donde se decide si la célula debe proseguir o no con el proceso proliferativo. Actualmente se han descrito tres puntos de control del ciclo celular:

- **Punto de control de G<sub>1</sub>**. Se encuentra al final de la fase G<sub>1</sub>. En este proceso se revisa que el tamaño celular sea el adecuado, que el ADN no esté alterado, o que haya presencia de estímulos extracelulares favorables para la mitogénesis (factores de crecimiento), para que pueda comenzar la replicación cromosómica.
- **Punto de control de G<sub>2</sub>**. La célula comprueba que la replicación genética se haya realizado correctamente, y que el tamaño celular sea el idóneo, antes de iniciarse la mitosis.
- **Punto de control de M**. Se produce entre la metafase y la anafase. La célula analiza si la orientación y ajuste de los cromosomas con respecto a los microtúbulos del huso mitótico es el adecuado, antes de producirse la **cariocinesis** <sup>[8]</sup>.

Los puntos de control del ciclo celular son regulados por la concentración de unas proteínas fundamentales en el avance del ciclo celular, las **ciclinas**. Existen diversos tipos de ciclinas que intervienen en los diferentes puntos del ciclo celular. Cuando estas ciclinas aumentan su concentración generan una cascada de fosforilaciones que activan la expresión de genes específicos para la progresión celular <sup>[9]</sup>.

La finalidad de estos puntos de control es impedir que posibles errores, alteraciones, o malformaciones puedan transmitirse a la descendencia, lo que podría ocasionar mecanismos hiperproliferativos asociados con el cáncer, junto con otro tipo de enfermedades. De este modo, ante posibles alteraciones perjudiciales irreparables, el avance del ciclo celular puede bloquearse o incluso entrar en un estado de emergencia consistente, en términos prácticos, en una autodestrucción celular. Esto se conoce como **apoptosis** o muerte celular programada <sup>[10]</sup>.

La apoptosis, los puntos de control del ciclo celular, o el proceso proliferativo en general, son regulados permanentemente mediante una compleja red génica cuya expresión diferencial determina el comportamiento celular a través de los llamados factores de transcripción. Aquellos genes cuya función es promover la proliferación celular, y cuya ganancia mutante de función suele generar eventos hiperproliferativos, se conocen como **oncogenes**. Por otro lado, aquellos genes cuya función es promover la apoptosis o detener el ciclo celular en caso de perturbaciones o malformaciones celulares, se definen como **genes supresores de tumores** (por ejemplo, *p53*), y sus mutaciones de pérdida de función son una de las principales causas de progresión tumoral <sup>[11]</sup>.



### 1.3 El cáncer de mama

Según datos oficiales, el cáncer de mama fue en 2012 el segundo tipo de cáncer más diagnosticado a nivel mundial (1,67 millones nuevos casos), siendo el quinto tipo de cáncer más letal (522.000 muertes) y afectando principalmente a la población femenina [1].

En medicina, el cáncer de mama se denomina usualmente **carcinoma de mama**, ya que se forma a partir de células epiteliales. El origen suele partir de células del interior de los conductos o **ductos lactíferos** que llevan la leche materna desde los **lóbulos o acinos glandulares** (donde se sintetiza) hasta los **galactóforos** (donde se almacena antes de su secreción) (Fig. 4). Cuando su origen es este, se trata de un **carcinoma ductal**. Sin embargo, con menos frecuencia, el cáncer se genera en los acinos glandulares. En estos casos, el **carcinoma** es **lobular**.

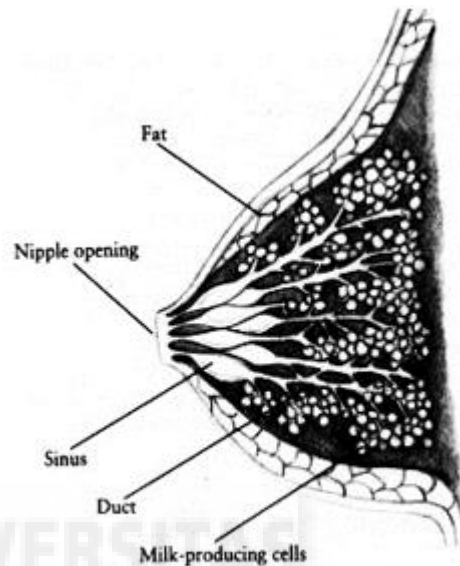


Fig. 4 - Esquema de la estructura secretora mamaria

Otra forma de definir el cáncer de mama se basa en la expresión de los receptores de estrógenos (**RE**) y progesterona (**RP**), y en la expresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (**HER2**) en la superficie celular o nuclear de las células cancerígenas [12]:

- **Receptor hormonal positivo (RE+/PR+)**: las células del tumor expresan receptores de estrógenos o de progesterona. El crecimiento de estos tumores suele ser más lento, y su pronóstico puede ser más prometedor, ya que pueden tratarse con fármacos antiestrógenicos (**terapia antihormonal**).
- **HER2 positivo (HER2+)**: las células tumorales sobreexpresan HER2. Este tipo de cáncer suele ser más agresivo que el HER2 negativo, que no lo sobreexpresa. Pese a esto, terapias basadas en **trastuzumab** (anticuerpo monoclonal bloqueador de HER2) más quimioterapia adicional pueden mejorar bastante el pronóstico [13]. No obstante, se han detectado cánceres HER2 positivos resistentes a **trastuzumab** [14].
- **Triple negativo**: las células no expresan receptores de estrógeno o progesterona y no tienen sobreexpresión de HER2 (suelen presentar otros tipos de receptores hormonales:

de andrógenos o prolactina). Estos cánceres suelen tratarse con quimioterapia clásica, pero pueden llegar a ser más agresivos, ya que no se tratan con terapia específica.

Se han descrito diferentes **factores de riesgo** que están relacionados con una mayor incidencia de cáncer de mama <sup>[15]</sup>:

- **Sexo.** Ser mujer es el principal factor de riesgo ya que, en estas, la glándula mamaria recibe constantemente estímulos estrogénicos de desarrollo y secreción.
- **Genética e historial familiar.** El cáncer de mama tiene un fuerte carácter genético. Algunos marcadores genéticos cuyas mutaciones se asocian con el cáncer de mama son: *BRCA1* y *BRCA2*, *TP53*, *ATM*, *PTEN*, *STK11*, *BRIP1*, *CHEK2* y *PALB2* <sup>[16]</sup>.
- **Edad.** Sobre dos tercios del total de casos invasivos se diagnostica a partir de los 55 años.
- **Exposición hormonal.** Mayores exposiciones a los estrógenos y la progesterona endógenos repercuten en una mayor probabilidad de cáncer de mama. Así, menarquias tempranas o menopausias tardías aumentan su incidencia.
- **Raza.** El cáncer de mama es más incidente para la raza caucásica. No obstante, suele ser más agresivo en mujeres afroamericanas, sobre todo los originados a edad temprana.

Las principales **estrategias de diagnóstico** del cáncer de mama son <sup>[17]</sup>:

- **Historial familiar.** Para buscar antecedentes familiares.
- **Exploración física.** Se busca detectar cambios en la consistencia de la mama, o presencia de nódulos o ganglios linfáticos en axilas o fosas supraclaviculares.
- **Pruebas de imagen.** A través de mamografías de rayos X, ecografías o resonancia magnética nuclear (RMN).
- **Análisis de sangre y orina.** Se valora el estado de las células de la sangre, el estado de las funciones hepática y renal, y se busca la presencia de proteínas marcadoras tumorales.
- **Biopsia.** Se recoge una muestra de tejido de la mama y se analiza.

## 1.4 Mecanismos de muerte celular

La muerte celular se produce cuando la célula cesa sus funciones vitales. Este evento puede ser provocado de forma natural por el organismo o ser consecuencia de un trastorno externo. A lo largo de los años se han descrito diversas formas de muerte celular:

### Apoptosis

La apoptosis es un mecanismo fisiológico de muerte celular programada que se da en los organismos pluricelulares. Su finalidad es acabar con células envejecidas o mutadas que puedan representar un peligro para la salud de la comunidad celular. La apoptosis es un mecanismo muy importante a la hora de evitar procesos hiperproliferativos o tumorales.

Cuando una célula entra en apoptosis sufre una serie de alteraciones. En primer lugar, la célula se arruga, se contrae y se desprende de sus vecinas, y su material genómico se condensa y se fragmenta. Justo entonces la célula se divide en pequeñas porciones de sí misma llamadas **cuerpos apoptóticos**, constituidas por material citoplasmático y nuclear rodeado de una especie de membrana plasmática modificada <sup>[18]</sup>.

La apoptosis está **programada genéticamente** por la propia célula, y muchos de los genes implicados en el desarrollo de la apoptosis se han descrito desde hace años, tales como *p53*, *CASP3*, *NF-kB*, *Mdm2*, *BAX*, *Bcl-2*, *NOXA* o *PUMA* <sup>[19]</sup>. Según sea su función promotora o inhibidora del proceso apoptótico, estos genes pueden definirse como proapoptóticos o antiapoptóticos.

Por otro lado, la apoptosis puede ser **intrínseca**, si es la propia célula la que señala el proceso apoptótico, o **extrínseca**, si la muerte celular programada se desencadena a partir de señales externas de muerte <sup>[18]</sup>. Sin embargo, ambas vías convergen en unas enzimas proteolíticas llamadas **caspasas**, que son las que se desarrollan la función efectora <sup>[20]</sup>.

### **Necrosis y necroptosis**

La **necrosis** suele ser provocada por factores ajenos a los controlados por la célula, como pueden ser un patógeno, una toxina, o la exposición a radiación ionizante. Sin embargo, numerosos estudios defienden que la necrosis es provocada también por factores celulares internos <sup>[21]</sup>. El principal cambio producido en las células necróticas es la desestructuración de la membrana plasmática, lo cual genera la lisis celular, la alteración del potencial de membrana, la expansión del citoplasma, y la incapacidad para controlar la entrada y salida de compuestos.

Por otro lado, la **necroptosis** puede considerarse un híbrido entre la apoptosis y la necrosis, ya que comparte características con ambos tipos de muerte celular.

### **Autofagia**

La **autofagia** es un proceso fisiológico cuyo fin es la obtención de nutrientes a partir del catabolismo de los orgánulos celulares en momentos de estrés, o la degradación de orgánulos defectuosos. La autofagia se basa en la conversión de los orgánulos en vacuolas de doble membrana, que se transportan y digieren en los lisosomas, pudiendo provocar la muerte celular.

## 1.5 Compuestos bioactivos naturales en organismos marinos

Los compuestos bioactivos naturales son sustancias de origen vegetal o animal que tienen efecto en la fisiología y las funciones celulares, pudiendo ser este efecto positivo para ellas. En los últimos años, existe un interés creciente por la búsqueda de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales en el campo farmacológico. Este interés se justifica cuando comprobamos que aproximadamente el 50% de los fármacos comercializados se han clasificado como naturales o derivados de compuestos naturales [22].

Recientemente, dentro de esta rama de investigación en torno a los compuestos bioactivos naturales, está tomando fuerza la farmacología marina. Esta disciplina explora el medio ambiente marino en busca de nuevos fármacos. En las últimas dos décadas, se ha descrito una larga lista de compuestos marinos con potencial beneficioso para la salud, tales como antivirales [23], antibacterianos [24], antifúngicos [25], antitumorales [26], o antiinflamatorios [27].

Durante miles de años se han usado algas y lodos marinos para hacer ungüentos y cataplasmas con un fin terapéutico, sobre todo en lo que se refiere a la medicina tradicional china o japonesa. Sin embargo, no fue hasta 1950 cuando se identificaron los primeros compuestos con actividad farmacológica derivados de esponjas marinas. La espongotimidina y la espongouridina se aislaron a partir de la esponja *Crytotheca cripta* [28]. Actualmente, la investigación farmacológica basada en organismos de origen marino está en apogeo, y es que en los últimos veinte años, se han hallado numerosos compuestos bioactivos marinos con potencial beneficioso en diferentes áreas de la salud humana [28].

De hecho, a día de hoy se han aprobado clínicamente varios fármacos aislados de organismos marinos, para diferentes fines terapéuticos. Cinco de estos compuestos provienen de animales invertebrados de este ambiente natural, siendo aprobados para el tratamiento contra el cáncer. Dentro de estos cinco compuestos, podríamos destacar el **mesilato de eribulina**, indicado contra casos de cáncer de mama metastáticos [29]. Otros compuestos citotóxicos de origen marino se han logrado conjugar con trastuzumab para dar lugar a fármacos potenciales con actividad contra cánceres de mama HER2+ [30].

Diferentes animales invertebrados marinos han sido reconocidos ya como una importante fuente natural de compuestos antitumorales, tales como esponjas, corales, gusanos, tunicados, holoturias o nudibranquios [31]. Estos compuestos bioactivos cuentan con una gran diversidad química, que incluye ácidos grasos poliinsaturados, polifenoles, péptidos y proteínas, esteroides, minerales, carotenoides, alcaloides, terpenos, o glicósidos [32].

## 2. Marco de investigación y objetivos

Desde hace años el grupo de investigación donde se ha desarrollado el presente Trabajo de Fin de Grado ha invertido su esfuerzo en la búsqueda de compuestos bioactivos terapéuticos a partir de fuentes naturales, tanto de origen vegetal como de origen animal. Sus aplicaciones terapéuticas son muy variadas, ya que se han desarrollado desde nutracéuticos o cosmeceúticos hasta compuestos antibacterianos o tratamientos coadyuvantes contra dolencias tan relevantes como la obesidad o el cáncer.

Recientemente, se ha abierto una nueva rama de investigación dentro del grupo científico centrada en la búsqueda de compuestos bioactivos con capacidad antitumoral y antiproliferativa a partir de animales invertebrados de origen marino, y en este marco de investigación es donde se ha desarrollado el presente Trabajo de Fin de Grado.

El objetivo principal del presente trabajo es el cribado *in vitro* de extractos de origen marino con potencial actividad antiproliferativa en dos modelos de cáncer de mama.

Para la realización del presente trabajo, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1) Selección de invertebrados marinos con comportamientos de competencia inter e intraespecífica en acuarios de experimentación.
- 2) Preparación de extractos orgánicos y cálculo de rendimientos.
- 3) Evaluación de la capacidad antiproliferativa de los extractos mediante el ensayo de MTT y cálculo de la concentración inhibitoria del 50% de la viabilidad celular ( $IC_{50}$ ) en dos modelos celulares de cáncer de mama (MCF7 y JIMT-1).
- 4) Estudio del posible mecanismo celular por el cual los extractos más activos desarrollan su acción antiproliferativa, utilizando un rango de concentraciones establecido a partir del cálculo de las  $IC_{50}$ .

## 3. Procedimiento experimental

### 3.1 Reactivos

Para la extracción y disolución de los extractos se utilizaron los disolventes diclorometano, metanol, y dimetil sulfóxido estéril ó **DMSO** (Sigma-Aldrich Química, Europa), respectivamente. El DMSO fue empleado como vehículo para disolver los extractos y realizar todos los ensayos celulares, así como para la disolución de los cristales de formazán formados en el ensayo de MTT. El reactivo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (**MTT**) (Sigma-Aldrich Química, Europa), y la sonda fluorescente **Hoechst 33342** (Molecular Probes, Invitrogen, Europa), fueron utilizados para determinar la viabilidad o concentración celular. El reactivo **Muse Cell Cycle Kit** (Millipore, Hayward, CA, Estados Unidos), una mezcla comercial provista de yoduro de propidio, fue usado para la realización de ensayos de análisis de los diferentes estadios celulares. El reactivo **Muse Annexin V & Dead Cell Kit** (Millipore, Hayward, CA, Estados Unidos), compuesto por Anexina-V y 7-AAD, fue empleado para la realización de ensayos de detección de mecanismos apoptóticos de muerte celular. El **kit de citotoxicidad LDH** (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), que contiene L-lactato, NAD<sup>+</sup>, diaforasa y la sal de tetrazolio INT (cloruro de iodo-nitrotrifenil tetrazolio); y el tampón de lisis suministrado por la misma compañía, fueron usados al realizar un ensayo para detectar carencias en la integridad de las membranas plasmáticas celulares.

### 3.2 Organismos invertebrados marinos y criterios de selección

A través de bases bibliográficas científicas se buscaron aquellas familias de invertebrados marinos que pudieran presentar potenciales compuestos bioactivos y la información obtenida se contrastó con análisis de competencia inter e intraespecífica realizados en los acuarios de experimentación de la empresa TODO PEZ S.L., con la que se ha colaborado activamente, permitiendo así la selección de aquellas especies con mayor potencial bioactivo. Finalmente, dicha empresa nos suministró diez organismos invertebrados marinos para el estudio de la capacidad antiproliferativa de sus extractos. El grupo de organismos estaba integrado por dos esponjas, dos holoturias, un tunicado y cinco opistobranquios (a su vez cuatro de ellos eran nudibranquios). El origen de los organismos era principalmente tropical. Las especies se identificaron en su mayoría con ayuda de la plataforma online *World Registered of Marine Species* (WORMS) <sup>[33]</sup>.

### 3.3 Preparación de extractos

El objetivo de la extracción es obtener, a partir del organismo completo, la mayor parte de los compuestos activos orgánicos que lo componen y que puedan presentar capacidad antiproliferativa. Los organismos seleccionados fueron triturados y macerados en diclorometano:metanol (1:1, v/v) en proporción 1:5 (m/v) durante 24 h a 4°C. Tras la maceración, los extractos fueron filtrados y concentrados mediante rotaevaporación utilizando el *Rotavapor R II* (BÜCHI Labortechnik, Flawil, Suiza) a una Tª máxima de 35°C. La mitad del concentrado se guardó a -80°C, y la otra mitad se alícuotó y se secó a través de un aparato especializado, llamado *miVac Duo Concentrator* (Genevac, SP Scientific, Warminster, Inglaterra) a 35 °C de Tª máxima. Una vez secos, los extractos se pesaron y se disolvieron en DMSO a una concentración de 50 mg/mL y se guardaron a -80 °C hasta su posterior uso.

### 3.4 Cultivo celular

Para realizar el estudio propuesto se utilizaron dos líneas celulares establecidas humanas de cáncer de mama: la línea celular **JIMT-1**, obtenida del Institut Català d'Oncologia (Girona, España), y la línea **MCF7** (Sigma-Aldrich Química, Europa). El mantenimiento de las líneas celulares se llevó a cabo con medio de cultivo formado por DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) alto en glucosa (4,5 g/L) y piruvato, suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB) y un 1% de penicilina/estreptomicina (P/S). Todos estos productos se obtuvieron de la casa comercial Gibco (Life Technologies Corporation, Europa). Las dos líneas celulares se mantuvieron en incubación a 37°C con una atmosfera húmeda y un 5% de CO<sub>2</sub>, en frascos *Corning* de 75 cm<sup>2</sup>.

Ambas líneas celulares se sometieron a un seguimiento continuado mediante microscopía y sus poblaciones fueron subcultivadas cada 3 días cuando presentaban una confluencia elevada. Para subcultivar las células se retiraba el medio de cultivo y se lavaba el tapiz celular con 5 mL de tampón fosfato-salino con EDTA (PBS-EDTA) (Sigma-Aldrich Química, Europa). Después, se retiraba el PBS-EDTA y las células se incubaban 2-3 min a 37°C en una atmósfera húmeda en un medio con 0,05% de tripsina. Cuando las células se despegaban, la tripsina se inactivaba por dilución añadiendo medio de cultivo en una proporción 5 a 1. Una vez que las células se encontraban en suspensión se sembraron en placas de 6 o 96 pocillos para efectuar los diferentes ensayos celulares o subcultivarse en frascos de cultivo para el mantenimiento de la línea celular.

En cada proceso de siembra en placa, se usó la cámara de Neubauer para efectuar el conteo de las poblaciones celulares.

### 3.5 Ajuste de densidad de siembra

El ensayo de ajuste de densidad de siembra se realiza en primer lugar ya que permite determinar el número de células por pocillo que deben sembrarse de las líneas celulares JIMT-1 y MCF7 para que al término de los ensayos celulares en placas *Costar* de 96 pocillos la confluencia control alcanzada sea del 70-90 %. La confluencia es un parámetro importante en cultivo celular que expresa en porcentaje la cantidad de área de la superficie de la placa de cultivo que está cubierta con células y su control es crucial para evitar la inhibición del crecimiento por contacto.

Las densidades iniciales de siembra que se probaron fueron de  $2 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $4 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $6 \times 10^3$ ,  $7 \times 10^3$ ,  $8 \times 10^3$ ,  $9 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  y  $12 \times 10^3$  células/pocillo con un total de 6 réplicas por condición. Una vez sembradas se dejaron transcurrir 24 h para su adhesión celular y a partir de entonces se midió la confluencia celular a las 24, 48 y 72 h a través de dos técnicas complementarias: la primera consistió en obtener medidas promedio de confluencia celular a través de microscopía óptica a partir de las valoraciones de tres personas expertas del grupo de investigación.

La segunda consistió en el conteo del número de células por pocillo usando la sonda fluorescente Hoechst 33342. A las 48 h desde la siembra, se retiró el medio de cultivo, y se incubaron las células con la sonda a  $2,5 \mu\text{g/mL}$ . Esta sonda es muy lipófila y se intercala en el ADN de las células permitiendo detectarla mediante fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 377 nm y de emisión de 447 nm. Una vez incubada la sonda durante media hora, se tomaron imágenes con el lector de placas multimodal *Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode* (BioTek, Alemania) y se contó el número de núcleos por pocillo, el cual es proporcional al número de células por pocillo.

### 3.6 Ensayo de viabilidad celular por MTT

El ensayo de MTT se utiliza para determinar el posible efecto citotóxico de un agente sobre líneas celulares tumorales. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del reactivo MTT por la enzima mitocondrial **succinato-deshidrogenasa** para dar un compuesto de color azul violáceo (**formazán**) (Fig.5), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas o viables es proporcional a la cantidad de formazán producido.



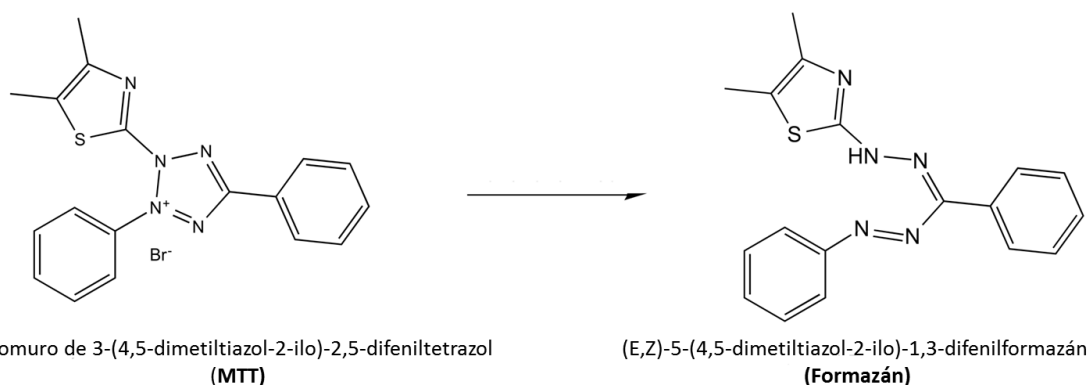


Fig. 5 - Reducción del MTT a formazán

En el presente trabajo el ensayo de MTT se utilizó con el objetivo de obtener una medida de referencia del nivel de actividad antitumoral de cada uno de los extractos, así como para hallar los extractos con una  $IC_{50}$  más baja. Se podría definir la  $IC_{50}$  como la concentración de extracto que produce una disminución del 50% de la viabilidad celular respecto a las medidas control (sin extracto).

Para realizar el ensayo se sembraron  $8 \times 10^3$  células/pocillo, tanto para JIMT-1 como para MCF7, en placas de 96 pocillos. Transcurridas 24 h desde la siembra para permitir su adhesión y crecimiento, las células fueron tratadas con cada uno de los extractos en un rango de concentraciones creciente (desde 5 a 150  $\mu\text{g/mL}$ ) y se incubaron durante 24 h a  $37^\circ\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$ . Como controles positivos se utilizaron medio de cultivo sin tratamiento y medio con DMSO a la máxima concentración de DMSO presente en la mayor concentración de extracto utilizado, con el propósito de descartar la toxicidad causada por el vehículo en el análisis de capacidad antitumoral producida por los extractos. Cumplidas las 24 h, se retiró el medio de tratamiento de cada uno de los pocillos, y se les puso reactivo MTT a 0,25  $\text{mg/mL}$ . Durante las 3 h siguientes, el reactivo MTT se redujo por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, lo que generó formazán en forma de un precipitado de color violáceo. Pasado este tiempo, el medio con MTT se retiró de cada pocillo y a cada uno se le añadieron 100  $\mu\text{L}$  de DMSO que se agitaron durante 5 min para disolver los cristales de formazán. Finalmente se midió la absorbancia de cada pocillo a 570 nm y 620 nm en el lector de placas SPECTROstar Omega de BMG Labtech (BMG Labtech GMBH, Alemania). La diferencia entre ambas longitudes de onda nos proporciona el valor de absorbancia del formazán. Cuanto mayor es este valor, mayor concentración de formazán y por tanto mayor número de células viables hay en cada pocillo. Estos valores de absorbancia se normalizaron estableciendo el control DMSO como el 100% de viabilidad celular. De esta forma se pudo determinar la inhibición de la viabilidad celular producida por cada una de las concentraciones de los extractos ensayados y, por tanto, ajustar la  $IC_{50}$  de cada extracto.

### 3.7 Análisis del ciclo celular

El objetivo de este ensayo es determinar los estadios celulares mayoritarios en la población celular total, 24 h después de ser tratadas con los extractos, con el fin de decidir si los extractos son citotóxicos o citostáticos y, si son citostáticos, en qué etapa del ciclo celular bloquean el desarrollo y proliferación celular.

El estadio celular de cada una de las células analizadas es detectado a través de su contenido en ADN, ya que este contenido varía en función del estadio celular. La cantidad de ADN es detectada a través de la fluorescencia emitida por el **yoduro de propidio**, que es una sonda fluorescente que se añade a la dilución celular justo antes de pasarla por el analizador celular *Muse Cell Analyzer* (Millipore, Hayward, CA, Estados Unidos). El yoduro de propidio se intercala entre los ácidos nucleicos de las células, emitiendo una mayor intensidad de fluorescencia conforme aumenta el contenido de ADN. De este modo, a las células que se encuentran en **fase G<sub>2</sub>/M** les corresponde el doble de intensidad fluorescente que a las células que se hallan en **fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>**, ya que las primeras han duplicado su material genético. Entre estos dos casos, se encuentran las células en **fase S**, que han empezado a sintetizar ADN, pero no han terminado de hacerlo; estas células emitirán una intensidad de fluorescencia intermedia. Por último, las células en **fase Sub-G<sub>1</sub>** o apoptótica presentan el ADN fragmentado, por eso su intensidad de fluorescencia es menor que la de las células en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, que tienen el ADN íntegro (Fig. 6).

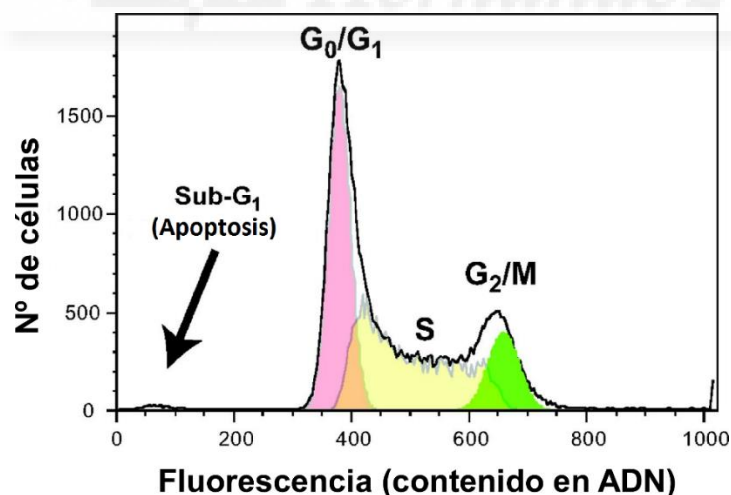


Fig. 6 – Perfil del ciclo celular de una población tipo mediante el marcaje de ADN con sondas fluorescentes

Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos, a una densidad de  $2,4 \times 10^5$  células por pocillo. A las 24 h se les trató con los extractos a dos concentraciones: 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (n=3). Además, se incluyeron un control de medio de cultivo, y un control vehículo, que contenía

una concentración de DMSO equivalente a la del tratamiento a 25 µg/mL (tratamiento de mayor concentración). Transcurridas 24 h de tratamiento, las células fueron levantadas del pocillo con tripsina al 0,05%, lavadas con tampón fosfato salino (PBS) y fijadas en solución con etanol frío al 75% durante al menos una hora a -20 °C. Tras la fijación, las células en suspensión se volvieron a lavar con PBS, y tras sucesivas centrifugaciones, se les añadió 200 µL del reactivo *Muse Cell Cycle Kit* (Millipore, Hayward, CA, Estados Unidos), una mezcla comercial provista del yoduro de propidio. Finalmente, las células se filtraron y se analizaron empleando la tecnología del equipo *Muse Cell Analyzer* (Millipore, Hayward, CA, Estados Unidos). Se obtuvieron los porcentajes de cada estadio celular dentro de las poblaciones observadas totales.

### 3.8 Análisis del tipo de muerte celular mediante Anexina-V

Cuando las células entran en **apoptosis** pierden la simetría de membrana. La Anexina-V es una sonda fluorescente que se une a residuos de **fosfatidilserina**, los cuales solo son accesibles cuando las células pierden la simetría de su membrana, ya que los residuos de fosfatidilserina se exponen hacia el exterior celular. No obstante, esto también podría suceder en células necróticas, por eso, para distinguir las células necróticas de las apoptóticas, se usa también la sonda 7-aminoactinomicina D (**7-AAD**). Esta última sonda solo entra y marca el interior celular cuando las células han perdido la integridad celular, evento que acontece en situaciones de necrosis.

Por tanto, si representamos la situación de las células en función de las intensidades de fluorescencia de Anexina-V (eje x), y 7-AAD (eje y), podemos dividir todas las células en cuatro cuadrantes como puede observarse en la Fig. 7. Cada cuadrante representaría una situación celular diferente:

- Cuadrante inferior izquierdo: células viables (no se marcan por Anexina-V y excluyen 7-AAD)
- Cuadrante inferior derecho: células en apoptosis temprana (se marcan por Anexina-V excluyendo 7-AAD)
- Cuadrante superior derecho: células necróticas o en apoptosis tardía (se marcan por Anexina-V y absorben 7-AAD).
- Cuadrante superior izquierdo: solo células necróticas (no son marcadas por Anexina-V, pero sí por 7-AAD).

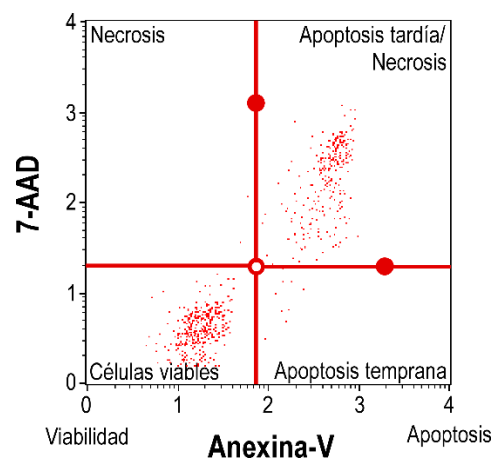


Fig. 7 – Distribución de una población celular según las intensidades de fluorescencia de las sondas

Las células analizadas fueron sembradas en placas de 6 pocillos, a una densidad de  $2,4 \times 10^5$  células por pocillo. A las 24 h se les trató con los extractos marinos a  $10 \mu\text{g/mL}$  y  $25 \mu\text{g/mL}$  ( $n=5$ ) y se incluyeron los controles positivos: el control medio de cultivo y el control vehículo. Las células fueron tratadas durante 24 h, después de ese tiempo, las células se despegaron de la superficie de los pocillos con tripsina al 0,05%, se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) y, tras sucesivas centrifugaciones, se les añadió  $200 \mu\text{l}$  del reactivo *Muse Annexin V & Dead Cell Kit* (Millipore, Hayward, CA, Estados Unidos), una mezcla comercial provista de Anexina-V y 7-AAD. En última instancia, las células se dejaron reposar unos 30 min a Tª ambiente y oscuridad, se filtraron y se analizaron empleando la tecnología del equipo *Muse Cell Analyzer* (Millipore, Hayward, CA, Estados Unidos). Se obtuvieron los porcentajes celulares de cada tipo de muerte celular dentro del total de las poblaciones observadas.

### 3.9 Determinación de la integridad de la membrana plasmática

Para complementar el análisis anterior por Anexina-V, la muerte celular o citotoxicidad fue testada tanto en JIMT-1 como en MCF7 a través de la evaluación de la actividad de la enzima **lactato deshidrogenasa (LDH)**, que es una enzima estable presente en el citosol celular. Cuando la integridad de la membrana plasmática se pierde por daño celular, la LDH se libera al entorno extracelular, permitiendo su medición. Así, niveles altos de actividad LDH implican una menor capacidad de retención o impermeabilidad celular, lo cual acontece en situaciones de daño celular y pérdida de integridad de la membrana plasmática, que se asocia con situaciones necróticas. Por tanto, mediciones altas de LDH extracelular se valoran como una prueba de necrosis.

Para medir la actividad de la enzima LDH, se empleó el **kit de citotoxicidad LDH** (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), que se basa en una mezcla compuesta por L-lactato,  $\text{NAD}^+$ , diaforasa y la sal de tetrazolio INT (cloruro de iodo-nitrotrifenil tetrazolio). La reacción se basa en la reducción del  $\text{NAD}^+$  a NADH por la LDH, lo que desencadena en una reacción secundaria entre el NADH, la sal de tetrazolio, y la diaforasa. Esta segunda reacción genera el producto colorimétrico (el formazán rojo) cuya concentración se puede medir a partir de su absorbancia mediante un espectrofotómetro.

Las células de JIMT-1 y MCF7 analizadas fueron sembradas en placas de 96 pocillos, a una densidad de  $8 \times 10^3$  células por pocillo. A las 24 h se les trató con los extractos marinos a  $10 \mu\text{g/mL}$  y  $25 \mu\text{g/mL}$  ( $n=6$ ). Además, se ensayaron 6 réplicas control de medio de cultivo, y de control vehículo, a parte de otras 6 réplicas de control de lisis. Las células fueron tratadas durante 24 h, después de ese tiempo, las células del control de lisis que hasta entonces solo habían entrado en

contacto con medio de cultivo, se trataron con un tampón de lisis (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), para liberar el máximo contenido celular de LDH al medio extracelular, que se estableció como control positivo 100%. Realizado este paso, se recogieron 100 µl de los sobrenadantes de todos los pocillos y se pasaron a otra placa de 96 pocillos. Cada uno de los pocillos se incubó 30 min a Tª ambiente y oscuridad con 50 µL del kit de citotoxicidad LDH, para posteriormente medir su absorbancia a 492 nm y 620 nm mediante el espectrofotómetro SPECTROstar Omega (BMG, LabTech GmbH, Offenburg, Alemania). La diferencia entre las dos longitudes de onda se corresponde con la absorbancia del formazán rojo. Los porcentajes de citotoxicidad se calcularon según la fórmula siguiente:

$$\text{Citotoxicidad (\%)} = \frac{\text{valor experimental} - \text{control negativo}}{\text{control positivo} - \text{control negativo}} \cdot 100$$

*Todos los valores representados en la fórmula fueron previamente normalizados con respecto a la viabilidad celular obtenida a partir de un ensayo MTT hecho a las placas tratadas. El control positivo hace referencia a los pocillos tratados con el tampón de lisis (100% de liberación de LDH), mientras que el control negativo se refiere a los pocillos tratados solo con el vehículo (0% de liberación)*

### 3.10 Análisis estadístico de los datos

Los datos obtenidos de los ensayos se procesaron y analizaron con el programa informático GraphPad Prism v 6.0 (GraphPad Software Inc., CA, Estados Unidos). Con este programa se realizaron análisis de la varianza de un factor (**ANOVA**), permitiendo detectar diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones estudiadas, y el test de comparaciones múltiples de Tukey *a posteriori*, el cual es capaz de discriminar entre qué condiciones concretas existen estas diferencias a un nivel de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ). Los valores están representados como el promedio de las réplicas (n) ± desviación estándar o SD (siglas en inglés). El valor de 'n' varía dependiendo del ensayo. El cálculo de las **IC<sub>50</sub>** se hizo mediante ajustes de regresión no lineales, dando lugar a curvas sigmoideas.

Por otra parte, el número de asteriscos sobre cada condición varía según la probabilidad de que estemos suponiendo que las diferencias entre las condiciones sean estadísticamente significativas cuando realmente no lo sean (*p*-valor o solamente *p*). \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ). Valores mayores de *p*-valor indican diferencias estadísticamente no significativas.

## 4. Resultados

### 4.1 Selección de organismos y rendimiento de extractos

Los invertebrados marinos utilizados en el presente trabajo fueron seleccionados en función sus comportamientos de competencia intra e interespecífica, aptitudes que se evaluaron en los acuarios de experimentación de la empresa suministradora. De cada uno de los organismos se obtuvo un extracto, cuyos rendimientos se muestran en la [Tabla 1](#).

Tabla 1 – Conjunto de invertebrados marinos utilizados, junto con los nombres asignados a los extractos con los que se trabajó, los rendimientos obtenidos en % (m/m) y una imagen ilustrativa

| Organismo                                 | Abreviación del extracto y su rendimiento | Imagen  | Organismo  | Abreviación del extracto y su rendimiento | Imagen  |
|---|---|---|--|---|---|
| Esponja marina                            | E1 (4,6%)                                 |   | <i>Phyllidia sp</i><br>(nudibranquio)            | Nc (1,3%)                                 |   |
| Esponja marina                            | E2 (1,1%)                                 |  | <i>Hexabranchus sanguineus</i><br>(nudibranquio) | Nd (1%)                                   |  |
| <i>Synapta maculata</i><br>(holoturia)    | H2 (1,4%)                                 |  | Nudibranquio                                     | Ne (1,5%)                                 |  |
| <i>Colochirus robustus</i><br>(holoturia) | H3 (1,2%)                                 |  | <i>Chelinodura varians</i><br>(opistobranquio)   | Ch (1,4%)                                 |  |
| <i>Elysia crispata</i><br>(nudibranquio)  | T (1,4%)                                  |  | Tunicado   | Tu (0,4%)                                 |  |

### 4.2 Ensayo de ajuste de densidad de siembra

A las 24, 48 y 72 h desde el momento de un hipotético tratamiento efectuado a las 24 h de la siembra, se analizó y determinó la confluencia promedio para cada una de las densidades celulares sembradas ([Fig. 8](#)).

Estos resultados de confluencia promedio muestran un comportamiento de crecimiento celular diferente en JIMT-1 con respecto a MCF7. Como se observa en la Fig. 8, las poblaciones de JIMT-1 presentan un crecimiento más acelerado ya que a igual densidad de siembra a un tiempo concreto el nivel de confluencia es mayor que en MCF7. Por otra parte, se monitorizó el número de células por condición a través de la sonda fluorescente Hoechst 33342 (Fig. 9), mediante el lector de placas multimodal *Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode*.

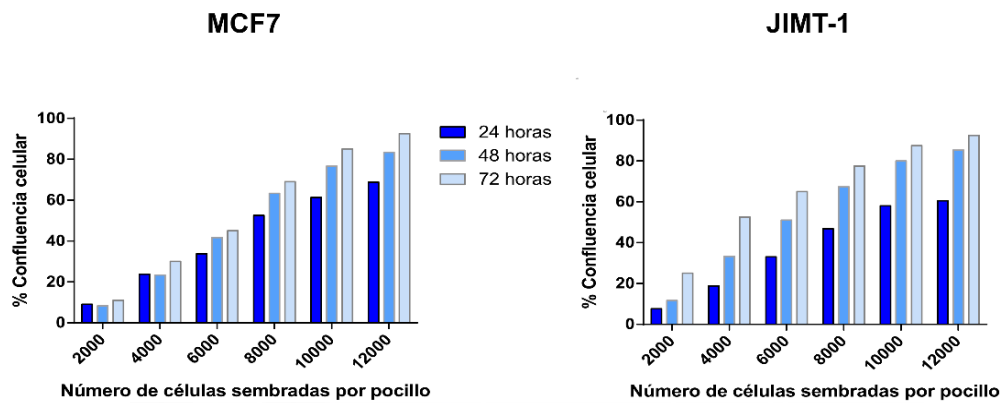


Fig. 8 - Representación del porcentaje de confluencia celular frente al número de células sembradas, a 24, 48 y 72 h tras el hipotético tratamiento. Los datos se expresan como porcentajes promedio (n=3)

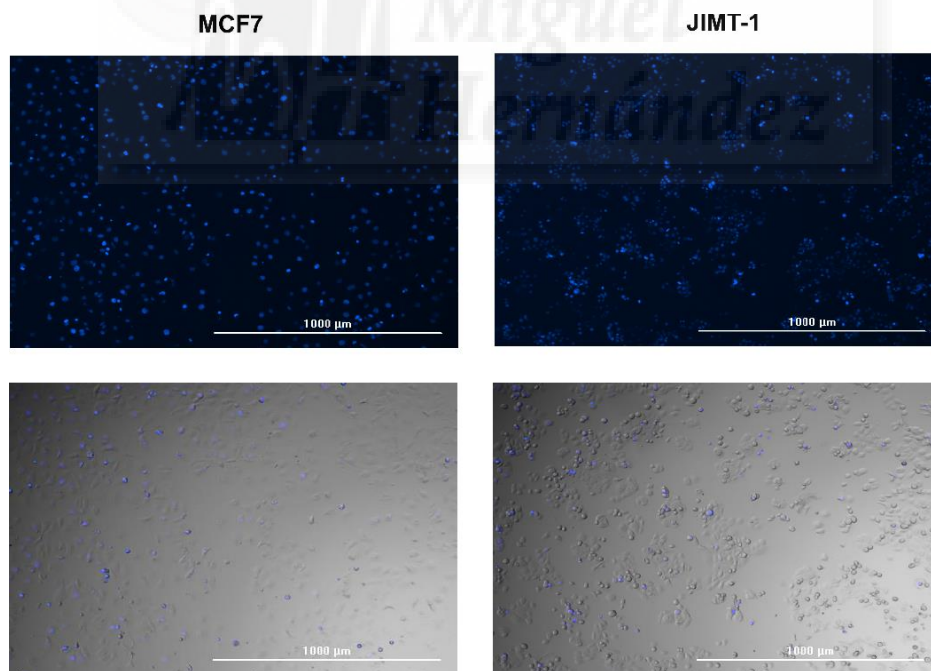


Fig. 9 - Visualización del estado de confluencia a las 72 h después de sembrar  $8 \times 10^3$  células por pocillo. Arriba, el campo oscuro permite observar claramente la fluorescencia azul que desprenden los núcleos celulares. Abajo, la imagen de fluorescencia se superpone con el campo claro.

En base a los resultados y para poder comparar el efecto de los extractos en ambas líneas celulares se decidió elegir la misma densidad ( $8 \times 10^3$  células por pocillo) tanto en JIMT-1 como en

MCF7. A esta densidad de siembra las poblaciones celulares alcanzan un 70-90% de confluencia entre las 24 y las 72 horas. A partir de este valor, fijamos también el valor de densidad de siembra óptimo para placas *Costar* de 6 pocillos en  $2,4 \times 10^5$  células/pocillo.

### 4.3 Estudio de la capacidad antiproliferativa de los extractos

Para evaluar la capacidad antiproliferativa de los extractos marinos en las líneas tumorales JIMT-1 y MCF7 se usó el reactivo MTT tras 24 h de incubación con los extractos. El reactivo MTT permite calcular el número de células viables que, comparadas con un control positivo, nos permite obtener una medida de la capacidad citotóxica de los extractos según su concentración.

Como se observa en las Figs. 10 y 11 los extractos presentan actividades citotóxicas distintas entre sí aunque su efecto parece repetirse en ambas líneas celulares. Solo una parte de los extractos ensayados mostraron una capacidad inhibitoria de la viabilidad celular considerable, destacando H3 y Nd con respecto al resto. Factores toxicocinéticos como la **potencia inhibitoria** o la **eficacia inhibitoria** variaban mucho según el extracto. De esta forma, de todos los extractos ensayados se escogieron los extractos con mayor potencia y eficacia para proseguir analizando su capacidad antiproliferativa a través de ensayos más específicos. La potencia y eficacia inhibitoria de los extractos se evaluó en función de las gráficas de actividad antiproliferativa de los extractos y de sus  $IC_{50}$  (obtenidas a partir de los valores del ensayo de MTT y mostradas en la Tabla 2).

Tabla 2 – Valores de  $IC_{50}$  para todos los extractos ensayados a 24 h en MCF7 y JIMT-1. Los valores definidos como “NC” (No Calculado) representan una  $IC_{50}$  superior a la máxima concentración ensayada y un efecto citotóxico bajo

|           | $IC_{50} \pm SD$ (24 h) |                  |
|-----------|-------------------------|------------------|
|           | MCF7                    | JIMT-1           |
| <b>E1</b> | NC                      | $76,3 \pm 17,1$  |
| <b>E2</b> | NC                      | $127,2 \pm 59,5$ |
| <b>H2</b> | $136,5 \pm 32$          | $84,4 \pm 4,6$   |
| <b>H3</b> | $18,6 \pm 1,1$          | $17,9 \pm 2,6$   |
| <b>T</b>  | NC                      | NC               |
| <b>Nc</b> | NC                      | NC               |
| <b>Nd</b> | $52,7 \pm 7,9$          | $82,7 \pm 11,6$  |
| <b>Ne</b> | NC                      | NC               |
| <b>Ch</b> | NC                      | NC               |
| <b>Tu</b> | $142,4 \pm 13,3$        | NC               |



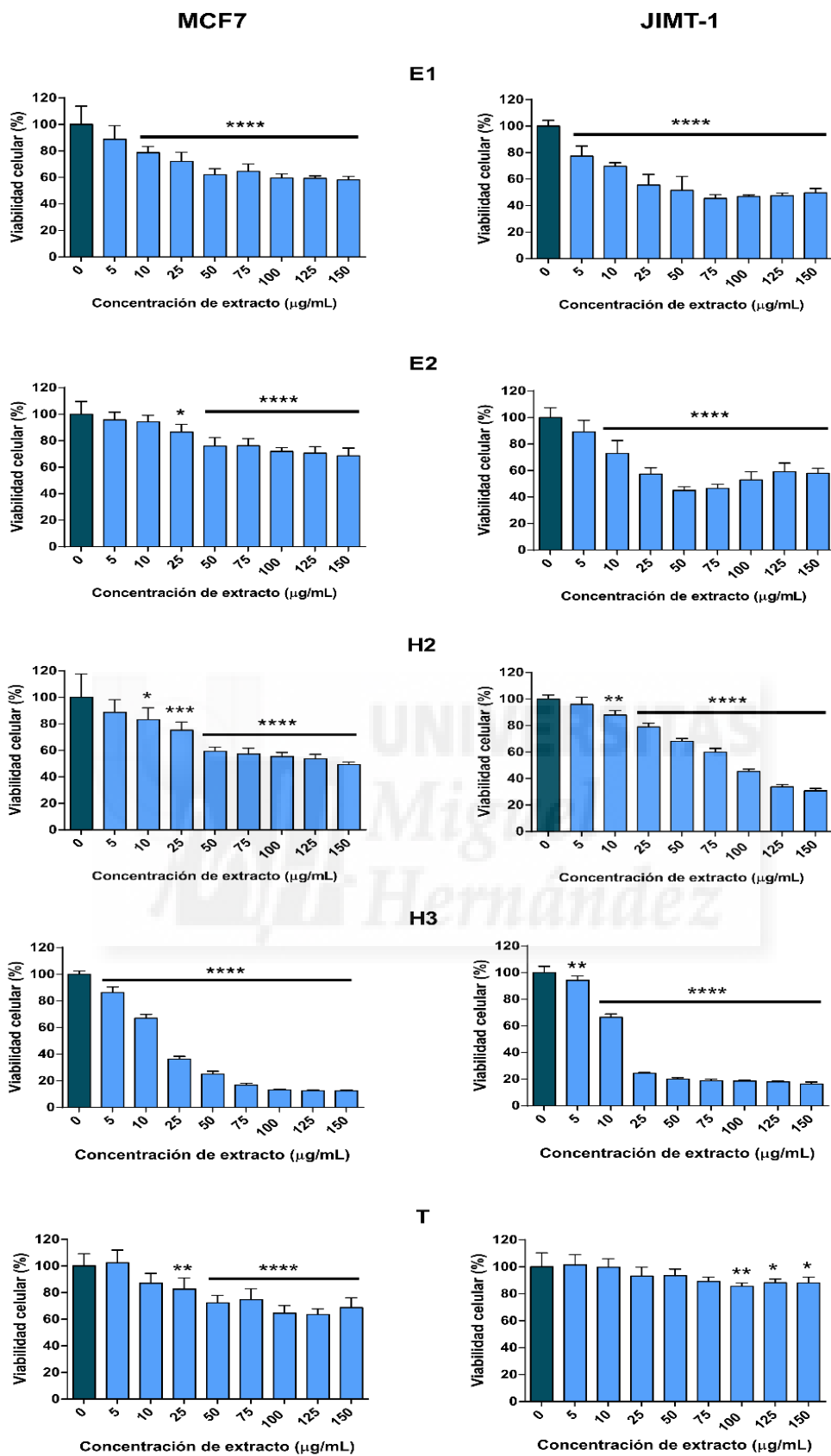


Fig. 10 - Representación del porcentaje de viabilidad celular frente a la concentración utilizada de los extractos E1, E2, H2, H3 y T, tras 24 h de incubación. El 100 % de viabilidad celular está representada por el control vehículo (0). Las gráficas de la izquierda corresponden a la línea celular MCF7, mientras que las de la derecha lo hacen con JIMT-1. Los porcentajes representados son promedios (n=6) y las barras de error representan la SD. \* (p<0,05), \*\* (p<0,01), \*\*\* (p<0,001) y \*\*\*\* (p<0,0001) indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control vehículo

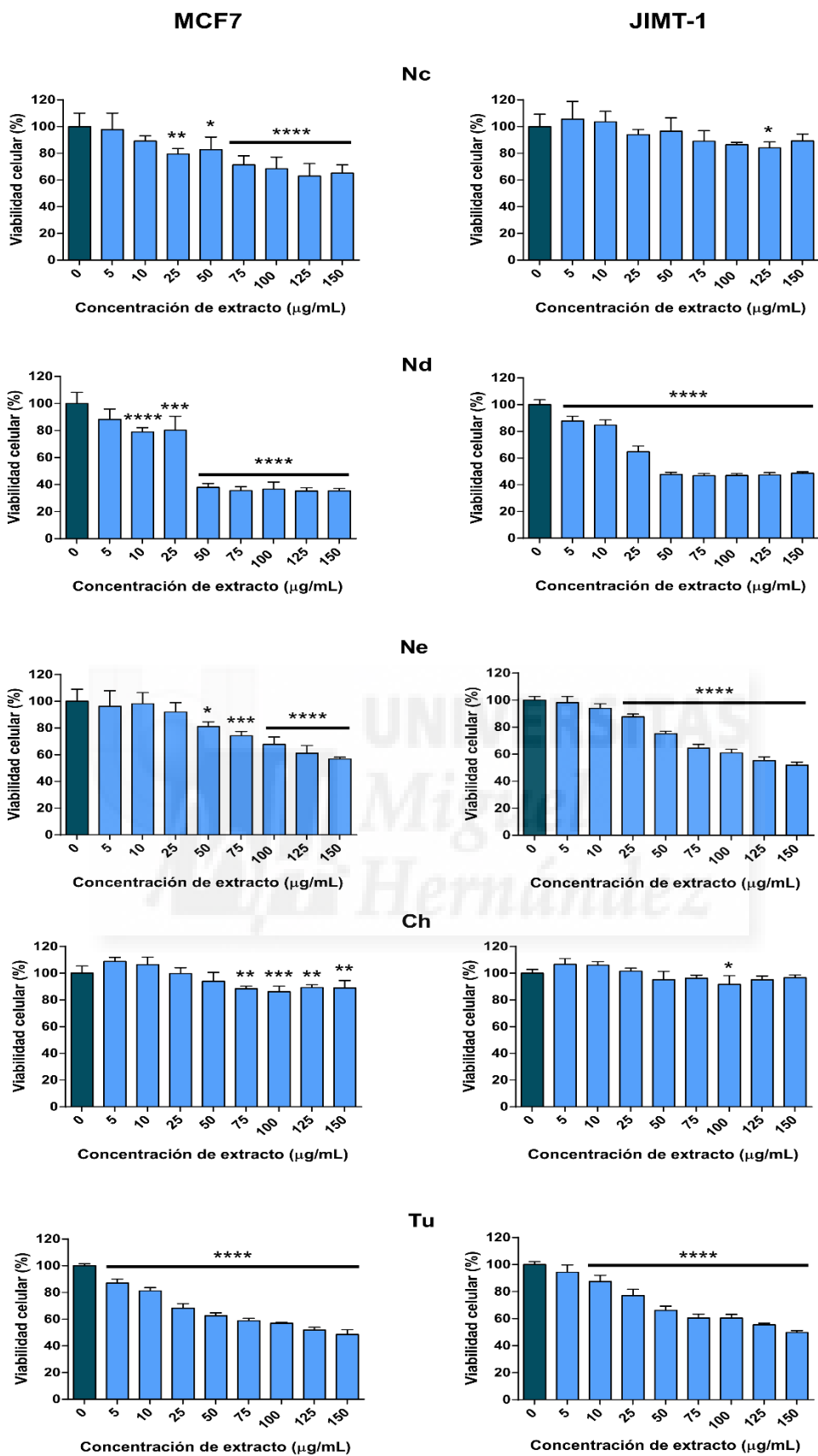


Fig. 11 - Representación del porcentaje de viabilidad celular frente a la concentración utilizada de los extractos Nc, Nd, Ne, Ch y Tu, tras 24 h de incubación. El 100 % de viabilidad celular representa el control vehículo. Las gráficas de la izquierda corresponden a la línea celular MCF7, mientras que las de la derecha lo hacen con JIMT-1. Los porcentajes representados son promedios (n=6) y las barras de error representan la SD. \* (p<0,05), \*\* (p<0,01), \*\*\* (p<0,001) y \*\*\*\* (p<0,0001) indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control vehículo

Los extractos H3, Nd, H2 y E1 fueron los extractos seleccionados por sus menores IC<sub>50</sub> y su mayor potencial antiproliferativo. El extracto H3 fue seleccionado como el más citotóxico por presentar las IC<sub>50</sub> más bajas tanto en MCF7 como en JIMT-1. Nd presentó la segunda IC<sub>50</sub> más baja en MCF7 y la tercera en JIMT-1. H2 fue escogido por obtener el tercer valor de IC<sub>50</sub> más bajo en MCF7 y el cuarto en JIMT-1. Por último, aunque el valor de IC<sub>50</sub> del extracto E1 obtenido para MCF7 se evaluó como “NC” (No Calculado), su valor de IC<sub>50</sub> en JIMT-1 fue el segundo más bajo.

Habiendo seleccionado los extractos más activos a 24 h se decidió analizar también su efecto a 48 y 72 h (Figs. 12 y 13). A partir de los resultados obtenidos se calcularon nuevos valores de IC<sub>50</sub> para los cuatro extractos a 24, 48 y 72 h (Tabla 3). Los cuatro extractos mostraron capacidad de inhibición dosis-dependiente de la viabilidad celular tanto en MCF7 como en JIMT-1. Esta inhibición se ve aumentada conforme mayor es el tiempo de tratamiento, hecho que se refleja en que los valores de IC<sub>50</sub> descienden a medida que aumenta el tiempo de incubación (Tabla 3, Figs. 12 y 13).

Por otra parte, podemos diferenciar claramente los extractos H3 (*Colochirus robustus*) y Nd (*Hexabanchus sanguineus*) de los otros dos, ya que muestran mucha más potencia inhibitoria, y también más eficacia inhibitoria, lo que se traduce en valores de IC<sub>50</sub> mucho más pequeños. Además, los efectos antiproliferativos de H3 y Nd son muy acusados ya a las 24 h de incubación, a diferencia de lo que se observa con E1 y H2.

Estos resultados muestran por tanto que H3 y Nd son notablemente más activos que E1 y H2, tanto en MCF7 como en JIMT-1. Y por esta razón, se decidió orientar los esfuerzos de este trabajo en el estudio más exhaustivo de la capacidad antiproliferativa de dichos extractos, profundizando en su posible mecanismo de acción.

Tabla 3 – Valores de IC<sub>50</sub> para los extractos ensayados a 24, 48 y 72 h en MCF7 y JIMT-1. Los valores definidos como “NC” (No Calculado) representan una IC<sub>50</sub> superior a la máxima concentración ensayada y un efecto citotóxico bajo

|           | IC <sub>50</sub> ± SD |             |             |              |             |            |
|-----------|-----------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|------------|
|           | MCF7                  |             |             | JIMT-1       |             |            |
|           | 24 h                  | 48 h        | 72 h        | 24 h         | 48 h        | 72 h       |
| <b>E1</b> | NC                    | 53,7 ± 5    | 36,9 ± 6,5  | NC           | NC          | 23 ± 5,3   |
| <b>H2</b> | 86,4 ± 9,9            | 56,3 ± 11,4 | 48,1 ± 13,8 | 125,8 ± 12,5 | 75,5 ± 7,54 | 56,3 ± 5,6 |
| <b>H3</b> | 15,7 ± 1,6            | 10,8 ± 0,81 | 12,6 ± 1    | 16,8 ± 2,4   | 9,7 ± 1,1   | 6,9 ± 0,7  |
| <b>Nd</b> | 13,8 ± 2,2            | 8,7 ± 0,9   | 5,6 ± 0,6   | 12,2 ± 1,7   | 7,8 ± 1     | 5,3 ± 0,6  |

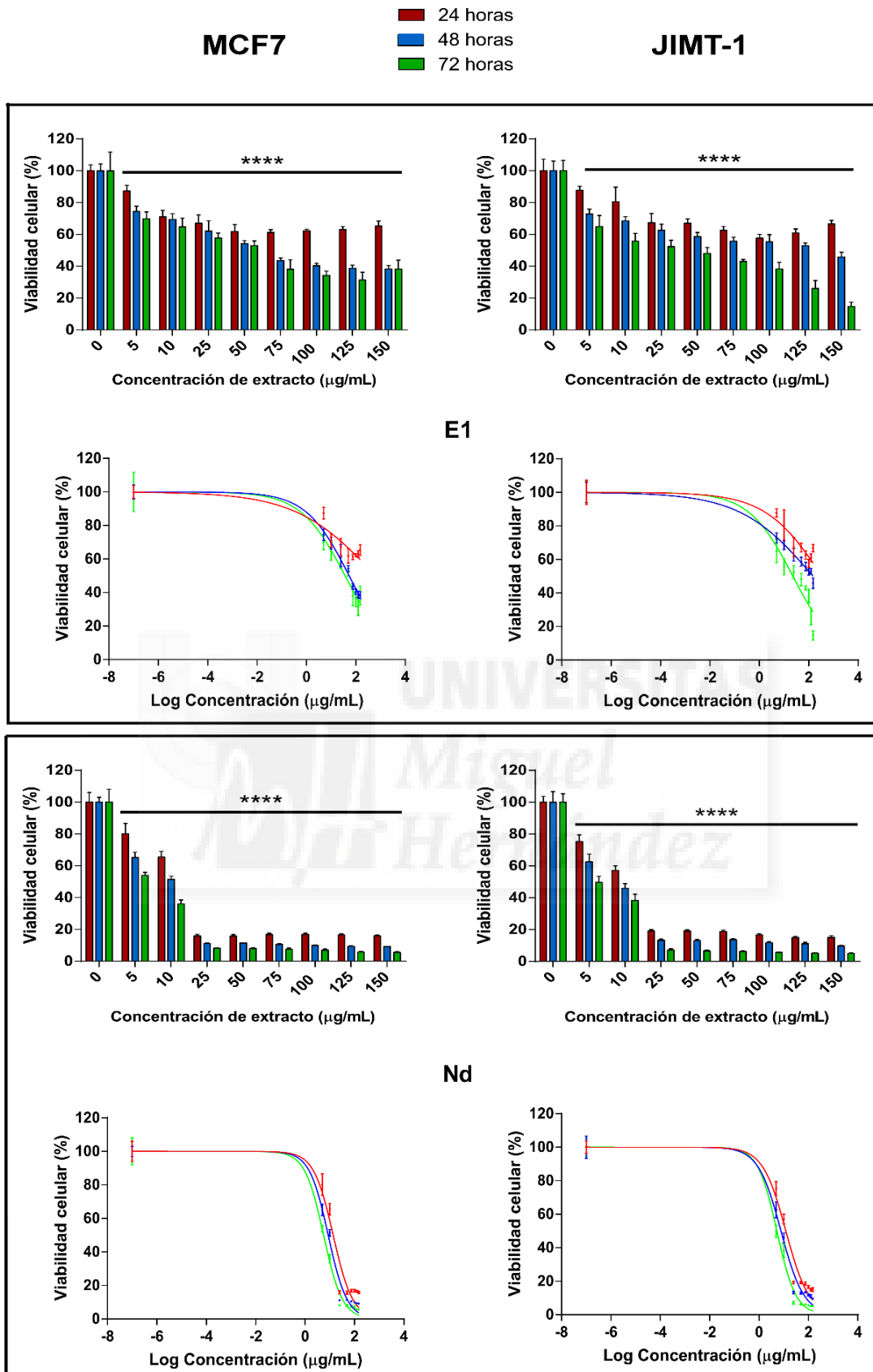


Fig. 12 – Las gráficas de barras representan el porcentaje de viabilidad celular frente a la concentración utilizada de los extractos E1 y Nd, tras 24, 48 y 72 h de incubación. En la imagen también se muestran las curvas sigmoideas de inhibición que permitieron calcular los valores de IC<sub>50</sub> a los tres tiempos de incubación. Los porcentajes representados son promedios (n=6) y las barras de error representan la SD. \*\*\*\* (p<0,0001) indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control vehículo

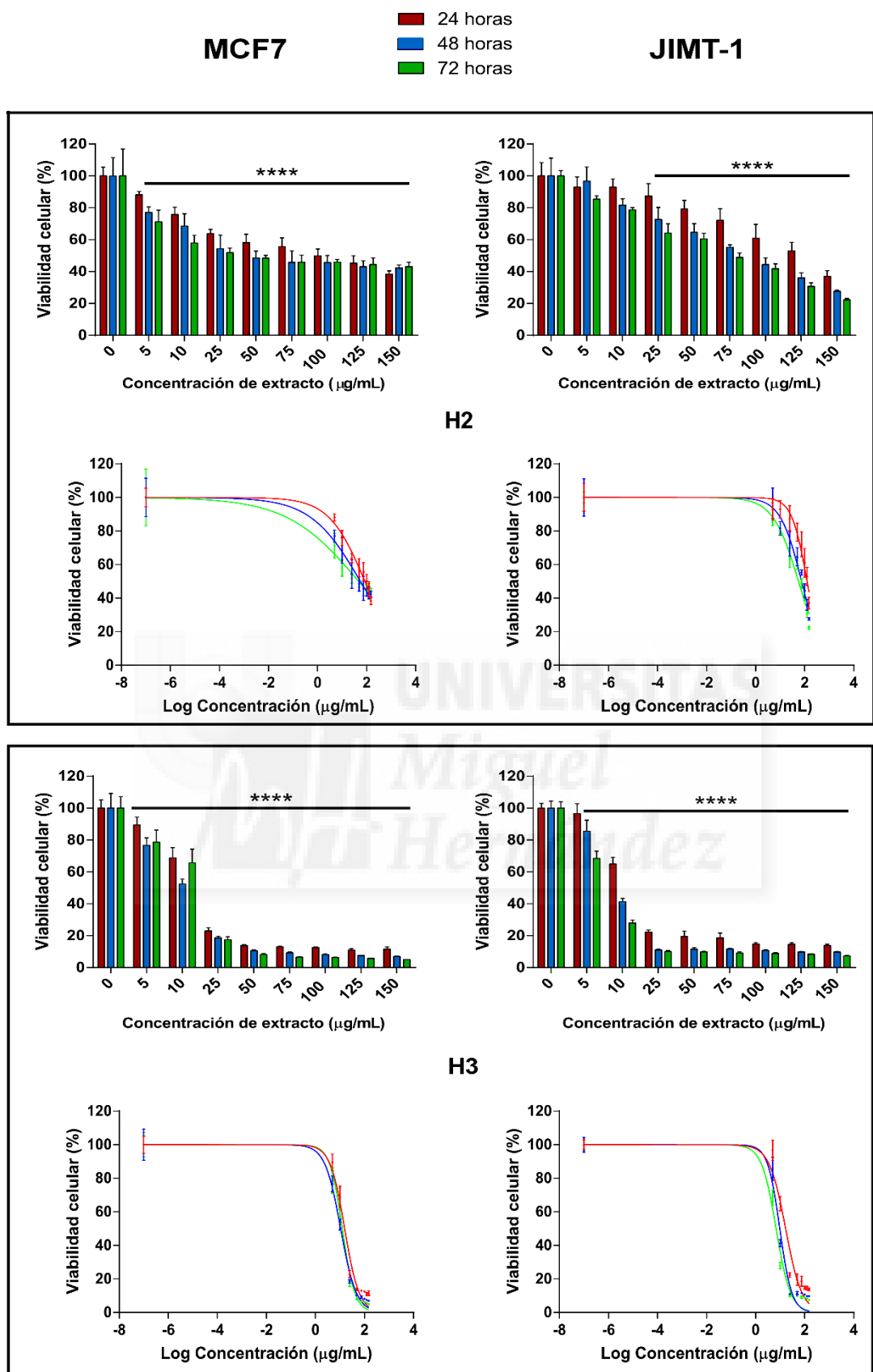


Fig. 13 – Las gráficas de barras representan el porcentaje de viabilidad celular frente a la concentración utilizada de los extractos H2 y H3, tras 24, 48 y 72 h de incubación. En la imagen también se muestran las curvas sigmoideas de inhibición que permitieron calcular los valores de  $IC_{50}$  a los tres tiempos de incubación. Los porcentajes representados son promedios ( $n=6$ ) y las barras de error representan la SD. \*\*\*\* ( $p<0,0001$ ) indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control vehículo.

#### 4.4 Estudio del mecanismo antiproliferativo de los extractos de *H. sanguineus* y *C. robustus*

Una vez seleccionados los extractos Nd (*H. sanguineus*) y H3 (*C. robustus*) como los extractos con mayor potencial antiproliferativo, tanto en MCF7 como en JIMT-1, se procedió al estudio de su mecanismo de acción a dos concentraciones (10 µg/mL y 25 µg/mL).

##### 4.4.1 Análisis del ciclo celular

En primer lugar, se evaluó el **ciclo celular** de las poblaciones celulares tratadas con ambos extractos tras 24 h de incubación. Como puede observarse en la Fig. 14, ambos extractos provocaron modificaciones en el ciclo celular de las poblaciones estudiadas:

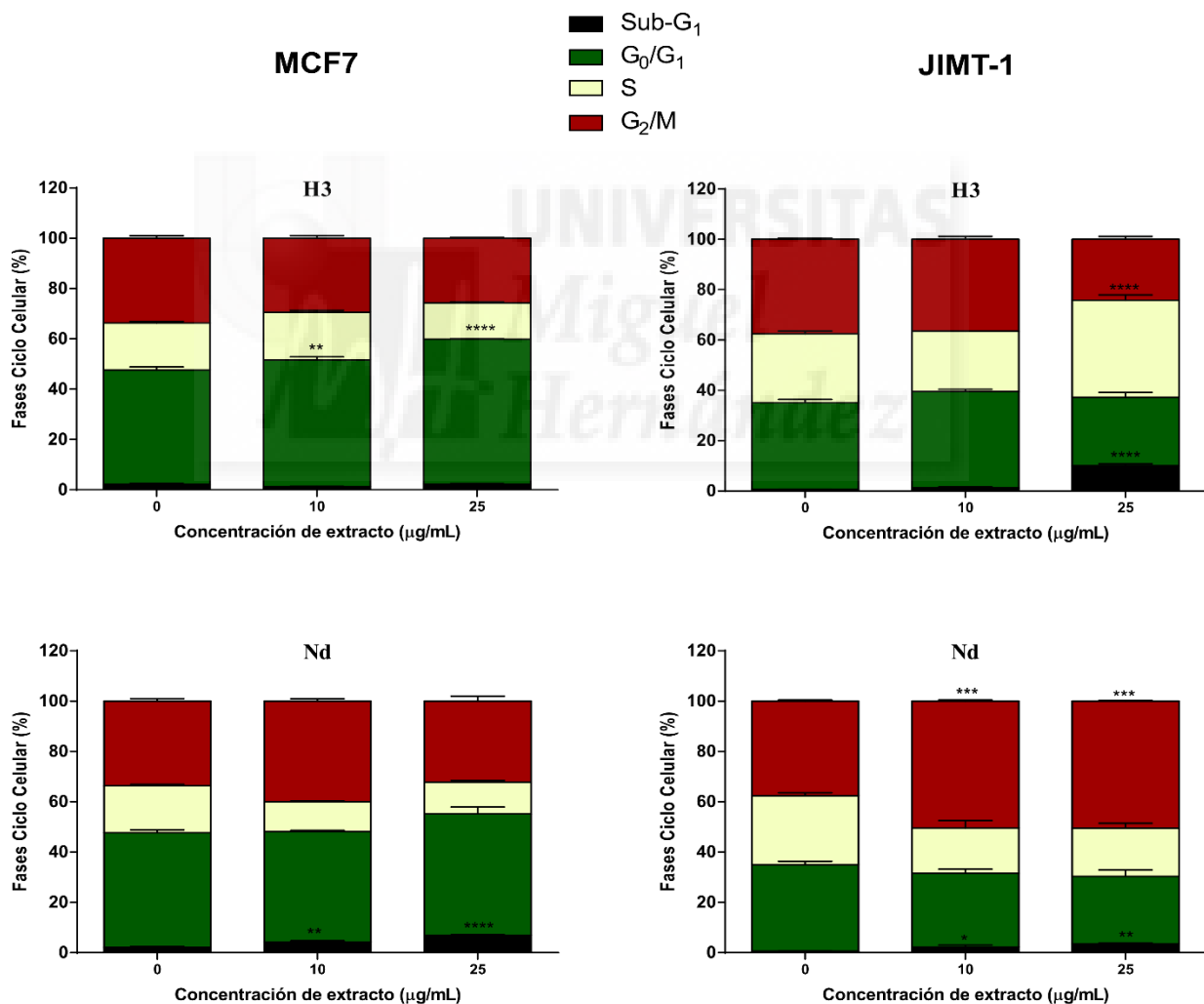


Fig. 14 - Efecto de los extractos H3 y Nd sobre el ciclo celular de las líneas MCF7 (a la izquierda) y JIMT-1 (a la derecha), tras 24 h de incubación. La concentración '0' representa el control vehículo. Los porcentajes representados son promedios (n=3), y las barras de error muestran la SD. \* (p<0,05), \*\* (p<0,01), \*\*\* (p<0,001) y \*\*\*\* (p<0,0001) indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control vehículo

Respecto a las poblaciones celulares de la línea **MCF7**, se observó que el tratamiento con el extracto H3 repercutía en un aumento de la fase  $G_0/G_1$  con respecto al control vehículo, llegando a aumentar esta un 12,1% a 25  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que el resto de fases normales del ciclo experimentaban un descenso. En cuanto al extracto Nd, el tratamiento de las células con dicho extracto provocó un aumento significativo de la fase Sub- $G_1$ , que llegó a incrementarse en un 4,8 % a 25  $\mu\text{g/mL}$ . Por otra parte, respecto a las poblaciones de **JIMT-1**, los resultados evidenciaron que al tratar con el extracto H3 se producía un aumento significativo de las fases S y Sub- $G_1$  a 25  $\mu\text{g/mL}$  (+11,1 y +9,4, respectivamente) con respecto al control. En cuanto al extracto Nd, los datos obtenidos mostraron un ligero aumento de la fase Sub- $G_1$ , pero sobre todo un amplio aumento de la fase  $G_2/M$  (+13% a 25  $\mu\text{g/mL}$ ).

#### 4.4.2 Análisis del tipo de muerte celular mediante Anexina-V. ¿Apoptosis?

Tras analizar las fases del ciclo celular, se procedió a la búsqueda del mecanismo de muerte celular que pudiera ser la causa del efecto antiproliferativo de los extractos H3 y Nd. Para ello, se realizó un ensayo con Anexina-V, cuyo objetivo final es saber si el mecanismo de muerte se relaciona con la vía **apoptótica**. Las células fueron tratadas con ambos extractos a 10 y 25  $\mu\text{g/mL}$  durante 24 h. Los porcentajes de células en apoptosis temprana y apoptosis tardía (Fig. 7) fueron determinados a nivel basal (control vehículo / negativo) y luego comparados con los porcentajes de las poblaciones celulares tratadas (Fig. 15). Como puede observarse en la Fig. 15, el tratamiento con el **extracto H3** provocó un incremento significativo del número de células en apoptosis tardía/necrosis tanto en MCF7 como en JIMT-1. En MCF7 este aumento fue de un 30,25% a 25  $\mu\text{g/mL}$ , con respecto al control negativo, mientras que en JIMT-1 el porcentaje de células en apoptosis tardía/necrosis llegó a alcanzar un 83,2% a 25  $\mu\text{g/mL}$ . En cuanto a la apoptosis temprana, en MCF7 este porcentaje solo subió hasta un 10,1% a 25  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que en JIMT-1 podríamos definir el aumento de apoptosis temprana como poco considerable. Estos resultados señalaron a la necrosis como el mecanismo citotóxico más probable para el extracto H3.

Por otra parte, el **extracto Nd** parece provocar un efecto diferente en las poblaciones tumorales. En MCF7 provocó un incremento considerable tanto en el porcentaje de apoptosis tardía (+24,4% a 25  $\mu\text{g/mL}$ ), como en el porcentaje de apoptosis temprana (+15,7% a 25  $\mu\text{g/mL}$ ). Además, los registros de apoptosis temprana superaron a los de apoptosis tardía a 10  $\mu\text{g/mL}$  en MCF7. Por otro lado, los registros de apoptosis temprana fueron aún mayores en JIMT-1 en comparación con los de apoptosis tardía (a 25  $\mu\text{g/mL}$  la apoptosis tardía subió un 22,3%, y la apoptosis temprana se incrementó en un 28,7%). Estos resultados sugieren que el mecanismo implicado para la acción de este extracto es la muerte por apoptosis.

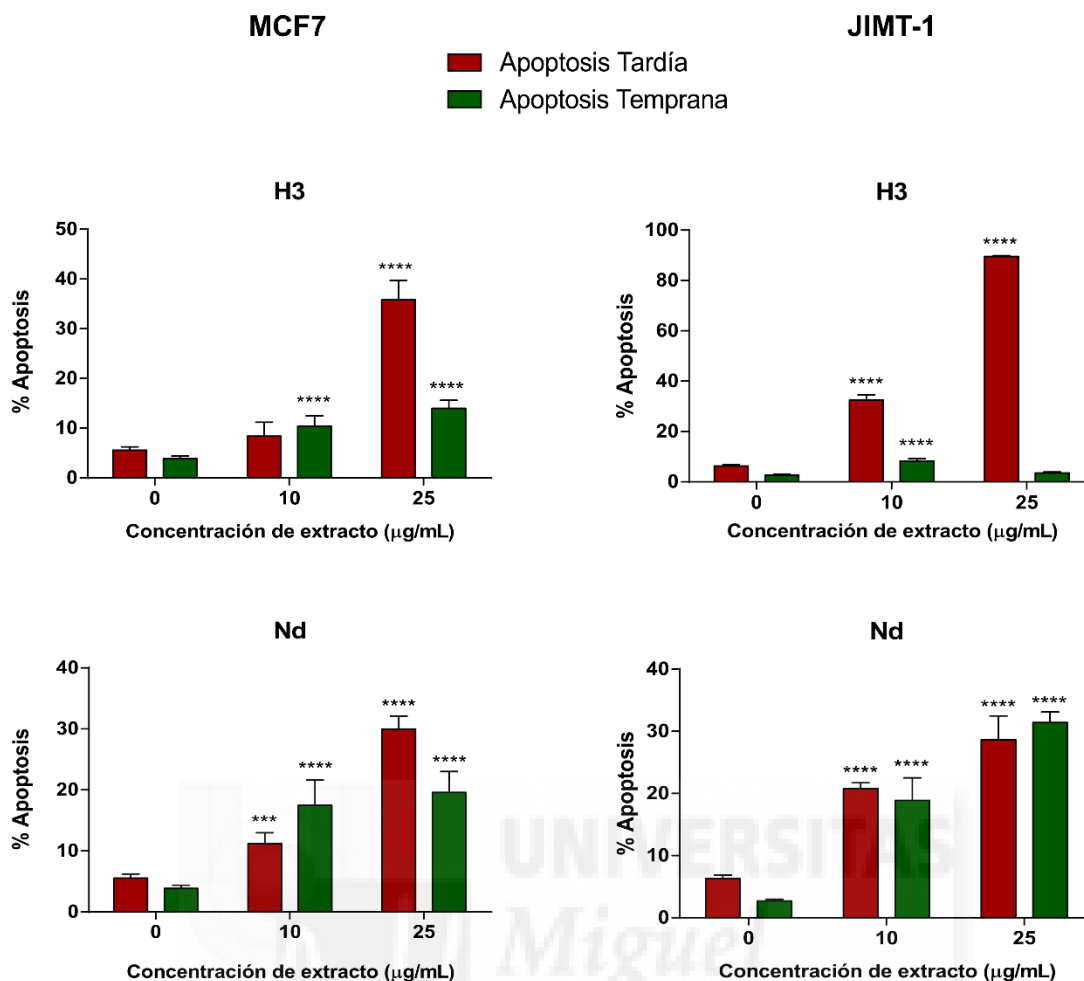


Fig. 15 – Efecto de los extractos H3 y Nd sobre los niveles de apoptosis de las líneas MCF7 (a la izquierda) y JIMT-1 (a la derecha), tras 24 h de incubación. La concentración '0' representa el control vehículo. Los porcentajes representados son promedios (n=5), y las barras de error muestran la SD. \*\*\* ( $p < 0,001$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control vehículo

#### 4.4.3 Determinación de la integridad de la membrana plasmática. ¿Necrosis?

Luego de la finalización del ensayo con Anexina-V, los registros obtenidos de apoptosis tardía y temprana tras los tratamientos con H3 y Nd parecían señalar a la necrosis como mecanismo citotóxico de H3, y a la apoptosis como un posible responsable del efecto antiproliferativo del extracto Nd. Sin embargo, se hizo necesaria la realización de otro ensayo que sirviera para contrastar estas hipótesis. Con este fin se procedió a realizar un ensayo de determinación de la liberación de la enzima LDH citosólica, ya que la permeabilización no selectiva de la membrana plasmática se produce cuando se compromete la integridad de esta, evento que acontece en situaciones necróticas. Por tanto, niveles altos de LDH en el medio extracelular suelen ser una buena prueba de necrosis celular.



Así pues, las células de MCF7 y JIMT-1 fueron tratadas con ambos extractos a 10 y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 24 h de incubación. Los porcentajes de liberación de LDH fueron hallados a nivel basal (control vehículo o negativo) y comparados con los registros de las poblaciones celulares tratadas (Fig. 16).

Como se observa en la Fig. 16, los resultados muestran que el **extracto H3** ocasionó un incremento significativo en la liberación de LDH al medio extracelular en la línea JIMT-1, llegando este a aumentar un 66,7% a la concentración máxima con respecto al control negativo. Por otro lado, aunque este aumento también fue significativo para MCF7, que experimentó casi un 11% más de liberación de LDH a 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , no fue tan drástico como en JIMT-1.

Por el contrario, los resultados para el **extracto Nd** señalaron que este extracto posee escasa capacidad alterando la integridad de la membrana plasmática y por consiguiente la liberación de LDH al medio extracelular es baja, a las concentraciones ensayadas. El aumento en la liberación fue, a la dosis máxima, de 3,9 % para JIMT-1, y de 0,5 % para MCF7.

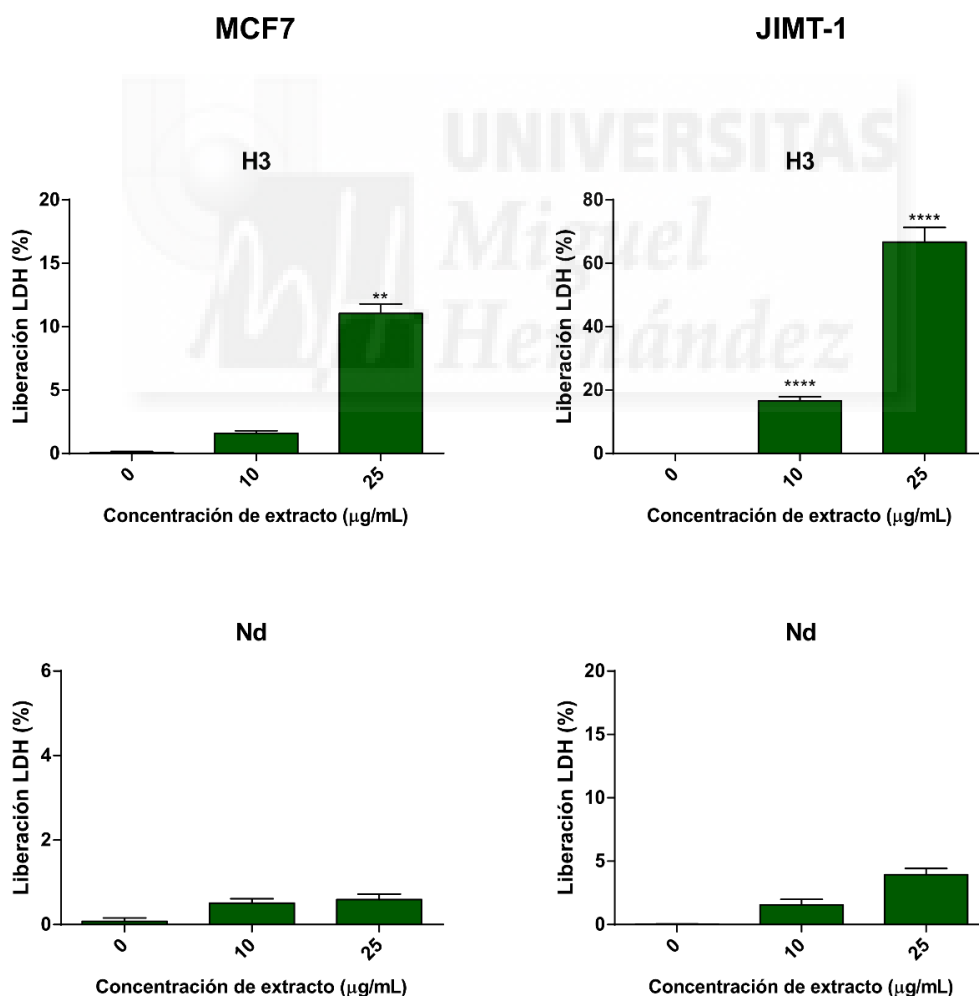


Figura 16 – Efecto de los extractos H3 y Nd sobre los niveles de liberación de LDH de las líneas MCF7 (a la izquierda) y JIMT-1 (a la derecha), tras 24 h de incubación. La concentración '0' representa el control vehículo. Los porcentajes representados son promedios ( $n=6$ ), y las barras de error muestran la SD. \*\* ( $p<0,01$ ) y \*\*\*\* ( $p<0,0001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control vehículo

Estos resultados confirman lo visto en el anterior apartado, es decir, que el mecanismo implicado en la acción citotóxica del extracto H3 es la necrosis, mientras que para el extracto Nd sería más probablemente la apoptosis.

## 5. Discusión

El medio ambiente marino representa aproximadamente el 70% del total de la superficie terrestre y se caracteriza por presentar una gran biodiversidad y, por tanto, un elevado grado de competencia entre las especies que lo habitan <sup>[28]</sup>. Estas condiciones son la combinación ideal para que se desarrollen múltiples estrategias de supervivencia, lo que se traduce en una amplia diversidad metabólica rica en compuestos bioactivos <sup>[34]</sup>. Por todas estas razones, el medio ambiente marino representa una importante fuente de compuestos naturales con potencial terapéutico <sup>[35]</sup>.

Uno de los fines terapéuticos más perseguidos en farmacología marina es el tratamiento contra el cáncer. A lo largo de los años, muchos han sido los compuestos bioactivos aislados de invertebrados marinos con capacidad antitumoral <sup>[28]</sup>. Algunos de estos compuestos han llegado a ser la base de diversos fármacos comerciales <sup>[29]</sup>, como el **mesilato de eribulina**, análogo de la halicondrina B aislada de esponjas marinas del género *Halichondria sp*, y utilizado para el tratamiento del cáncer de mama metastático.

Una estrategia preliminar muy empleada en la búsqueda de fármacos antitumorales a partir de invertebrados marinos es la realización de cribados de extractos sobre líneas celulares de cáncer, entre ellas líneas de cáncer de mama como MCF7 <sup>[36,37,38]</sup>. Diversos grupos de investigación han sido capaces de hallar extractos con capacidad citotóxica de esta manera, y de aislar los compuestos bioactivos responsables de su actividad <sup>[39]</sup>.

Dentro del proyecto NCI-60 financiado por el *US National Cancer Institute* (NCI), que constituyó una de las mayores bases de datos para el cribado de extractos y compuestos naturales en 60 líneas humanas de cáncer, se consideró como citotóxico todo extracto con una IC<sub>50</sub> menor de 20 µg/mL a las 48 h de incubación <sup>[37]</sup>. El presente estudio ha evaluado el efecto citotóxico de diez extractos de invertebrados marinos de diversa taxonomía, obteniendo para los extractos de *Colochirus robustus* (H3) y *Hexabranchnus sanguineus* (Nd) valores de IC<sub>50</sub> menores de 20 µg/mL ya a las 24 h de incubación, tanto en MCF7 como en JIMT-1. Así, a las 48 h de incubación, se registraron valores de IC<sub>50</sub> de 8,7 (MCF7) y 7,8 (JIMT-1) µg/mL para el extracto de *H. sanguineus*, y valores de 10,8 (MCF7) y 9,7 (JIMT-1) µg/mL, para el extracto de *C. robustus*, todos por debajo del valor de referencia del proyecto NCI-60.

Para un mismo extracto, estos valores no muestran una diferencia significativa en la actividad antiproliferativa en función de la línea celular, por lo que su capacidad citotóxica y el mecanismo de acción asociado a esta parecen mantenerse invariables para cada extracto independientemente de que el tipo celular sea MCF7 o JIMT-1.

*Colochirus robustus* es un equinodermo de la clase de las holoturias, que habita en aguas tropicales, mientras que *Hexabranchnus sanguineus* es un molusco gasterópodo del orden de los nudibranchios, de distribución amplia, presente en el mar Mediterráneo [33]. Dentro del género ***Colochirus sp*** se han aislado saponinas triterpenoides capaces de inhibir la proliferación celular de MCF7 con valores de IC<sub>50</sub> entre 0,6 y 3,95 µM, como el colochirósido A de *C. anceps* [40], o diferentes philipnósidos (A,E) y pentactásidos (I-III) de *C. quadrangularis* (*Pentacta quadrangularis*) [41,42]. Estos glicósidos triterpenoides son metabolitos secundarios muy característicos de todos los géneros de holoturias, con probada actividad citotóxica, además de hemolítica y antifúngica [42]. En cuanto a su capacidad antitumoral, diferentes estudios en ratones les han atribuido facultades para inhibir la angiogénesis o la metástasis. Los philipnósidos (A,E) han sido asociados *in vitro* e *in vivo* con mecanismos antiangiogénicos y apoptóticos [42].

Por otro lado, nuestros análisis de detección de LDH mostraron que a 25 µg/mL del extracto de *C. robustus*, la liberación de LDH citosólica aumentó un 66,7% con respecto al control negativo en JIMT-1. Este valor tan alto representa un marcador considerable de necrosis. En MCF7, el aumento en la liberación de LDH también fue significativo, llegando a incrementarse un 11% a 25 µg/mL. Además, los análisis hechos con Anexina-V sobre el extracto de *C. robustus* no registraron niveles elevados de apoptosis temprana con respecto a la apoptosis tardía/necrosis, lo que aleja a la apoptosis como mecanismo de acción citotóxico en este extracto, para ambas líneas tumorales.

Dicho todo lo anterior, podemos deducir que ciertos glucósidos hipotéticamente presentes también en *C. robustus* pueden ser los responsables de la acción citotóxica del extracto. No obstante, el mecanismo de acción de estos aún estaría lejos de comprenderse, ya que aunque los resultados obtenidos en el presente trabajo parecen relacionarlo con eventos de necrosis, las fuentes bibliográficas consultadas señalan a la apoptosis como mecanismo citotóxico de algunos glucósidos triterpenoides como los philipnósidos [42].

Por otra parte, ***Hexabranchnus sanguineus*** constituye una especie bastante estudiada. Desde hace años, se ha aislado de este organismo una serie de compuestos bioactivos, tales como las kabiramidas (A-C), diferentes análogos de halicondramida, o pequeños péptidos cíclicos como las sanguinamidas (A, B) [43]. Tanto las kabiramidas como la halicondramida son unos macrólidos trisoxazoles con probada actividad citotóxica, antifúngica y antibacteriana [44,45]. Estos macrólidos,

también presentes en diversos géneros de esponjas, parecen ser consecuencia de su dieta a base de estos organismos <sup>[43]</sup>. Además, en *H. sanguineus*, estos compuestos parecen transmitirse a la progenie, ya que se han encontrado también en sus huevos.

El mecanismo de acción por el cual estos compuestos ejercen su acción citotóxica y antiproliferativa se ha correlacionado con su capacidad para unirse a proteínas como la actina G o la actina F, provocando la desorganización de los microfilamentos y alterando mecanismos tan importantes para la proliferación celular como la citocinesis <sup>[44,45]</sup>. Otros compuestos macrólidos presentes en esponjas, como la halicondrina B, base del fármaco antitumoral mesilato de eribulina, tienen actividad contra otras proteínas del citoesqueleto, las tubulinas, lo que provoca alteraciones del huso mitótico de las células diana, y la consecuente inhibición de la división celular. Esta inhibición se ha correlacionado con efectos citostáticos que bloquean el ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>/M <sup>[46]</sup>, o efectos citotóxicos de apoptosis <sup>[47]</sup>.

Por último, se ha comprobado mediante diferentes ensayos *in vitro* que diferentes derivados de las sanguinamidas son capaces de inhibir la proliferación de células tumorales de colon (HCT-116), y de inhibir la síntesis proteica <sup>[48]</sup>.

Con respecto a nuestros resultados referentes al extracto de *H. sanguineus*, su capacidad antiproliferativa está muy relacionada con la apoptosis y el bloqueo del ciclo celular en G<sub>2</sub>/M, tal y como evidencian los ensayos con Anexina-V y los análisis del ciclo celular tanto en MCF7 como en JIMT-1. Por un lado, los análisis del ciclo celular indicaron aumentos significativos de células en fase Sub-G<sub>1</sub> con respecto a los controles negativos, tanto en MCF7 como en JIMT-1, a todas las concentraciones ensayadas de extracto. De otro lado, los ensayos con Anexina-V mostraron ratios positivos apoptosis temprana/ apoptosis tardía a 10 µg/mL del extracto de *H. sanguineus* en MCF7, y a 25 µg/mL en JIMT-1. Estas observaciones, sumadas a que los ensayos de detección de LDH dieron evidencias nulas de necrosis, establecen a la apoptosis como el mecanismo más probable de muerte celular. Finalmente, el análisis del ciclo celular sobre JIMT-1 señala un bloqueo significativo del ciclo en G<sub>2</sub>/M a 10 y 25 µg/mL de extracto. Estos efectos apoptóticos y citostáticos podrían atribuirse a la presencia de macrólidos inhibidores de la formación o reorganización de microfilamentos y microtúbulos <sup>[43,44,46,47]</sup>. Por tanto, tanto nuestros resultados como las fuentes bibliográficas consultadas ensalzan a la apoptosis y al bloqueo celular en fase G<sub>2</sub>/M como los mecanismos responsables de la capacidad antiproliferativa del extracto de *H. sanguineus*.

## 6. Conclusiones y proyección futura

En base a los resultados obtenidos podemos decir que:

- De entre todos los extractos de los organismos marinos cribados, los extractos de *H. sanguineus* y *C. robustus* fueron los que presentaron las capacidades citotóxicas más relevantes, tal y como indican sus valores de IC<sub>50</sub> en MCF7 y JIMT-1 (7,8-10,8 µg/mL a 48 h).
- El extracto de *C. robustus* parece deber su actividad antiproliferativa a un mecanismo de muerte celular que iría por la vía necrótica, sobre todo en JIMT-1. Según fuentes bibliográficas la citotoxicidad de este extracto podría deberse a glucósidos triterpenoides muy presentes en diferentes géneros de holoturias. Sin embargo, su modo de acción debe estudiarse más profundamente.
- El extracto de *H. sanguineus* muestra un efecto citotóxico apoptótico en MCF7 y JIMT-1 que se acompaña de un efecto citostático mediante el bloqueo del avance del ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>/M contra JIMT-1. Tales efectos podrían estar atribuidos a compuestos macrólidos que podrían estar presentes en el extracto y cuyo origen parece deberse a la dieta del organismo, y a otro tipo de compuestos peptídicos como las sanguinamidas.

Se proponen las siguientes estrategias de investigación a corto y medio plazo para intentar comprender más a fondo el modo de acción antiproliferativo de estos extractos y su aplicación frente a modelos celulares de cáncer de mama:

- Estudio de la selectividad del efecto antiproliferativo frente a líneas celulares de cáncer de mama.
- Análisis de la composición bioquímica de los extractos mediante HPLC acoplado a detección de masas, para hallar los componentes mayoritarios y así buscar los compuestos bioquímicos responsables de su citotoxicidad, y compararlos con la bibliografía estudiada.
- Realización de ensayos con inhibidores de la autofagia y la necroptosis con el fin de descartar la implicación de estos mecanismos de muerte celular en el efecto citotóxico de los extractos.
- Análisis de rutas enzimáticas involucradas en procesos de apoptosis y necrosis y búsqueda de relaciones entre estas y los extractos.

## 7. Referencias

1. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., et al. "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012". *International Journal of Cancer*. 2015; 136(5):E359-E386.
2. Flamme I., Frölich T., Risau W. "Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis". *Journal of cellular physiology*. 1997; 173:206-210.
3. Klein C.A. "Cancer. The metastasis cascade". *Science*. 2008; 321 (5897):1785-1787.
4. Garnis C., PH Buys T., Lam W.L. "Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression". *Molecular Cancer*. 2004; 3:9.
5. Dick J.E. "Stem cell concepts renew cancer research". *Blood*. 2008; 112:4793-4807.
6. Dricu, A., et al. "Cancer Stem Cells: Biological Functions and Therapeutically Targeting". *International Journal of Molecular Sciences*. 2014; 15(5): 8169-8185.
7. Hanahan D, Weinberg RA. "Hallmarks of cancer: the next generation". *Cell*. 2011; 144 (5): 646-674.
8. LeMaire-Adkins R., Radke K., Hunt P.A. "Lack of checkpoint control at the metaphase/anaphase transition: a mechanism of meiotic nondisjunction in mammalian females". *The Journal of Cell Biology*. 1997; 139 (7): 1611-1619.
9. Keaton M.A. "Review of "The Cell Cycle: Principles of Control" by David O. Morgan". *Cell division*. 2007; 2:27.
10. Elledge S.J. "Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis". *Science*. 1996; 274 (5293): 1664-1672.
11. Surget S., Khoury M.P., Bourdon J.C. "Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective". *OncoTargets and Therapy*. 2013; 7: 57-68.
12. Sotiriou C., Pusztai L., et al. "Gene-expression signatures in breast cancer". *The New England Journal of Medicine*. 2009; 360 (8): 790-800.
13. Romond E.H., Perez E.A., Wolmark N. et al. "Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer". *The New England Journal of Medicine*. 2005; 353 (16): 1673-1684.
14. Thuy V., Francois X. C. "Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer". *Frontiers in Oncology*. 2012. doi.org/10.3389/fonc.2012.00062.
15. Asociación Española Contra el Cáncer. Sitio web. Inicio > Sobre el cáncer > Cáncer por localización > Cáncer de mama > Factores de riesgo. Obtenido el 5 de mayo de 2017.
16. Gage M., Wattendorf D., Henry L.R. "Translational advances regarding hereditary breast cancer syndromes". *Journal of surgical oncology*. 2012; 105 (5): 444-451.
17. Asociación Española Contra el Cáncer. Sitio web. Inicio > Sobre el cáncer > Cáncer por localización > Cáncer de mama > Diagnóstico. Obtenido el 5 de mayo de 2017.
18. Elmore S. "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death". *Toxicologic Pathology*. 2007; 35 (4): 495-516.
19. Haupt S., Berger M., Goldberg Z., Haupt Y. "Apoptosis - the p53 network". *Journal of Cell Science*. 2003; 116: 4077-4085.
20. Fesik S.W., Shi Y. "Controlling the caspases". *Science*. 2001; 294 (5546): 1477-1478.
21. Proskuryakov, S. Y., Konoplyannikov, A. G., Gabai, V. L. "Necrosis: A specific form of programmed cell death?". *Experimental Cell Research*. 2003; 283 (1): 1-16.

22. Newman, D.J. and G.M. Cragg. "Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years". *Journal of Natural Products*. 2007; 70 (3): 461-477.
23. Dang, V.T., et al. "Marine Snails and Slugs: a Great Place To Look for Antiviral Drugs". *Journal of Virology*. 2015; 89(16): 8114-8118.
24. Desbois, A.P., A. Mearns-Spragg, and V.J. Smith. "A fatty acid from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)". *Marine Biotechnology*. 2009; 11(1): 45-52.
25. Plaza, A., et al. "Celebesides A-C and theopapuamides B-D, depsipeptides from an Indonesian sponge that inhibit HIV-1 entry". *Journal of Organic Chemistry*. 2009; 74(2): 504-512.
26. Nuijen, B., et al. "Pharmaceutical development of anticancer agents derived from marine sources". *Anticancer Drugs*. 2000; 11(10): 793-811.
27. Asolkar, R.N., et al. "Arenamides A-C, cytotoxic NFkappaB inhibitors from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*". *Journal of Natural Products*. 2009; 72(3): 396-402.
28. Ruiz-Torres, V., Micol, V., et al. "Review: An Updated Review on Marine Anticancer Compounds: The Use of Virtual Screening for the Discovery of Small-Molecule Cancer Drugs". *Molecules*. 2017; 22(7): 1037.
29. Mudit, M. and K.A. El Sayed. "Cancer control potential of marine natural product scaffolds through inhibition of tumor cell migration and invasion". *Drug discovery today*. 2016; 21(11): 1745-1760.
30. Avilés, P., et al. "Abstract 2480: MI130004, a new antibody-drug conjugate, induces strong, long-lasting antitumor effect in HER2 expressing breast tumor models." *Cancer Research*. 2015; 75(15): 2480.
31. Saikia, S., et al. "Marine steroids as potential anticancer drug candidates: In silico investigation in search of inhibitors of Bcl-2 and CDK-4/Cyclin D1". *Steroids*. 2015; 102: 7-16.
32. Haefner, B. "Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates". *Drug Discovery Today*. 2003; 8(12): 536-44.
33. <http://marinespecies.org/>
34. Pomponi, S.A. "The bioprocess-technological potential of the sea. *Journal of Biotechnology*". 1999; 70(1-3): 5-13.
35. Williams, P.G. "Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics". *Trends in Biotechnology*. 2009; 27(1): 45-52.
36. Ferreira, M., et al. "Cytotoxic activity of extracts of marine sponges from NW Spain on a neuroblastoma cell line". *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2011; 32(3): 430-437.
37. Beedessee, G., et al. "Cytotoxic activities of hexane, ethyl acetate and butanol extracts of marine sponges from Mauritian Waters on human cancer cell lines". *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2012; 34(2): 397-408.
38. Mahdian, D., et al. "Cytotoxicity evaluation of extracts and fractions of five marine sponges from the Persian Gulf and HPLC fingerprint analysis of cytotoxic extracts". *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2015; 5(11): 896-901.
39. Mayer, A., Gustafson, K. "Mini Review: Marine Pharmacology in 2000: Antitumor and Cytotoxic Compounds". *International Journal of Cancer*. 2003; 105: 291-299.

40. Cuong, N. X., et al. "Cytotoxic triterpene saponins from *Cercodemas anceps*". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2015; 25(16): 3151-3156.
41. Gomes A. R., et al. "Echinoderms: A Review of Bioactive Compounds With Potential Health Effects". *Studies in Natural Products Chemistry*. 2016; 49: 1-54.
42. Aminin, D. L., et al. "Review: Anticancer Activity of Sea Cucumber Triterpene Glycosides". *Marine Drugs*. 2015; 13: 1202-1223.
43. Molinski F., et al. "Structure Elucidation at the Nanomole Scale. 1. Trisoxazole Macrolides and Thiazole-Containing Cyclic Peptides from the Nudibranch *Hexabranhus sanguineus*". *Journal of Natural Products*. 2009; 72: 732-738.
44. Chung, S., et al. "Actin depolymerizing effect of trisoxazole-containing macrolides". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011; 21(11): 3198-3201.
45. Higa T., Tanaka J. "Bioactive marine macrolides". *Studies in Natural Products Chemistry*. 1996; 19: 549-626.
46. Simmons T. L., et al. "Marine natural products as anticancer drugs". *Molecular Cancer Therapeutics*. 2005; 4(2): 333-342.
47. Kittakoop P. "Anticancer Drugs and Potential Anticancer Leads Inspired by Natural Products". *Studies in Natural Products Chemistry*. 2015; 44: 251-307.
48. Pietkiewicz, A. L., et al. "Synthesis of macrocycles that inhibit protein synthesis: stereochemistry and structural based studies on sanguinamide B derivatives". *Tetrahedron Letters*. 2014; 55: 6979-6982.

