

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**“AISLAMIENTO DE MICROALGAS DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN
CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL CONTRA EL LINFOMA
MURINO L5178Y-R”**

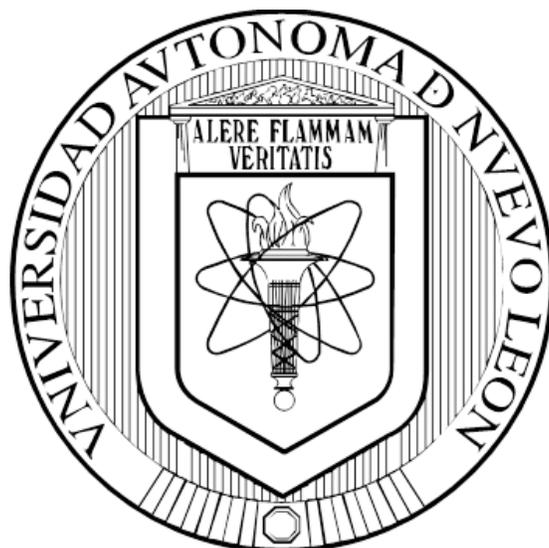
POR

GUSTAVO RAÚL REYNA MARTÍNEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

MARZO, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**“AISLAMIENTO DE MICROALGAS DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN
CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL CONTRA EL LINFOMA
MURINO L5178Y-R”**

POR

GUSTAVO RAÚL REYNA MARTÍNEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

MARZO, 2017

El desarrollo experimental del presente trabajo se llevó a cabo en la unidad de Formulación de Biológicos, en la Unidad de Inmunobiología y Acarreadores de Drogas y en el laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas, así como en el Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales de la Facultad de Ciencias Químicas, dichas unidades de investigación se encuentran en las instalaciones de Ciudad Universitaria de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

**“AISLAMIENTO DE MICROALGAS DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN CON
ACTIVIDAD ANTITUMORAL CONTRA EL LINFOMA MURINO L5178Y-R”**

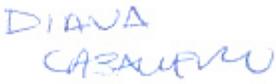
**Aprobado por el
Comité de Tesis**



Directora
Dra. Patricia Tamez Guerra



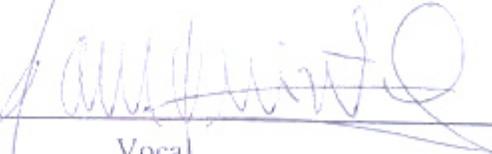
Director Externo
Dr. Ulrico Javier López Chuken



Secretaria
Dra. Diana Elia Caballero Hernández



Vocal
Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores



Vocal
Dr. Ramiro Quintanilla Licea



Vocal
Dr. Carlos Hernández Luna

DEDICATORIA

A mi familia, en especial a mi Madre Ma. Guadalupe Martínez

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Doctora Patricia Tamez Guerra y al Doctor Ulrico Javier López quienes fungieron como mis asesores de tesis y en todo momento proporcionaron su apoyo incondicional para llevar a cabo este trabajo de investigación, así como a los doctores Ricardo Gómez, Ramiro Quintanilla, Diana Caballero y Carlos Hernández Luna por haber formado parte del comité de tesis y haber aportado siempre valiosas sugerencias y revisiones del presente trabajo.

A todo el personal de la Unidad de Formulación de Biológicos, la Unidad de Inmunobiología y Acarreadores de Drogas y del Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales, por todo el apoyo en la realización del presente trabajo, así como por compartir su experiencia y conocimiento con un servidor, haciendo especial mención a Enriqueta Monreal Cuevas quien desempeña una importante labor en el desarrollo de todos los proyectos relacionados a la Unidad de Formulación de Biológicos y a la Unidad de Inmunología y Acarreadores de Drogas, así como a Julio César Beltrán quien brinda gran apoyo a todos los tesisistas del LICA.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. por las facilidades del uso de sus instalaciones durante parte de la transición de Laboratorio, así como por el apoyo brindado durante y después de los incidentes ocurridos en el transcurso de este proyecto.

A todos mis amigos y compañeros de laboratorio quienes hicieron mi estancia amena y placentera durante estos años en la Facultad de Ciencias Biológicas.

A mi familia, quien siempre ha brindado todo de su parte para mi desarrollo profesional y que han hecho posible la realización de esta meta.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	16
2. HIPÓTESIS	18
3. OBJETIVO GENERAL	19
4. OBJETIVOS PARTICULARES	19
5. ANTECEDENTES	20
5.1 MICROALGAS	20
5.1.1 Cultivo de microalgas	21
5.1.2 Aplicaciones terapéuticas de las microalgas	24
5.2 CÁNCER	25
5.1.2 Línea Celular Murina L5178Y-R	26
5.3 MICROALGAS Y CÁNCER	27
6. MATERIAL Y MÉTODOS	30
6.1 COLECTA, AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MICROALGAS	30
6.2 ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LAS MICROALGAS CONTRA LA LÍNEA TUMORAL L5178Y-R	32
6.2.1 Mantenimiento <i>in vitro</i> de la línea tumoral	32
6.2.2 Evaluación de la actividad citotóxica <i>in vitro</i> de los extractos acuosos	32

6.3 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS CRUDOS DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>Chlorella</i> sp. Y <i>Scenedesmus</i> sp.	34
6.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LOS EXTRACTOS DE MICROALGAS OBTENIDOS A ESCALA DE LABORATORIO	35
6.5 ESCALAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA	36
6.5.1 Preparación e inoculación de los biorreactores	36
6.5.2 Monitoreo del escalamiento	39
6.5.3 Colecta y concentración de la biomasa	40
6.6 EXTRACCIÓN METANÓLICA POR MÉTODO SOXHLET	40
6.7 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE MICROALGAS OBTENIDO A ESCALA SEMI-PILOTO	42
6.7.1 Evaluación de la actividad citotóxica <i>in vitro</i> de los extractos metanólicos obtenidos por el método Soxhlet	42
6.7.2 Determinación de apoptosis por medio de tinción con naranja de acridina/bromuro de etidio de los extractos metanólicos contra de la línea L5178Y-R	42
6.7.3 Determinación de apoptosis por análisis de fragmentación del	43

ADN	
6.7.4 Evaluación de la actividad linfoproliferativa de los extractos metanólicos en contra de linfocitos de timo de ratón	44
6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	45
7. RESULTADOS	46
7.1 COLECTA, AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MICROALGAS	46
7.2 ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE MICROALGAS CONTRA LA LÍNEA TUMORAL L5178Y-R	48
7.3 NUEVA COLECTA, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE MICROALGAS DE LOS GÉNEROS <i>Chlorella</i> sp. Y <i>Scenedesmus</i> sp.	49
7.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA <i>IN VITRO</i> DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE <i>Chlorella</i> sp. Y <i>Scenedesmus</i> sp.	50
7.5 ESCALAMIENTO Y PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN BIORREACTORES DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>Chlorella</i> sp. Y <i>Scenedesmus</i> sp.	52
7.5.1 Monitoreo del escalamiento	52
7.5.2 Colecta y concentración de la biomasa	54

7.6 ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL EXTRACTOMETANÓLICO DE MICROALGAS OBTENIDO A ESCALA SEMI-PILOTO	54
7.6.1 Evaluación de la actividad citotóxica <i>in vitro</i> del extracto metanólico obtenido por método Soxhlet	54
7.7 ACTIVIDAD APOPTÓTICA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE MICROALGAS VS L5178Y-R	56
7.7.1 Actividad apoptótica de los extractos metanólicos de microalgas por medio de tinción con de Naranja de Acridina y Bromuro de etidio	56
7.7.2 Actividad apoptótica de los extractos metanólicos por medio de electroforesis en gel de Agarosa	57
7.8 ACTIVIDAD LINFOPROLIFERATIVA DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS EN CONTRA DE LINFOCITOS DE TIMO DE RATÓN	58
8. DISCUSIÓN	61
9. CONCLUSIONES	64
10. PERSPECTIVAS	65
11. LITERATURA CITADA	66

APÉNDICE A, LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	73
APÉNDICE B, PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO	74

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Comparación de los distintos tipos de cultivos de microalgas	23
II. Descripción de la línea celular L5178Y	26
III. Locaciones, género y fotografías de microalgas aisladas.	46
IV. IC ₅₀ de los extractos acuosos	48
V. Identificación y locaciones de los nuevos aislamientos de microalgas	50
VI. Porcentaje de citotoxicidad de los extractos metanólicos de <i>Chlorella</i> sp. y <i>Scenedesmus</i> sp.	51
VII. Porcentajes de citotoxicidad de los extractos metanólicos obtenidos vía soxhlet de los aislamientos de <i>Chlorella</i> sp y <i>Scenedesmus</i> sp, en contra de la línea L5178Y-R.	55
VIII. Efecto de los extractos metanólicos de <i>Chlorella</i> sp. y <i>Scenedesmus</i> sp sobre la viabilidad de linfocitos de timo <i>in vitro</i> .	59

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Linfoma L5178Y-R	27
2. Biorreactores montados, con iluminación LED, flujo de aire filtrado y recubrimiento de aluminio, previo a la inoculación	37
3. Biorreactores montados e inoculados con los aislamientos de <i>Chlorella</i> sp. y <i>Scenedesmus</i> sp.	38
4. Biorreactores en los cuales ya se observa crecimiento de los aislamientos de <i>Chlorella</i> sp. y <i>Scenedesmus</i> sp.	38
5. Filtrado de una de las alícuotas a través de la microfibras de 0.7 micras previamente pesada.	39
6. Filtros de microfibras reteniendo la biomasa contenida en las alícuotas	40
7. Extractor Soxhlet	41
8. Rotaevaporador Büchi R - 3000	42
9. Citotoxicidad de los extractos acuosos de microalgas	49

10. Citotoxicidad <i>in vitro</i> de los extractos metanólicos de <i>Chlorella</i> sp. y <i>Scenedesmus</i> sp.	51
11. Monitoreo del escalamiento del aislamiento de <i>Chlorella</i> sp. 3	53
12. Monitoreo del escalamiento del aislamiento <i>Scenedesmus</i> sp. 5	53
13. Citotoxicidad de los extractos metanólicos obtenidos vía soxhlet de los aislamientos de <i>Chlorella</i> sp. 3 y <i>Scenedesmus</i> sp. 5 en contra de la línea L5178Y-R.	55
14. Porcentaje de células L5178Y-R vivas, en apoptosis y en necrosis, posterior al tratamiento con extractos metanólicos	57
15. Gel de agarosa con ADN proveniente de la línea L5178Y- R después del tratamiento con extractos metanólicos	58
16. Efecto del extracto metanólicos de <i>Chlorella</i> sp. sobre la viabilidad de células de timo en presencia y ausencia del mitógeno	60
17. Efecto del extracto metanólicos de <i>Scenedesmus</i> sp. sobre la viabilidad de células de timo en presencia y ausencia del mitógeno.	60

RESUMEN

Las algas son organismos simples, unicelulares y fotosintéticos que en estudios recientes han demostrado una gran capacidad para sintetizar compuestos tales como carotenoides, lactonas, proteínas, polisacáridos sulfatados entre otros, los cuales han presentado actividad biológica *in vitro* e *in vivo* en contra de distintas líneas celulares de cáncer. Se estima que existen más de 50 000 especies de estos organismos, sin embargo menos del 10% ha sido estudiado a detalle. Las microalgas nativas del estado de Nuevo León representan en potencia una fuente no explotada de nuevas moléculas con actividad biológica. Por otro lado, el cáncer hoy en día es causante de alrededor del 13% de las muertes en el mundo. Los tratamientos actuales presentan resistencia tumoral y efectos secundarios severamente nocivos para los pacientes, por lo cual es necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas. En el presente estudio se determinó la actividad inhibitoria *in vitro* en contra de la línea celular L5178Y-R de linfoma murino, por los extractos orgánicos crudos de aislamientos de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. presentes en el estado de Nuevo León, obteniendo resultados positivos con los extractos metanólicos de 2 aislamientos. Posteriormente se escaló su producción de biomasa a nivel semi-piloto para obtener mayor cantidad de extractos metanólicos, con el cual se evaluó la actividad apoptótica y linfoproliferativa *in vitro* contra la línea celular de linfoma murino L5178Y-R. Con esto pretendemos contribuir al conocimiento de la biodiversidad y potencial terapéutico de las microalgas presentes en el estado de Nuevo León.

Palabras Clave: Microalgas, *Chlorella*, *Scenedesmus*, Producción, Escalamiento, Cáncer, Linfoma murino.

Abstract

Cancer today accounts for about 13% of all deaths in the world. Current treatments present severely harmful side effects to patients, therefore searching for therapeutic alternatives is necessary. Microalgae are simple, unicellular and photosynthetic organisms that have shown capacity to synthesize compounds which have been associated with biological activity *in vitro* and *in vivo* against different cancer cell lines. The native microalgae from Nuevo Leon state, Mexico, represent an unexploited source of new molecules with biological activity. In the present study *in vitro* assays testing Nuevo Leon state native *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. crude organic extracts resulted in cytotoxicity against the murine lymphoma cell line L5178Y-R. Further test demonstrated a higher L5178Y-cytotoxicity by methanolic extracts from both isolates. Evaluating the mode of action and safety of *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. methanolic extracts, both apoptotic and lymphoproliferative activity were tested *in vitro* against the murine lymphoma cell line. Methanolic extracts-treated cells display an apoptosis pattern whereas no lympho-proliferation activity was observed. Overall, this study contributes to the Nuevo Leon microalgae biodiversity knowledge and their therapeutic potential against lymphoma.

Key words

Microalgae, mouse lymphoma, cytotoxicity, apoptosis, lymphoproliferation.

1. INTRODUCCIÓN

Las microalgas son los organismos más simples y primitivos presentes en el planeta, se encuentran en el fondo de la cadena alimenticia, son unicelulares y fotosintéticos, pueden ser procariotas o eucariotas y se encuentran distribuidos en nichos acuáticos y terrestres en todo el mundo dado que se adaptan fácilmente a condiciones de estrés ambiental como temperaturas extremas, alta presión osmótica y exposición a rayos UV. Sin embargo, para fines prácticos estas suelen obtenerse de ambientes acuáticos, donde son abundantes y existen menos microorganismos (bacterias, hongos, levaduras) que compliquen su aislamiento (Guedes y col., 2011). Se estima que existen cerca de 50,000 especies de las cuales menos del 10% han sido identificadas y caracterizadas. La colección más grande de estos organismos se encuentra en la Universidad de Coímbra en Portugal y cuenta con cerca de 4,000 cepas registradas (Mata y col., 2010).

Este grupo de microorganismos es extremadamente diverso y representa una gran cantidad de recursos sin explotar, además combinan, de una manera balanceada, algunas propiedades de las plantas, como la capacidad de realizar fotosíntesis. Otra ventaja es que únicamente necesitan nutrientes simples y agua, además de condiciones de producción biotecnológicas generales para los microorganismos, son de crecimiento rápido y acumulan y secretan metabolitos secundarios.

La mayoría de los fármacos que se consumen en la actualidad son derivados sintéticos obtenidos a partir de productos naturales ,o son resultado del cribado sistemático de organismos terrestres, tales como plantas o microorganismos. Dentro de estos últimos, se inició el análisis de las moléculas bioactivas presentes en organismos acuáticos (Borowitzka, 1995). Se ha demostrado que las microalgas tienen la capacidad de sintetizar una gran cantidad de compuestos bioactivos, incluyendo pigmentos, esteroides, polifenoles, ácidos grasos, proteínas, vitaminas, alcaloides y polisacáridos sulfatados; estos compuestos han mostrado actividades antivirales, antimicrobianas, inmunomoduladoras y antitumorales (Lordan y col., 2011; Teas e Irhimeh, 2012).

El potencial del material biológico a analizar en busca de las actividades antes descritas se determina evaluando inicialmente los extractos crudos extraídos con solventes de distinta polaridad, para después continuar con una purificación de los compuestos a partir del fraccionamiento de los extractos. Posteriormente se analiza la estructura química de los compuestos por medio de técnicas que incluyen la cromatografía, la espectroscopía de masas, la resonancia magnética nuclear y la cristalografía de rayos X (Cowan, 1999).

Por su parte, podemos definir al cáncer como el resultado de alteraciones en una célula propia que ha escapado a los mecanismos de regulación por lo que ha modificado su potencial de crecimiento, su respuesta a los mecanismos de control y su función, por lo tanto esta célula producirá clonas con el mismo problema hasta alcanzar un número considerable y convertirse en un tumor maligno que representa un crecimiento tisular progresivo e invasor (Qian y col., 2001; Goldsby y col., 2002). Hoy se cuenta con fármacos que se utilizan para el tratamiento del cáncer; sin embargo, dada la resistencia de esta enfermedad a muchos de estos y debido a los efectos secundarios, la industria farmacéutica se encuentra en una constante búsqueda de nuevas moléculas con actividad biológica que puedan utilizarse como fármacos de nueva generación.

En este trabajo se escaló la producción de biomasa de las cepas de alta capacidad de producción, para posteriormente extraer e identificar las moléculas bioactivas que presenten actividad antitumoral contra la línea celular de linfoma murino *in vitro*.

2. HIPÓTESIS

Las microalgas presentes en los cuerpos de agua de Nuevo León producen compuestos con actividad antitumoral bajo condiciones de laboratorio y su producción puede ser escalada a nivel semi-piloto.

3. OBJETIVO GENERAL

Aislar, identificar y tamizar la actividad antitumoral de 20 microalgas presentes en cuerpos de agua de Nuevo León, seleccionar aquellas con actividad biológica, escalar su producción de biomasa a nivel semi-piloto y evaluar su efecto citotóxico, apoptótico y linfoproliferativo *in vitro* contra la línea L5178Y-R.

4. OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Aislar, purificar e identificar 20 microalgas procedentes de cuerpos de agua de Nuevo León
2. Determinar el efecto antitumoral *in vitro* de los extractos de los aislamientos en contra de la línea L5178Y-R de linfoma murino.
3. Escalar la producción de biomasa de los aislamientos con efecto antitumoral y obtener mayor cantidad de extractos para ensayos biológicos.
4. Determinar el efecto citotóxico, apoptótico y linfoproliferativo *in vitro* de los extractos orgánicos crudos más eficaces contra la línea L5178Y-R de linfoma murino.

5. ANTECEDENTES

5.1 MICROALGAS.

Las algas unicelulares o microalgas son los organismos más primitivos y simples del reino de las plantas, formadas en su mayoría por células de entre 3 y 20 micrómetros, presentes en todos los ecosistemas terrestres y acuáticos; se encuentran en locaciones que van desde aguas termales hasta glaciares (Lordan y col., 2011). Pueden ser eucariotas o procariotas y son capaces de realizar fotosíntesis. Se han encontrado registros fósiles que indican que estos organismos han existido en la tierra desde hace aproximadamente 3500 millones de años y se cree que son los responsables de la actual atmosfera rica en oxígeno (Chlipala y col., 2011).

El término alga está desprovisto de significado taxonómico. Hoy en día se utiliza para referirse a diversos organismos autótrofos de organización sencilla que llevan a cabo fotosíntesis oxigénica. Ha sido difícil establecer un sistema homogéneo de clasificación para las microalgas, debido a que su taxonomía se actualiza constantemente, sin embargo se puede mencionar que se clasifican basándose en los siguientes criterios: tipos de pigmentos, naturaleza química de los productos que utilizan como reserva de energía, modo de reproducción y constituyentes de la pared celular, además de características morfológicas (Aguirre-Cavazos, 2013).

Existen más de 50,000 especies de algas de las cuales menos del 10% han sido completamente caracterizadas. La colección más grande de estas se encuentra en la Universidad de Coímbra (Portugal) con más de 4,000 cepas registradas (Mata y col., 2010). En México, los estudios taxonómicos registran más de 837 taxa, de ellos 15 taxa intraespecíficos corresponden a *Pediastrum* y 60 de *Scenedesmus* en 24 localidades de la Ciudad de México, Estado de México, Veracruz, Puebla y Jalisco. A lo largo del territorio mexicano se encuentran cerca de 12 mil cuerpos de agua con diferentes climas, cuencas, vegetación y topografía entre otros factores, lo que favorece el desarrollo de una alta diversidad algal (Garduño-Solorzano y col., 2011).

Las algas unicelulares destacan entre los microorganismos como una alternativa conveniente para la producción de metabolitos secundarios, debido a que muchas de éstas se pueden cultivar en fotobiorreactores en los cuales sólo requieren energía solar, agua, minerales y aire o CO₂ para crecer y producir toda una gama de productos de interés para el ser humano. Las microalgas son los organismos fotosintéticos más eficientes fijando hasta 1.8 Kg de CO₂ por kilogramo de biomasa, incorporándolo al ciclo de Calvin y utilizándolo como fuente de carbono, con lo cual a su vez mitigan los efectos generados por la quema de combustibles fósiles y reducen la generación del efecto invernadero, liberan una gran cantidad de oxígeno al medio ambiente, tienen un ciclo de vida muy corto en el cual en 24 h o menos pueden llegar a duplicar su biomasa y ocupan poco espacio para su producción (Rodolfi y col., 2009).

Las algas y microalgas en los últimos años juegan un papel muy importante en la economía mundial, ya que se estima que las ganancias de esta industria facturan cerca de 5000 millones de dólares al año. La tecnología que utiliza microalgas ha mostrado avances técnicos y biotecnológicos en años recientes, por lo cual se están reevaluando sus posibles aplicaciones en agricultura, acuicultura, cosméticos, alimentos e industria farmacéutica (Pulz, 2001). Aunado a lo anterior, las algas pueden ser cultivadas en agua de mar o aguas residuales de descargas industriales, reduciendo así el consumo de agua potable en procesos industriales e incluso diezmando los impactos ambientales generados por las descargas de las industrias, al reducir contaminantes en dichos efluentes acuosos (Loera-Quezada y Olguín, 2010).

5.1.1 Cultivo de microalgas.

Los factores determinantes en la productividad de un cultivo de microalgas son la temperatura, el pH, los nutrientes del medio y la luz que incide sobre cada célula. El crecimiento, rendimiento y composición de las microalgas se ven alterados por las condiciones de cultivo de éstas; existen cuatro tipos principales de cultivo para dichos organismos incluyendo fotótrofo, autótrofo, mixótrofo y fotoheterótrofo (Chen y col., 2011).

El cultivo fotótrofo se da cuando las microalgas crecen utilizando luz como fuente de energía y una fuente inorgánica de carbón (generalmente CO₂). Este tipo de cultivo es el más utilizado para el crecimiento de microalgas (Chen y col., 2011).

Algunas algas pueden además utilizar como energía, fuentes orgánicas de carbón (glucosa, fructuosa, acetato, glicerol, etc.) en condiciones de oscuridad, a este tipo de condición se le llama cultivo heterótrofo y principalmente se utiliza cuando se busca aumentar la producción de lípidos en las microalgas. Además algunas cepas aumentan drásticamente su producción de biomasa cuando se usa este tipo de cultivo (Chen y col., 2011).

Cuando las microalgas se cultivan con una fuente de luz, se les proporciona CO₂ y además se adicionan con una fuente de carbón orgánico, se dice que el cultivo es mixótrofo. En este tipo de cultivo el mismo CO₂ liberado por el metabolismo del carbón orgánico es reutilizado por las algas. Este tipo de cultivo es poco utilizado salvo en ocasiones en las que se requieren de ciertas vías metabólicas para la producción de metabolitos específicos de interés (Chen y col., 2011).

El cultivo fotoheterótrofo se presenta cuando las microalgas requieren tanto de luz como de una fuente orgánica de carbón, este tipo de cultivo es el menos utilizado y se realiza sólo cuando la cepa con la que se trabaja requiere tanto de una fuente de luz y una fuente de carbón orgánico (Chen y col., 2011).

El cultivo de las microalgas puede a su vez clasificarse en otros dos tipos de métodos para su cultivo y producción los cuales son estanques abiertos y biorreactores cerrados. Los estanques abiertos se utilizan cuando se realiza un cultivo fotótrofo, ya que este tipo de tecnología es muy económica debido a que utiliza la luz solar como fuente de energía y con algunas cepas se puede obtener una alta producción de biomasa, sin embargo el riesgo de contaminación por microorganismos indeseados es muy alto. Por su parte el uso de biorreactores cerrados presenta como ventaja la baja incidencia de contaminación por microorganismos presentes en el medio ambiente, sin embargo tanto el diseño del reactor,

como la fuente de luz pueden hacer más costoso este cultivo. A continuación se muestra una Tabla que resume los tipos de cultivo de microalgas (Chen y col., 2011).

Tabla I. Comparación de los distintos tipos de cultivos de microalgas.

Condición del cultivo	Fuente de energía	Fuente de carbón	Densidad celular	Escalamiento del reactor	Costo	Problemas asociados al escalamiento del reactor
Fotótrofo	Luz	Inorgánica	Baja	Estanque abierto o fotobiorreactor.	Bajo	Baja densidad celular, alto costo para concentrar biomasa, contaminación.
Heterótrofo	Orgánica	Orgánica	Alta	Fermentador convencional	Medio	Alto costo de los sustratos.
Mixótrofo	Luz y orgánica	Inorgánica y orgánica	Media	Fotobiorreactor cerrado	Alto	Alto costo de los equipos y alto costo de los sustratos.
Fotoheterótrofo	Luz	Orgánica	Media	Fotobiorreactor cerrado	Alto	Alto costo de los equipos y alto costo de los sustratos

Tomado de Chen y col., 2011

Hasta hace apenas unos años el cultivo en estanques abiertos era el principal método de cultivo de microalgas, sin embargo la obtención de productos provenientes de las microalgas con aplicación en la industria farmacéutica, cosmética o alimenticia es factible sólo a través del uso de fermentadores cerrados porque de esta manera se puede trabajar bajo un esquema de buenas prácticas de manufactura y/o lineamientos ISO. Adicionalmente, al trabajar con un sistema cerrado se puede asegurar la calidad de las células que se están colectando,

garantizando así que se encuentren libres de compuestos tóxicos siempre y cuando se utilicen productos inocuos como medio de cultivo (Shalaby, 2011). El uso de un fermentador o fotobiorreactor cerrado permite controlar y regular prácticamente todas las condiciones y parámetros biotecnológicamente relevantes, lo cual reduce drásticamente las posibilidades de contaminación y genera resultados altamente reproducibles en distintos lotes de producción (Pulz, 2001).

5.1.2 Aplicaciones terapéuticas de las microalgas.

Las microalgas se pueden utilizar como una fuente confiable y renovable de distintos compuestos con diversas actividades biológicas, entre los cuales podemos mencionar: carotenoides, vitaminas, proteínas, lipopéptidos, aminoácidos, ácidos grasos, macrólidos, amidas y polisacáridos. La capacidad para producir una gran gama de compuestos con actividad biológica se atribuye en gran parte a que, para sobrevivir en un ambiente tan competitivo y biológicamente diverso, las microalgas han desarrollado rutas metabólicas capaces de generar estructuras químicas complejas como mecanismos de defensa ante otros organismos acuáticos. Además, al ser organismos fotosintéticos poseen la capacidad de síntesis de carotenoides, los cuales utilizan como pigmentos accesorios para captar energía lumínica o como inhibidores de la fotooxidación (Cardozo y col., 2007). Los compuestos antes mencionados han demostrado actividades citotóxicos, antioxidantes, antivirales, antibióticas, antiparasitarias, antimicóticas e hipo-colesterolemiantes, entre otras (Shalaby, 2011).

Por citar un ejemplo, en 2012 Elizondo-González y colaboradores de la Universidad Autónoma de Nuevo León lograron aislar el polisacárido sulfatado fucoïdan del alga marina *Cladosiphon okamuranus*, el cual presentó importante actividad antiviral en contra del virus de Newcastle, el cual es causante de pérdidas millonarias anualmente en la industria avícola (Elizondo-Gonzalez y col., 2012).

5.2 CÁNCER.

El cáncer es una enfermedad resultado de alteraciones en una célula propia que ha escapado a los mecanismos de regulación por lo que ha modificado su potencial de crecimiento, su respuesta a los mecanismos de control y función, por lo tanto estas células no responden a los mecanismos reguladores del crecimiento y producen clonas con el mismo problema, de modo que pueden alcanzar números considerables y producir tumores (Goldsby y col.,2002). El término cáncer se refiere específicamente a un tumor maligno, que significa un crecimiento progresivo e invasor, que puede presentar metástasis (el proceso mediante el cual estas células transformadas migran a otros tejidos por la sangre o por la linfa) (Qian y col., 2001).

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo; se estima que en 2008 causó 7.6 millones de defunciones (aproximadamente un 13% del total). De estas muertes, la mayor parte fueron causadas por los cánceres de pulmón, estómago, hígado, colon y mama. Se prevé que las cifras de muertes debidas a cáncer continúen en aumento y se estima que para el año 2030 estas sobrepasarán los 13 millones de muertes (OMS, 2013).

El tratamiento del cáncer requiere una cuidadosa selección de una o más modalidades terapéuticas tales como la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Algunos tipos de cáncer tienen tasas de remisión elevadas si son detectados y tratados a tiempo, sin embargo los tratamientos antes mencionados son altamente invasivos y producen efectos secundarios muy dañinos para el paciente, por lo que constantemente se están buscando nuevas opciones farmacológicas de tratamiento (OMS, 2013).

Los tumores malignos se clasifican de acuerdo a su origen embrionario del tejido donde se originó. Ciertos factores son capaces de originar cáncer en un porcentaje de los individuos expuestos a ellos. Dentro de estos factores se encuentran la herencia, los productos químicos, las radiaciones ionizantes, las infecciones bacterianas o virales y traumas. El cáncer es, en esencia, un proceso genético. Las alteraciones genéticas pueden ser heredadas o producidas en alguna célula por un virus o una lesión provocada de manera externa. El desarrollo de

modelos celulares y animales que describan de manera exacta el desarrollo del cáncer en el humano sigue siendo una de las metas principales de los investigadores. Las líneas celulares tumorales humanas han provisto desde hace décadas una fuente reproducible de material para el estudio y caracterización de la patogénesis del cáncer y para la evaluación de nuevos tratamientos ya sea *in vitro* o *in vivo*, al utilizar animales compatibles con dichas líneas (Jessani y col., 2005). En este estudio se evaluarán los tratamientos en contra de una línea celular de linfoma murino.

5.2.1 Línea celular murina L5178Y-R.

Esta línea celular es un linfoma murino que se obtuvo de la ATCC (American Type Culture Collection). Esta deriva de un tumor de timo inducido con metilcolantreno, en ratones DBA/2. Las células fueron adaptadas a crecimiento *in vitro*, en una suspensión celular llamada L5178Y. Sus características se describen de manera detallada en la Tabla II y en la Figura 1. Se emplea ampliamente para estudios de radio sensibilidad y toxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*.

Tabla II. Descripción de la línea celular L5178Y

Morfología	Células tipo linfoblasto
Tejido	Linfoide
Origen	Timo de ratón DBA/2
Crecimiento	Suspensión
Procedencia	ATCC
Características	Leucemia murina L5178 de ratón DBA/2 tratado con metilcolantreno en el timo, que se deriva la línea celular L5178Y.
Aplicaciones	Análisis de citotoxicidad y de radiación

¹Beer y col., 1983



Figura 1. Linfoma L5178Y-R

5.3 MICROALGAS Y CÁNCER.

Estudios recientes han demostrado que las microalgas sintetizan compuestos con capacidad antiproliferativa, citotóxica y apoptótica en contra de distintas líneas de cáncer tales como linfoma, leucemia, hepatocarcinoma, melanoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer renal y cáncer de colon.

El extracto acuoso de *Chlorella vulgaris* se utilizó como tratamiento *in vivo* en ratas con hepatocarcinoma inducido, obteniendo una reducción en el tamaño de los tumores de hasta un 67%, además de observarse una marcada reducción en la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y a su vez un aumento en la expresión de la proteína caspasa 8 y una incrementada actividad apoptótica determinada por la técnica de TUNEL (Azamai y col., 2009). A su vez otro grupo de investigación encontró actividad biológica antitumoral del extracto acuoso de *Chlorella vulgaris*, en contra de la línea celular de cáncer hepático HepG2; esto lo demostraron al evaluar la actividad citotóxica *in vitro* por medio de la técnica de microplaca y obtener una IC₅₀ de 1.6 mg/mL, además de observarse un 70% de células HepG2 en proceso apoptótico cuando se trataron con 2 mg/mL de dicho extracto acuoso, lo cual se comparó contra células hepáticas normales de la línea WRL68 que sólo presentaron un 15% de células en proceso apoptótico al evaluarse por la técnica de TUNEL (Yusof y col., 2010).

Los compuestos presentes en algunas cepas de microalgas adicionalmente han mostrado efecto no sólo como tratamiento en contra de tumores hepáticos previamente formados, si no que podrían utilizarse como tratamiento preventivo en contra del hepatocarcinoma, ya que en otro estudio se observó que al suministrar polvo de *Spirulina platensis* vía oral a ratas, a las cuales se les administró dibutilnitrosamina como inductor de carcinogénesis hepática, la incidencia de aparición de tumores se redujo de un 80% (grupo control sin tratamiento) a un 20% (grupo de ratas tratadas con *S. platensis*), además de aumentar la expresión de Bax y reducir la expresión de Bcl-2, lo cual indicó un aumento en la actividad apoptótica en contra del hepatocarcinoma (Ismail y col., 2009).

En relación a otros tipos de cáncer tales como las leucemias se han realizado a su vez distintos estudios, en uno de ellos se evaluaron 90 distintas cepas de cianobacterias y se encontró que 9 cepas presentaron una actividad apoptótica alta y 41 cepas una actividad apoptótica media, los extractos orgánicos (obtenidos con metanol y diclorometano) de microalgas de los géneros *Anabaena* y *Microcystis* mostraron la mayor actividad apoptótica en contra de líneas celulares de linfoma de células T y de leucemia mieloide aguda (Ofedal y col., 2010). Asimismo, en otro estudio se encontró que el extracto metanólico de la cepa *Aphanizomenon flos-aquae* posee actividad citotóxica en contra de las líneas celulares HL-60 y MV-4-11; sin embargo, este extracto también resultó ser tóxico para las células hematopoyéticas BFU-E y para las células progenitoras de granulocitos y macrófagos CFU-GM por lo cual se descartó su posible aplicación como antineoplásico (Bechelli y col., 2011). Se demostró también que los extractos orgánicos de cepas de los géneros *Synechocystis* y *Synechococcus* aisladas a lo largo de la costa de Portugal, tienen actividad antiproliferativa y apoptótica *in vitro* en contra de la línea celular HL-60 (Martins y col, 2008).

Dunalliella tertiolecta a su vez, tiene capacidad antiproliferativa y apoptótica *in vitro* en contra de las líneas celulares MCF-7 y LNCaP, los extractos obtenidos con diclorometano se fraccionaron y se identificó el compuesto responsable de la actividad biológica mediante las técnicas de HPLC, espectrofotometría y espectroscopia de masas, a este compuesto se le denominó violaxantina y mostró actividad antiproliferativa contra la línea MCF-7 a concentraciones tan bajas como 0.1 µg/mL (Pasquet y col., 2011).

Existen algunos casos de cepas que tienen un potencial de inhibición del crecimiento ante una gran gama de líneas celulares, como es el caso de la cianobacteria *Lyngbya* sp. aislada de los pantanos Everglades de Florida. Esta cepa produce un compuesto denominado Pahayokolida A (compuesto que se logró aislar, pero aún no se elucida su estructura completa), el cual mostró actividad inhibitoria en contra de líneas celulares de cáncer de pulmón (H460), riñón (A498), ovario (SK-OV-3), mama (SKBR3), colon (HT29) linfoma (CEM), melanoma (SK-MEL-28) y glioblastoma (U251), observándose IC₅₀ que van desde 2.13 hasta 44.57 μ M (Berry y col., 2004). A su vez de una cepa perteneciente al género *Nostoc* sp. Se logró aislar el compuesto criptoficina una lactona macrocíclica, la cual exhibe actividad antiproliferativa *in vitro* en contra de las líneas celulares de cáncer nasofaríngeo (KB) de colon (LoVo) y de ovario (SKOV3) observándose IC₅₀ a bajas concentraciones que van desde 9.2 hasta 20 pM (Chlipala y col., 2011).

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 COLECTA, AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MICROALGAS.

Con el fin de encontrar nuevas fuentes de moléculas con actividad biológica antitumoral se muestreó de manera aleatoria distintos cuerpos de agua de Nuevo León de manera simple colectando agua en frascos con taparosca y trasladándola al laboratorio para su posterior procesamiento, este muestreo fue realizado tanto por un servidor como por alumnos de las prácticas de la materia Ecología de los Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas.

De las muestras colectadas, se tomaron 5 mL con los cuales se inocularon matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio de cultivo líquido previamente reportado por el doctor Ulrico López (López-Chuken y col., 2010). Estos matraces se incubaron a temperatura ambiente en el laboratorio (25°C aproximadamente) con agitación a 120 rpm y en presencia de una fuente de iluminación artificial continua con intensidad de aproximadamente 1000 lux, estos cultivos se mantuvieron en incubación por hasta 20 días hasta observar crecimiento de microalgas; aquellos cultivos en los cuales no se observó crecimiento en ese periodo fueron descartados.

De los cultivos que presentaron crecimiento se tomaron 100 µL y con ellos se inocularon por estría en 3 campos placas Petri con el mismo medio de cultivo antes mencionado, solidificado con 1.5% de agar bacteriológico; estas placas se incubaron a 30°C con un foco de luz blanca de que ofrece aproximadamente 1000 lux, como fuente de iluminación artificial continua hasta que se observó crecimiento de colonias de microalgas, estas colonias se recogieron con ayuda de un asa bacteriológica estéril y se sembró con ella nuevamente un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL del mismo medio de cultivo (líquido) y se llevó a incubar bajo las condiciones antes descritas hasta observar de nuevo crecimiento de microalgas. Este proceso nos permitió seleccionar un sólo género de algas al tomar una sola colonia, sin embargo, las microalgas suelen crecer en consorcios con otros microorganismos

como bacterias o levaduras, por lo que para realizar la purificación y obtención de cultivos axénicos se tuvo que recurrir a un tratamiento con antibióticos para los cultivos algales.

El tratamiento con antibióticos se realizó activando las cepas de microalgas, sembrando 0.5 mL de los cultivos de cada muestra en 50 mL de medio para enriquecimiento de algas e incubando a temperatura ambiente de laboratorio (25°C aproximadamente), agitación a 120 rpm e iluminación continua con un foco de luz blanca de aproximadamente 1000 lux, todo lo anterior con el fin de activar el crecimiento de las cepas. Posteriormente, de los cultivos antes mencionados se tomaron 0.25 mL y se inocularon en tubos cónicos de 15 mL con 5 mL de medio de cultivo para algas con la siguiente combinación de antibióticos: penicilina 500 UI/mL, estreptomina 500 µg/mL, gentamicina 50 µg/mL y anfotericina B 1.25 µg/mL. Estos cultivos en tubo falcón se incubaron por 48 horas bajo las mismas condiciones antes descritas, una vez transcurrido este periodo se tomaron 500 µL de los cultivos y se transfirieron a 50 mL de medio de cultivo para algas sin antibiótico y se incubaron bajo las mismas condiciones hasta observar crecimiento. Los cultivos se observaron al microscopio para confirmar que los cultivos puros obtenidos fueran axénicos y se encontraran libres de bacterias y/o levaduras.

El proceso de identificación de las algas se realizó por medio de observación microscópica, este último con ayuda de un microscopio óptico (Motic, B3 220 PL, Carlsbad CA, USA); las fotografías se obtuvieron con la cámara fotográfica de un teléfono celular Sony XPeria Z2 adaptada a los lentes. Las características morfológicas se compararon entonces con guías de identificación reportadas en la literatura, con lo cual se estableció el género de la microalga analizada (Belcher y Swale, 1976; Prescott y col., 2002; Van-Bureen y col., 2006; Graham y col., 2008; Viramontes-Ramos y Portillo-Ruiz, 2009; Bellinger y Sigee, 2010).

6.2 TAMIZAJE DE ACTIVIDAD CITOTÓXICA CONTRA LA LÍNEA L5178Y-R

Una vez aisladas, purificadas e identificadas las microalgas, se procedió a evaluar la actividad citotóxica *in vitro* de sus extractos acuosos con el fin de identificar aquellas que presentan actividad inhibitoria en contra de la línea celular L5178Y-R y a su vez descartar aquellas microalgas sin actividad significativa. Para lograrlo, se requirió contar con líneas celulares activas, lo cual se realizó de la manera descrita en el siguiente punto.

6.2.1 Mantenimiento *in vitro* de la línea tumoral

Las células de la línea celular L5178Y-R se mantuvieron en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (Sigma-Aldrich), 2 mM glutamina (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA) y antibióticos (0.5% de solución penicilina-estreptomicina, 0.1% de anfotericina B Sigma-Aldrich).

Para asegurar la disponibilidad de las líneas celulares en el laboratorio, se congelaron muestras (stocks) de aproximadamente 2×10^7 células/mL, para lo cual las células se concentraron mediante centrifugación a 1800 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y el concentrado celular se resuspendió en una solución de 70% medio de cultivo, 20% suero fetal bovino (SFB) y 10% DMSO como anticongelante que impide la formación de cristales de agua en el interior de las células manteniendo la integridad celular, y se dispensó 1mL por criotubo (Corning); este material se almacenó a -70°C durante una semana y después se guardó en un tanque de nitrógeno líquido hasta el momento que fue requerido.

6.2.2 Evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* de los extractos acuosos.

Para evaluar la actividad citotóxica de los extractos acuosos de microalgas fue necesario previamente la preparación de los mismos, lo que se realizó de la siguiente manera, se comenzó por activar las cepas inoculando 50 mL de medio de cultivo para algas con 1 mL de un cultivo stock de cada cepa (por separado) e incubando a temperatura ambiente de laboratorio (25°C aproximadamente) con un foco de luz blanca de aproximadamente 1000

lux, como fuente de iluminación continua y agitación a 130 rpm hasta observar crecimiento algal, una vez que se observó crecimiento se transfirieron estos cultivos a un matraz Erlenmeyer de 500 mL el cual contenía 200 mL de medio de cultivo para algas, estos cultivos se incubaron bajo las mismas condiciones hasta obtener un crecimiento abundante de microalgas. De los cultivos anteriores se colectó la biomasa por centrifugación a 9000 rpm por 10 min (THERMO Scientific, ST16R, Waltham MA, USA) y descartando el sobrenadante, posteriormente la biomasa se secó por liofilización (Labconco, Freezone 4.5, Kansas City MO, USA) y una vez que se obtuvo la biomasa seca, se procedió a pesarla y a realizar los extractos acuosos.

Para obtener los extractos acuosos se colocó un vaso de precipitado de 250 mL con 20 mL de agua destilada sobre una placa de calentamiento y se mantuvo en calentamiento hasta ebullición, entonces se añadió la biomasa de microalgas previamente liofilizada. Se homogenizó la muestra con un agitador magnético por 10 min en ebullición. Terminado este tiempo se centrifugó el extracto para descartar la biomasa restante y el sobrenadante se filtró utilizando un embudo de vidrio y un papel filtro, la muestra obtenida se congeló hasta su posterior uso. Después se depositaron 5 mL del extracto obtenido en viales de vidrio sin tapa y se llevaron a congelación a -70°C (SO LOW, Ultra Low Freezer U85-13, Cincinnati OHIO, USA), posteriormente se sometieron al proceso de liofilización y se pesó la cantidad de extracto obtenido. Los viales se mantuvieron sellados y refrigerados hasta su uso posterior. Una vez que se obtuvieron los extractos acuosos secos, se prepararon soluciones stock a una concentración de 1mg/mL , disolviéndolos en medio de cultivo RPMI completo. Estos se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su posterior uso en los ensayos biológicos.

Para la evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* de los extractos en contra de la línea L5178Y-R se utilizó la técnica colorimétrica de MTT (bromuro de 3-4,5-dimetiltiazol-2-ilo-2,5-difeniltetrazol), para esto, se tomó una alícuota del cultivo celular y se lavó una vez con RPMI por centrifugación a 1800 rpm por 10 min; posteriormente se resuspendió en medio de cultivo completo y se ajustó a 5×10^4 células/mL. Las células se sembraron en microplacas de 96 pozos de fondo plano (Corning, New York, USA), conteniendo cultivos por triplicado en alícuotas de $100\ \mu\text{L}$, donde previamente se habían colocado $100\ \mu\text{L}$ del tratamiento (extracto

acuoso de microalgas disuelto en RPMI) a diferentes concentraciones en diluciones seriadas 1:2 partiendo de 500µg/mL. Como control positivo se utilizaron 100 µL del antineoplásico vincristina (100 µg/mL de concentración) y como control negativo 100 µL de medio de cultivo; posterior a esto se incubaron los cultivos durante 48h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Al finalizar este período de tiempo, se colocaron 15 µL de MTT a una concentración final de 0.5 mg/mL y se incubaron 3 h adicionales; posteriormente se retiró el sobrenadante y se añadieron 80 µL de DMSO a todos los pozos, las densidades ópticas se determinaron en un lector de microplacas (DTX 880 Multimode detector, Becton Dickinson, Austria) a 570 nm (Gómez-Flores y col., 2005).

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Este método se seleccionó pues ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular, ya que la cantidad de sales de formazán producido es proporcional al número de células vivas (Mosmann 1983).

El porcentaje de inhibición se determinará con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \frac{A_{570} \text{ de células tratadas con extracto}}{A_{570} \text{ de células no tratadas}} \times 100$$

6.3 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS CRUDOS DE LOS AISLAMIENTOS DE *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp.

Por problemas en las instalaciones se perdieron los aislamientos originales y se reinició el proyecto enfocándonos en el aislamiento de microalgas de los géneros de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. los cuales habían mostrado resultados significativos contra de la línea celular L5178Y-R, el aislamiento, purificación e identificación de las microalgas se realizaron de la misma manera como se menciona en el punto 6.1. Asimismo a partir de la

identificación de los aislamientos en delante, se trabajaron extractos orgánicos crudos de hexano, cloroformo y metanol debido a comentarios realizados por el comité de tesis

Para realizar los extractos orgánicos, primero se obtuvo y se liofilizó biomasa de los aislamientos de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. de la misma manera que se menciona en el punto 6.2.2, posteriormente se realizó la extracción con solventes orgánicos colocando 0.5 g de la biomasa de cada aislamiento en un matraz Erlenmeyer de 125 mL sobre una placa de agitación y agregando un agitador magnético dentro de los matraces, posteriormente se agregaron 50 mL de hexano y la mezcla se mantuvo en agitación por 24 horas, transcurrido este periodo se filtró el líquido utilizando papel filtro Whatman No. 1 y embudos de filtración, quedando la biomasa retenida en el papel filtro. La biomasa se mantuvo en el papel filtro hasta que el solvente se evaporó por completo y se guardó hasta su posterior uso. El líquido o extracto hexánico se llevó a sequedad, por medio de rotaevaporación (Rotaevaporador Büchi R-3000, Postfach, Suiza) hasta reducir su volumen a un aproximado de 5 mL; consecutivamente este extracto se colocó en un desecador al vacío por aproximadamente 72 horas. Una vez que el extracto alcanzó la sequedad total, se almacenó en frascos de vidrio con tapa de rosca metálica hasta su posterior uso. La biomasa que retuvo el papel filtro se utilizó de nuevo para la extracción, en esta ocasión utilizando cloroformo como solvente ya que es ligeramente más polar que el hexano, de esta manera es posible arrastrar otro tipo de compuestos presentes en la biomasa; esto se realizó siguiendo los mismos pasos mencionados con el hexano, y reteniendo de la misma manera la biomasa por medio de un papel filtro. Posterior a la extracción con cloroformo, el proceso se repitió, en esta ocasión utilizando como solvente metanol el cual muestra una polaridad mucho más elevada. Los extractos orgánicos crudos se disolvieron en medio RPMI completo, a una concentración de 1 mg/mL, y se mantuvieron en congelación hasta su posterior uso.

6.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LOS EXTRACTOS DE MICROALGAS OBTENIDOS A ESCALA DE LABORATORIO.

Se evaluó la actividad citotóxica *in vitro* de los extractos orgánicos crudos que se obtuvieron previamente, como se menciona en el punto 6.3 en contra de la línea L5178Y-R, de la misma

manera que se menciona al final del punto 6.2.2, con la diferencia que en esta ocasión se trabajaron extractos orgánicos en lugar de extractos acuosos, salvo ese punto en particular se utilizó la misma metodología. En la sección de resultados se puede observar que los extractos metanólicos de 2 aislamientos, uno de *Chlorella* sp. y uno de *Scenedesmus* sp. fueron los que presentaron actividad citotóxica en contra de la línea L5178Y-R.

6.5 ESCALAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA.

6.5.1 Preparación e inoculación de los biorreactores.

Para obtener los extractos crudos necesarios para realizar los ensayos de citotoxicidad, apoptosis y linfoproliferación *in vitro* se requirió una mayor cantidad de biomasa algal (10-20g de biomasa seca), es por esto que fue necesario realizar un escalamiento a nivel semi-piloto de los aislamientos que presentaron actividad citotóxica *in vitro* en las pruebas de tamizaje. Una vez que se obtuvieron los cultivos monoalgales axénicos, se inoculó con 5 mL del cultivo en refrigeración de cada uno de los aislamientos que habían mostrado actividad biológica, tres matraces Erlenmeyer con 500 mL del medio de cultivo reportado por López-Chuken y col., (2010) para el aislamiento de *Chlorella* sp. y de la misma manera se realizó para el aislamiento de *Scenedesmus* sp. Estos se incubaron en presencia de luz artificial continua (Aproximadamente 1000 lux) a temperatura ambiente, con agitación a 120 rpm en un agitador orbital Labnet Orbit 1900 (New Jersey, USA) por 7 días (basándonos en conteos celulares realizados cada 24 horas), transcurrido este tiempo se transfirió el volumen de cada uno de los matraces a un biorreactor respectivamente (3 biorreactores para el aislamiento de *Chlorella* sp. y 3 biorreactores para el aislamiento de *Scenedesmus* sp.), los cuales estaban conformados por tanques cilíndricos de acrílico de 30 cm de diámetro por 30 cm de altura, los cuales contenían 14.5 L del medio de cultivo antes mencionado, estos se encontraban iluminados por luces LED blancas y cubiertos con aluminio lo cual reflejaba la luz generando una intensidad de entre 1300 – 1600 Lux, la agitación se suministró utilizando cinchos de plástico anclados a varillas de acrílico que a su vez estaban montadas sobre motores de 12 Voltios que generaban 50 rpm, mientras que la aireación se suministró utilizando bombas de aire para acuario a las cuales se les adaptaron filtros de 0.2 μm para

esterilizar el aire que entraba al sistema, este aire se dispersaba en el biorreactor mediante el uso de piedras de acuario, alcanzando un flujo de 1 L/min. El montaje de los experimentos quedó como se muestra a continuación en las Figuras 2, 3 y 4.



Figura 2. Biorreactores montados, con iluminación LED, flujo de aire filtrado y recubrimiento de aluminio, previo a la inoculación

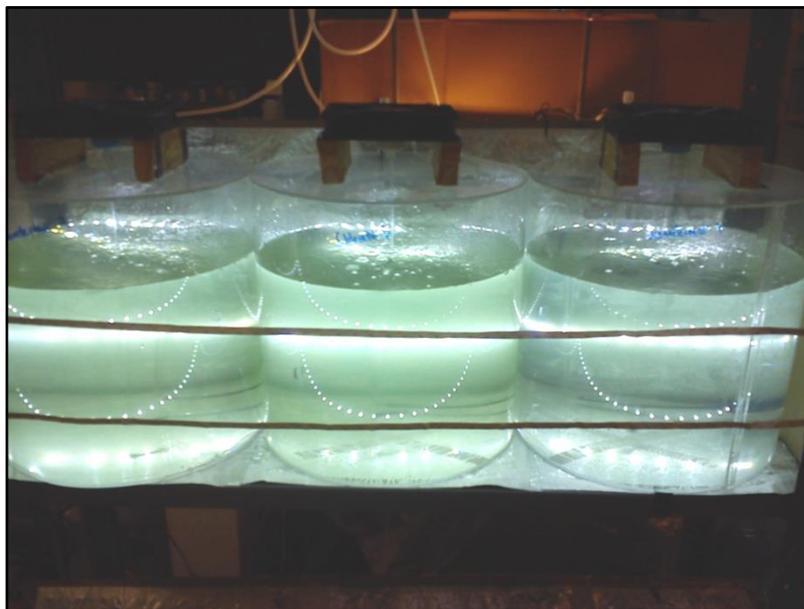


Figura 3. Biorreactores montados e inoculados con los aislamientos de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp.



Figura 4. Biorreactores en los cuales ya se observa crecimiento de los aislamientos de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp.

6.5.2 Monitoreo del escalamiento

El experimento de escalamiento se monitoreó cada tercer día (Martes, Jueves y Sábado), el contenido de los tanques se observó al microscopio para corroborar que los aislamientos se encontraran creciendo correctamente y libres de contaminación por bacterias u hongos, por otra parte se monitoreó la producción y el aumento de biomasa en el sistema tomando alícuotas de 10 mL, las cuales se colocaron en un filtro de microfibras de 0.7 μm previamente secado en horno por 24 h, se dejaron enfriar por 20 minutos en un desecador y se pesaron en balanza analítica, posteriormente con ayuda de un embudo, un matraz Kitasato y una bomba de vacío las alícuotas fueron filtradas con lo cual la biomasa presente en las alícuotas quedó retenida en los filtros, los cuales se secaron en una estufa a 50°C durante 3 horas y se pesaron en una balanza analítica, esto se ilustra en las Figuras 5 y 6. La producción de

biomasa se monitoreó entonces obteniendo la diferencia del peso del filtro con biomasa contra el filtro sin biomasa, esta diferencia de pesos se graficó y una vez que se observó que la producción de biomasa en el sistema dejó de aumentar, se detuvo el experimento, se desmontaron los biorreactores y los tanques se colocaron en refrigeración hasta la posterior colecta de la biomasa.



Figura 5. Filtrado de una de las alícuotas a través de la microfibrá de 0.7 micras previamente pesada.

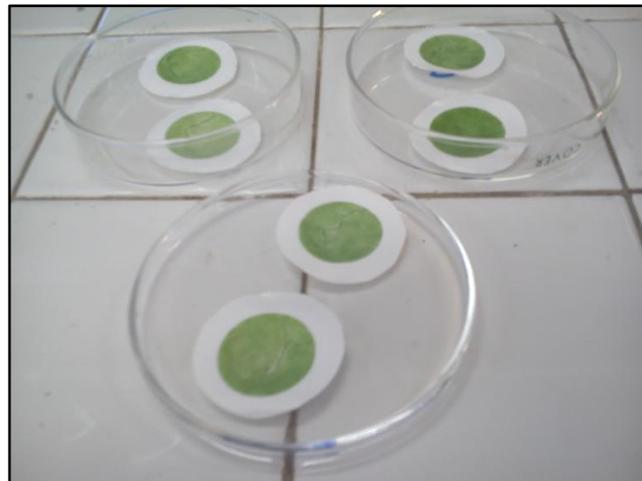


Figura 6. Filtros de microfibrá reteniendo la biomasa contenida en las alícuotas

6.5.3 Colecta y concentración de la biomasa

Una vez que los biorreactores mostraron un estancamiento en la producción de la biomasa, se dejaron reposar durante 48 horas en refrigeración, con el fin de que la biomasa que se encontraba en suspensión en el medio de cultivo precipitara, de esta manera se separó el sobrenadante de la biomasa del fondo, la cual se colectó en matraces Erlenmeyer de 1-L, mientras que el sobrenadante se volvió a colocar en los tanques y se refrigeró nuevamente por 48 horas para repetir el proceso y colectar la mayor cantidad de biomasa posible. Una vez que se retiró la mayor parte del sobrenadante se separó la biomasa y se colocó en tubos cónicos de 50 mL y se centrifugó a 4000 rpm por 5 min para retirar el medio de cultivo restante. Una vez que se obtuvo la biomasa libre de medio de cultivo, esta se colocó en viales de vidrio y se liofilizó para su posterior extracción metanólica por el método Soxhlet.

6.6 EXTRACCIÓN METANÓLICA POR MÉTODO SOXHLET.

Para determinar la actividad citotóxica, apoptótica y linfoproliferativa de los aislamientos de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. cuya producción se escaló previamente se realizó una extracción por método Soxhlet en el laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas, en el cual se utilizaron 11.21 g de biomasa de *Chlorella* sp. y 13.74 g de biomasa de *Scenedesmus* sp., la cual había sido previamente secada, se colocaron en cartuchos separados de celulosa Whatman 33 X 80 mm y se colocaron en extracción Soxhlet, el cual es un método de extracción líquido-sólido en que se pasa el solvente puro continuamente por el material sólido. Este es un sistema continuo y consta de un matraz redondo, una cámara de extracción con un sifón y un condensador. Este método se seleccionó ya que esta extracción es muy práctica debido a que se recupera la mayor parte de los compuestos solubles en metanol contenidos en el material biológico. Se utilizaron 600 mL de metanol, la extracción tuvo una duración de 40 h para cada uno de los aislamientos, una vez que con el metanol se acarrearon los compuestos de interés del material biológico, se filtraron las soluciones utilizando papel filtro Whatman y posteriormente se evaporó el solvente con ayuda de un evaporador rotatorio hasta evaporar la mayor cantidad de solvente Figuras 7 y 8, dejando aproximadamente solo 10-15 mL de material líquido y posteriormente mediante el uso de un

desecador con vacío se llevó a sequedad completa, retirando la totalidad del metanol. Una vez que se obtuvieron los extractos secos, se prepararon soluciones stock a una concentración de 1mg/mL disolviéndolos en medio de cultivo RPMI completo. Los extractos disueltos se mantuvieron en congelación hasta su posterior uso en ensayos biológicos.

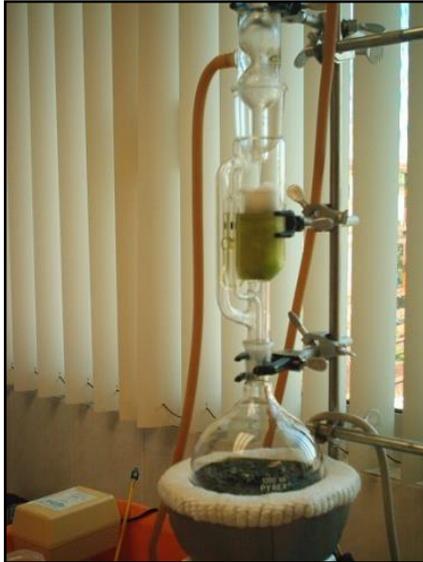


Figura 7. Extractor Soxhlet



Figura 8.Rotaevaporador Büchi R - 3000

6.7 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE MICROALGAS OBTENIDO A ESCALA SEMI-PILOTO

6.7.1 Evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* de los extractos metanólicos obtenidos por método Soxhlet

La determinación de la actividad citotóxica *in vitro* se realizó de acuerdo a lo mencionado en el punto 6.2.2 siendo la única diferencia que esta vez se utilizó un extracto metanólico, el cual se obtuvo de la producción de biomasa a escala semi-piloto y por método Soxhlet, salvo esa diferencia la metodología utilizada para los ensayos fue similar.

6.7.2 Determinación de apoptosis por medio de tinción con naranja de acridina/bromuro de etidio de los extractos metanólicos contra de la línea L5178Y-R

La apoptosis se define como una forma de deceso celular programado codificado genéticamente en todas las células. Durante este proceso las células se inactivan, se desensamblan y degradan su propia estructura y componentes de manera coordinada sin causar un proceso inflamatorio ni daño tisular circundante. Por lo anterior es que al probar nuevos tratamientos en contra del cáncer, se busca que dicho tratamiento induzca una muerte celular apoptótica (Sánchez-Torres y Vargas, 2003).

Dado lo anterior se evaluó el tipo de muerte celular inducido por los extractos metanólicos de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp., para esto se expusieron $1-3 \times 10^6$ células de la línea L5178Y-R a una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los extractos metanólicos en placas de 24 pozos y se incubaron durante 24 h, posterior a esto se adicionaron 500 μL de RPMI, más 1 μL de naranja de acridina y bromuro de etidio a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en relación 1:1. Se incubaron en esta solución por 5 min y posteriormente se realizó un lavado con 1 mL de PBS y se resuspendió en 100 μL de medio RPMI, se colocaron 10 μL de la suspensión celular entre un portaobjetos y un cubreobjetos para visualizarlo en un microscopio de fluorescencia. El naranja de acridina es capaz de teñir tanto las células viables como las células muertas (Observándose de color verde), mientras que el bromuro de etidio solo podrá teñir aquellas células que hayan perdido la integridad de su membrana (observándose naranjas). Por lo

tanto las células viables aparecen en un tono verde de manera uniforme, las células que se encuentran en apoptosis temprana aparecen en un tono verde pero no del todo uniforme si no punteado o granulado en el centro debido a la condensación de la cromatina y la fragmentación del núcleo, las células en apoptosis tardía se observan con puntos o gránulos naranjas en el centro de manera similar a aquellas en apoptosis temprana pero de color naranja, mientras que las células en necrosis aparecen en un tono naranja uniforme (Coligan y col., 1995).

6.7.3 Determinación de apoptosis por análisis de fragmentación del ADN

Uno de los eventos moleculares que ha sido tomado como sello característico de la apoptosis es la fragmentación del DNA por una nucleasa conocida como CAD (caspase activated DNase), esta enzima rompe inicialmente el material genético en fragmentos de 50 a 300 kilobases (Kb) y posteriormente en fragmentos pequeños de múltiplos de aproximadamente de 200 pares de bases, que al analizarse por electroforesis se observan como un “patrón en escalera” (Sánchez-Torres y Vargas, 2003).

Las células se incubaron 48 h con los extractos metanólicos de los aislamientos de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. a una concentración de 500 µg/mL, y con los respectivos controles negativo (medio de cultivo) y positivo (actinomicina D); finalizado el tiempo de incubación las células se colectaron y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min. Posteriormente se lavaron con PBS y se extrajo el ADN por medio del Kit AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep (Axygen, MA, USA). El extracto de ADN se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%; utilizando buffer SB para el corrimiento electroforético a 70 V durante 20 min y 110 V durante 1 h. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio 5 ng/mL y las fotos se documentaron bajo luz UV (High Performance Ultraviolet Transilluminator, UVP). Un resultado de fragmentación en escalera del ADN de las células tratadas es indicio de efecto apoptótico de los tratamientos, por otra parte un resultado de ADN barrido es indicio de muerte celular por necrosis.

6.7.4 Evaluación de la actividad linfoproliferativa de los extractos metanólicos en contra de linfocitos de timo de ratón.

Una vez que se demostró la actividad citotóxica y apoptótica *in vitro* de los extractos metanólicos de los extractos de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp., se procedió a evaluar su actividad linfoproliferativa en células de timo de ratón, esto se realizó con el fin de observar y determinar si los tratamientos tienen un efecto citotóxico en contra de las células del sistema inmunológico de los ratones o por el contrario un efecto proliferativo. Lo que se pretende con esto es comprobar que los tratamientos tienen un efecto inhibitorio específico en contra de las líneas celulares tumorales, pero que a su vez son inocuos para las células del sistema inmune, lo cual sería un indicio de que el o los tratamientos tendrían pocos efectos secundarios nocivos.

Se obtuvieron linfocitos de timo de ratones y se lavaron en PBS por centrifugación, el pellet de linfocitos de timo se disolvió en medio RPMI completo y se ajustó a una concentración de 1×10^7 células/mL y se depositaron alícuotas de 80 μ L en placas de 96 pozos de fondo plano, las cuales previamente contenían por triplicado 100 μ L de los extractos metanólicos de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp., en diluciones seriadas en 100 μ L de medio RPMI completo (como control sin tratamiento) y se agregaron 20 μ L de concanavalina A (mitógeno, estimulante de la proliferación) o 20 μ L de medio RPMI (como control sin estimulante de proliferación). Las placas de 96 pozos se incubaron por 44 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire, una vez terminado el tiempo de incubación se agregaron a cada pozo 20 μ L de MTT a una concentración de 0.5 mg/mL y se incubaron las placas por 4 h adicionales. Posteriormente se agregaron 80 μ L de buffer de lisis celular a todos los pozos y se incubaron bajo las mismas condiciones por 16 horas adicionales. Para el análisis de la viabilidad celular de los linfocitos se leyeron las densidades ópticas resultantes de la solubilización del formazán en un lector de microplacas a 570 nm de longitud de onda.

6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

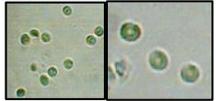
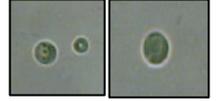
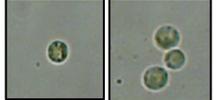
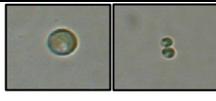
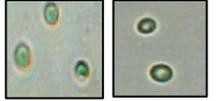
Los experimentos tanto de producción de biomasa como de actividad antitumoral se realizaron por triplicado y se expresan como la media \pm el error estándar de tres experimentos independientes. Los datos obtenidos se analizaron por medio de la prueba de *t* de Student con la cual se evaluaron los niveles de significancia las diferencias entre las medias de cada uno de los experimentos en contra del grupo control.

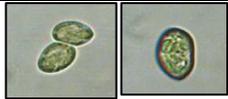
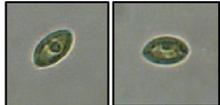
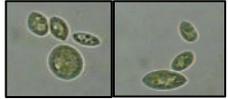
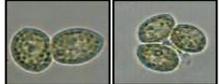
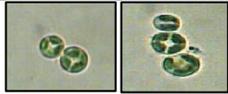
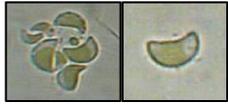
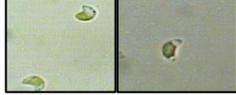
7. RESULTADOS

7.1 COLECTA, AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MICROALGAS.

De las muestras mencionadas en el punto 6.1 y utilizando los métodos antes descritos se obtuvieron las siguientes microalgas de las locaciones indicadas en la Tabla III.

Tabla III. Locaciones, género y fotografías de microalgas aisladas.

Muestra	Locación	Genero	Fotografías
1	Rio Pesquería, Gral. Escobedo N.L. (Donada por F.C.Q. U.A.N.L.)	<i>Chlorella</i> sp.	
2	Arroyo del “Topo Chico” (Av. Bernardo Reyes, cruz con calle Rayones)	<i>Chlorella</i> sp.	
3	Parque Recreativo “La turbina”, Sabinas Hidalgo N.L.	<i>Chlorella</i> sp.	
4	Laboratorio de Ciencias Ambientales y de los Alimentos, F.C.Q., U.A.N.L.	<i>Chlorella</i> sp.	
5	Represa “Los Guerra” Mina N.L.	<i>Chlorella</i> sp.	
6	Rio Salinas, Mina N.L.	<i>Chlorella</i> sp.	
7	Canal/Arroyo “Las encinas” Gral. Escobedo, N.L. (Av. Juárez)	<i>Chlorella</i> sp.	
8	Rio La Silla, Guadalupe N.L. (Parque Tolteca)	<i>Scenedesmus</i> sp.	
9	Rio La Silla, Guadalupe N.L.(Colonia La Pastora)	<i>Scenedesmus</i> sp.	

10	Arroyo del "Topo Chico", San Nicolás de los Garza, N.L. (Av. Universidad)	<i>Scenedesmus</i> sp.	
11	Arroyo "El Indio", Juárez, N.L.	<i>Navicula</i> sp.	
12	Parque Natural "La Estanzuela", Monterrey, N.L. (Paraje El cielo)	<i>Nitzschia</i> sp.	
13	Lago del Parque "Niños Héroes", Monterrey N.L.	<i>Cymbella</i> sp.	
14	Rio "La Silla", Guadalupe N.L., (Col. La Pastora)	<i>Oocystis</i> sp.	
15	Rio "La Silla", Guadalupe N.L., (Parque Tolteca)	<i>Oocystis</i> sp.	
16	Parque natural "La Estanzuela", Monterrey, N.L. (Inicio del parque)	<i>Oocystis</i> sp.	
17	Parque Recreativo "La turbina", Sabinas Hidalgo N.L.	<i>Oocystis</i> sp.	
18	Laboratorio de Ciencias Ambientales y de los Alimentos, F.C.Q., U.A.N.L.	<i>Tetraspora</i> sp.	
19	Parque natural "La Estanzuela" Monterrey N.L. (El cielo)	<i>Kirchneriella</i> sp.	
20	Parque Ecoturístico "Cola de Caballo" Santiago N.L.	<i>Kirchneriella</i> sp.	

7.2 TAMIZAJE DE ACTIVIDAD CITOTÓXICA CONTRA LA LÍNEA L5178Y-R

Siguiendo la metodología descrita en el punto 6.2.2 para el tamizaje de actividad inhibitoria contra la línea celular L5178Y-R, encontramos resultados positivos de los siguientes extractos acuosos de algunos aislamientos de *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp. Los aislamientos no alcanzaron siquiera el 30% de inhibición *in vitro* en sus concentraciones más elevadas por lo cual se descartó que tuvieran alguna actividad biológica significativa contra la línea de linfoma murino. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla IV y en la Figura 9.

Tabla IV. Concentración inhibitoria media (IC₅₀) de los extractos acuosos de aislamientos seleccionados de *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp.

Muestra	IC ₅₀ contra de la línea L5178Y-R (µg/mL)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> , muestra 1	384.9 (± 30.2)
<i>Chlorella</i> sp., muestra 3	239.9 (± 11.7)
<i>Chlorella</i> sp., muestra 4	347.7 (± 84.2)
<i>Chlorella</i> sp., muestra 6	268.12 (± 68.8)
<i>Chlorella</i> sp., muestra 7	411.5 (± 26.4)
<i>Scenedesmus</i> sp., muestra 9	451.7 (± 58.1)
<i>Scenedesmus</i> sp. muestra 10	244.4 (± 32.03)
Control Positivo, Vincristina	0.008 (± 0.001)

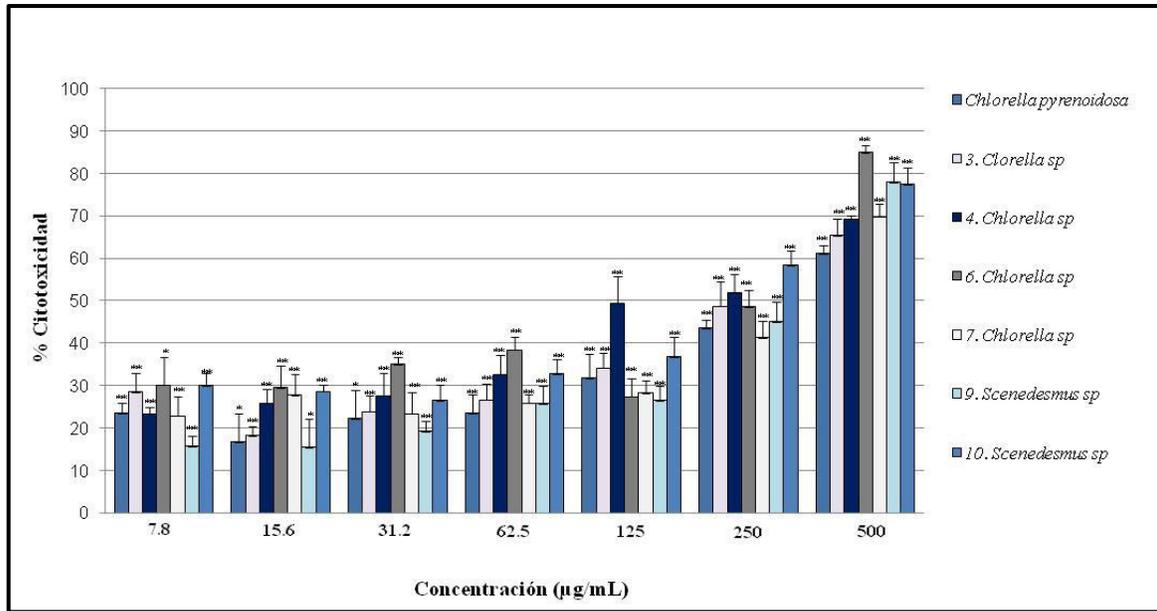


Figura 9. Actividad citotóxica dosis-respuesta dependiente después de probar 6 concentraciones (7.8 - 500 $\mu\text{g/mL}$) de extractos acuosos de distintas microalgas contra la línea celular L5178YR *in vitro*. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ comparado con el control sin tratar.

7.3 NUEVA COLECTA, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE MICROALGAS DE LOS GÉNEROS *Chlorella* sp. Y *Scenedesmus* sp.

Tras seguir la metodología descrita en el punto 6.1 y después de descartar todo aquel aislamiento que bajo una observación microscópica no fuese identificado dentro de los géneros *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. Se lograron obtener y aislar 4 microalgas del genero *Chlorella* y una del genero *Scenedesmus*, en la Tabla V se muestran sus fotografías, así como las locaciones donde fueron colectadas.

Tabla V. Identificación y locaciones de los nuevos aislamientos de microalgas

Muestra	Locación	Género	Fotografías (100x)
1	Presa de la Boca, Santiago, N.L. 25° 24' 28" – 100° 7' 52"	<i>Chlorella</i> sp.	 
2	Rio Santa Catarina, Juárez, N.L. 25° 38' 46" – 100° 5' 9"	<i>Chlorella</i> sp.	 
3	Rio San Juan, Cadereyta, N.L. 25° 31' 17" – 100° 0' 34"	<i>Chlorella</i> sp.	 
4	Rio Pesquería, Gral. Escobedo, N.L. 25° 48' 35" – 100° 18' 51"	<i>Chlorella</i> sp.	 
5	Rio Pesquería, Apodaca, N.L. 25° 46' 34" – 100° 12' 35"	<i>Scenedesmus</i> sp.	 

7.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE *Chlorella* sp. Y *Scenedesmus* sp.

Con el fin de conocer la actividad citotóxica de los aislamientos de los géneros de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp., se realizó la metodología descrita en el punto 6.4, obteniendo citotoxicidad significativa en contra de la línea L5178Y-R con los extractos metanólicos de los aislamientos previamente mencionados, lo cual se observa a continuación en la Tabla VI y en la Figura 10. Cabe mencionar que los extractos clorofórmicos y hexánicos no mostraron actividad significativa en contra de la línea L5178Y-R, por lo cual en adelante solo se menciona la actividad de los extractos metanólicos del aislamiento número 3 de *Chlorella* sp y del aislamiento de *Scenedesmus* sp correspondiente a la muestra 5.

Tabla VI. Porcentaje de citotoxicidad de los extractos metanólicos de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp.

Muestra (Concentración)	Porcentaje de Citotoxicidad vs L5178Y-R (± Error Standard)
<i>Chlorella</i> sp., muestra 3 (500 µg/mL)	67.90 (± 4.24)
<i>Scenedesmus</i> sp., muestra 5 (500 µg/mL)	66.32 (± 2.63)
Control Positivo, Vincristina (250 µg/mL)	76.83 (± 2.55)

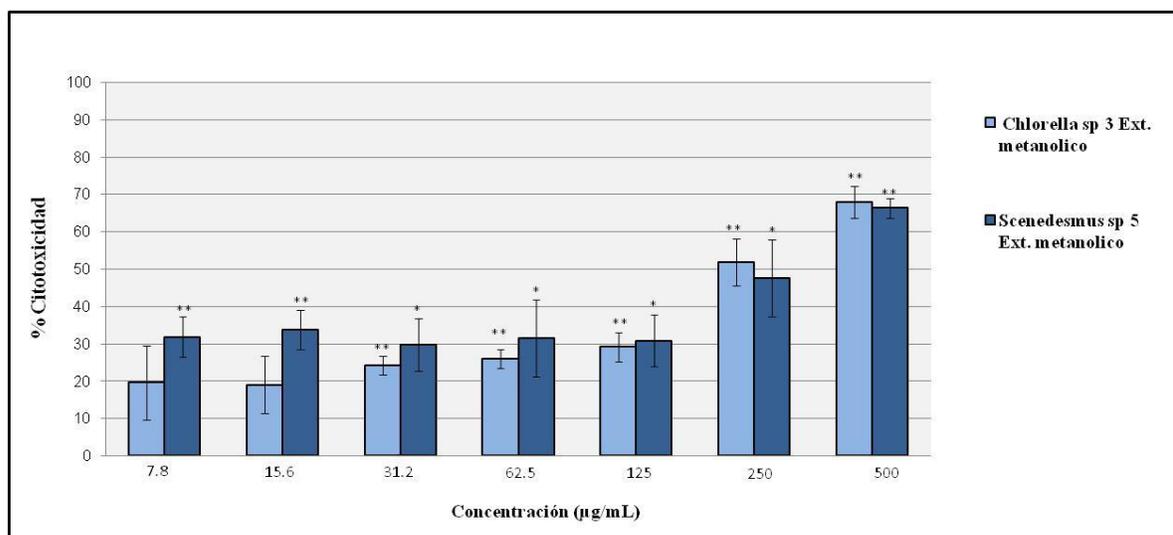


Figura 10. Actividad citotóxica dosis-respuesta dependiente después de probar 6 concentraciones (7.8 - 500 µg/mL) de extractos metanólicos de la microalgas *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp. contra la línea celular L5178YR *in vitro*. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ comparado con el control sin tratar.

7.5 ESCALAMIENTO Y PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN BIORREACTORES DE LOS AISLAMIENTOS DE *Chlorella* sp. Y *Scenedesmus* sp.

Los aislamientos que presentaron actividad citotóxica en contra de la línea L5178Y-R, mencionados en la figura anterior como *Chlorella* sp. (3) y *Scenedesmus* sp. (5). se llevaron a escalamiento utilizando fotobiorreactores de acuerdo a lo mencionado en el punto 6.5, y los resultados obtenidos se describen en los siguientes apartados, así como en las Figuras 11 y 12 en las que se puede observar como aumentó la biomasa producida en los fotobiorreactores en relación al tiempo de incubación.

7.5.1 Monitoreo del escalamiento

Como se describió en el punto 6.5.2, se realizó un monitoreo del escalamiento de la producción de biomasa por parte de los biorreactores por triplicado, con los datos del peso de biomasa producida en relación al tiempo transcurrido se obtuvieron las siguientes figuras que muestran cómo se comportó el aumento de biomasa.

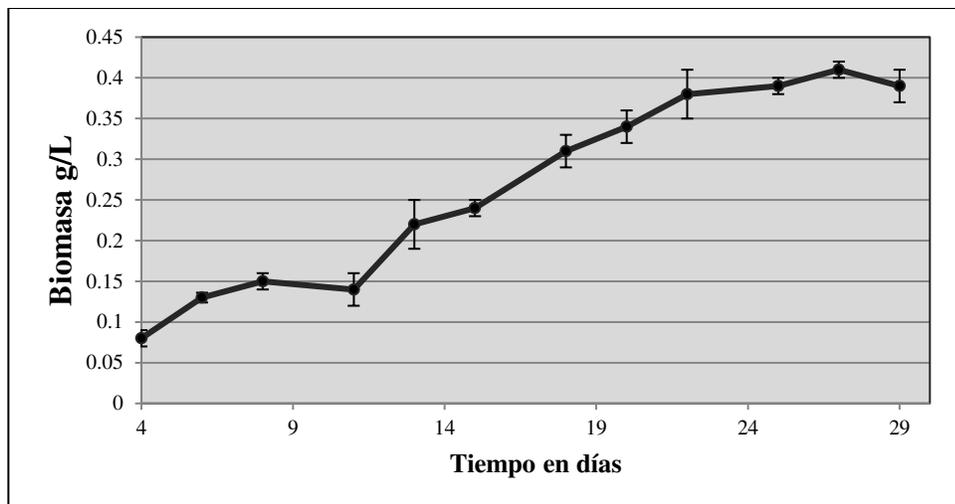


Figura 11. Producción de biomasa en relación al tiempo del aislamiento 3 de *Chlorella* sp.. Los resultados se expresan como producción de biomasa sobre el tiempo en días y se observan en la gráfica como la media \pm el error estándar de 3 pesos.

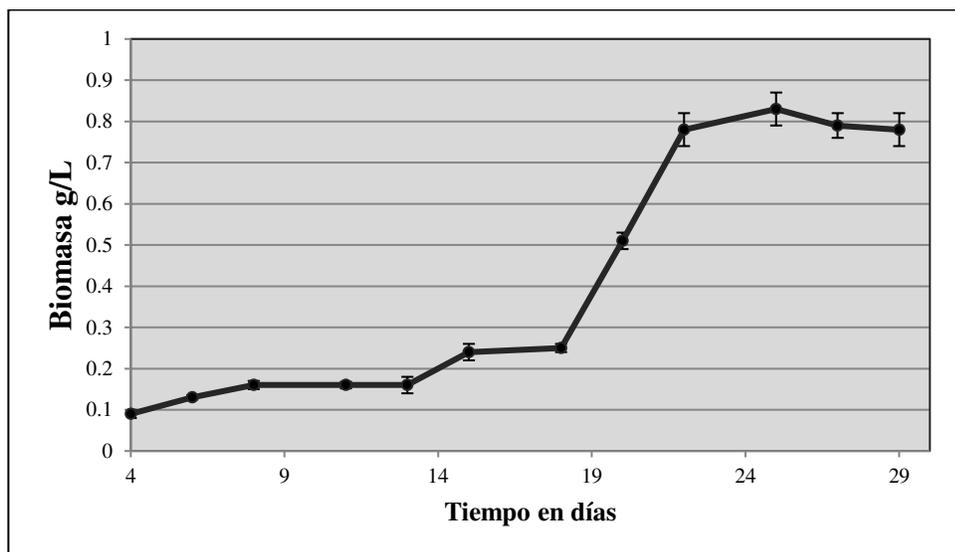


Figura 12. Producción de biomasa en relación al tiempo del aislamiento 5 de *Scenedesmus* sp. Los resultados se expresan como producción de biomasa sobre el tiempo en días y se observan en la gráfica como la media \pm el error estándar de 3 pesos.

Al no observarse aumento de producción de biomasa para ninguno de los 2 aislamientos, se decidió detener el escalamiento en los biorreactores al día 29 de incubación y los tanques se colocaron en refrigeración separando la biomasa por decantación y posterior centrifugación.

7.5.2 Colecta y concentración de la biomasa

Con los datos anteriores y después de la colecta de la biomasa de acuerdo a los pasos descritos en el punto 6.5.3, logramos obtener 11.21 g de biomasa seca del aislamiento 3 de *Chlorella* sp. y 13.74 g del aislamiento 5 de *Scenedesmus* sp., respectivamente. Calculando un aproximado de producción de 0.24 (\pm 0.01) g/ L para *Chlorella* sp. y de 0.30 (\pm 0.01) g/L para *Scenedesmus* sp. Esta biomasa fue la que se utilizó para la posterior extracción por medio del método Soxhlet como se describe en la sección de metodología.

7.6 ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE MICROALGAS OBTENIDO A ESCALA SEMI-PILOTO.

7.6.1 Evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* del extracto metanólico obtenido por método Soxhlet

Los resultados de los ensayos de citotoxicidad *in vitro* de los extractos de los extractos metanólicos obtenidos por método Soxhlet de los aislamientos 3 de *Chlorella* sp. y 5 de *Scenedesmus* sp. arrojaron un porcentaje de citotoxicidad de 61.89 (\pm 3.26) y 74.77 (\pm 1.84) respectivamente, siendo ligeramente más bajo el efecto del extracto de *Chlorella* sp. (muestra 3). A continuación, en la Tabla VII se observan las citotoxicidades obtenidas al tratar las células con la concentración más alta de los extractos y con vincristina como control positivo, así como en la Figura 13 se aprecia la gráfica de dosis-respuesta a los tratamientos versus la viabilidad celular de la línea L5178Y-R.

Tabla VII. Porcentajes de citotoxicidad de los extractos metanólicos obtenidos vía Soxhlet de los aislamientos de *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp en contra de la línea L5178Y-R.

Tratamiento ($\mu\text{g/mL}$) de microalgas seleccionadas	Citotoxicidad (%) vs Línea L5178Y-R (\pm error estándar)	
	L5178Y-R	(\pm error estándar)
Extracto metanólico de <i>Chlorella</i> sp.(3) (500 $\mu\text{g/mL}$)	61.89	(\pm 3.26)
Extracto metanólico de <i>Scenedesmus</i> sp.(5) (500 $\mu\text{g/mL}$)	74.77	(\pm 1.84)
Control positivo, Vincristina (250 $\mu\text{g/mL}$)	84.91	(\pm 1.22)

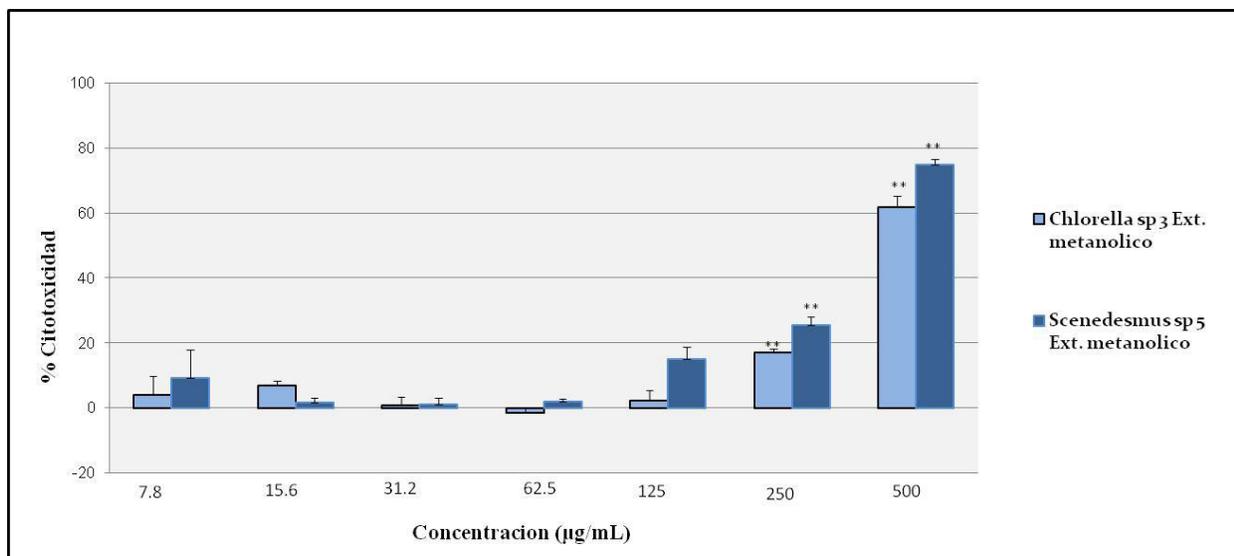


Figura 13. Actividad citotóxica dosis-respuesta dependiente después de probar 6 concentraciones (7.8 - 500 $\mu\text{g/mL}$) de extractos metanólicos obtenidos por Soxhlet de la microalgas *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp. contra la línea celular L5178YR *in vitro*. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ comparado con el control sin tratar.

7.7 ACTIVIDAD APOPTÓTICA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE MICROALGAS VS L5178Y-R.

7.7.1 Actividad apoptótica de los extractos metanólicos de microalgas por medio de tinción con de naranja de acridina y bromuro de etidio.

Como se describió en el apartado de metodología, se realizó la tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio, esto con la finalidad de observar el porcentaje de células que entran en apoptosis tras 24 h de estar en contacto con los extractos metanólicos de los aislamientos de *Chlorella* sp. (3) y *Scenedesmus* sp. (5) a una concentración de 500 µg/mL. Se observó que ambos extractos metanólicos causan muerte celular en la línea L5178Y-R, principalmente por apoptosis. Específicamente, *Chlorella* sp. causó apoptosis a un 65.72% (\pm 3.17) y necrosis a solamente 9.02 % (\pm 0.54) del total de las células tratadas. Por su parte, *Scenedesmus* sp causó apoptosis a un 50.91 % (\pm 0.04) y necrosis a un 3.1 % (\pm 0.74), como se observa en la figura 14, en donde también se graficaron los resultados obtenidos al tratar las células con actinomicina D (control positivo) y las células sin recibir tratamiento (control negativo).

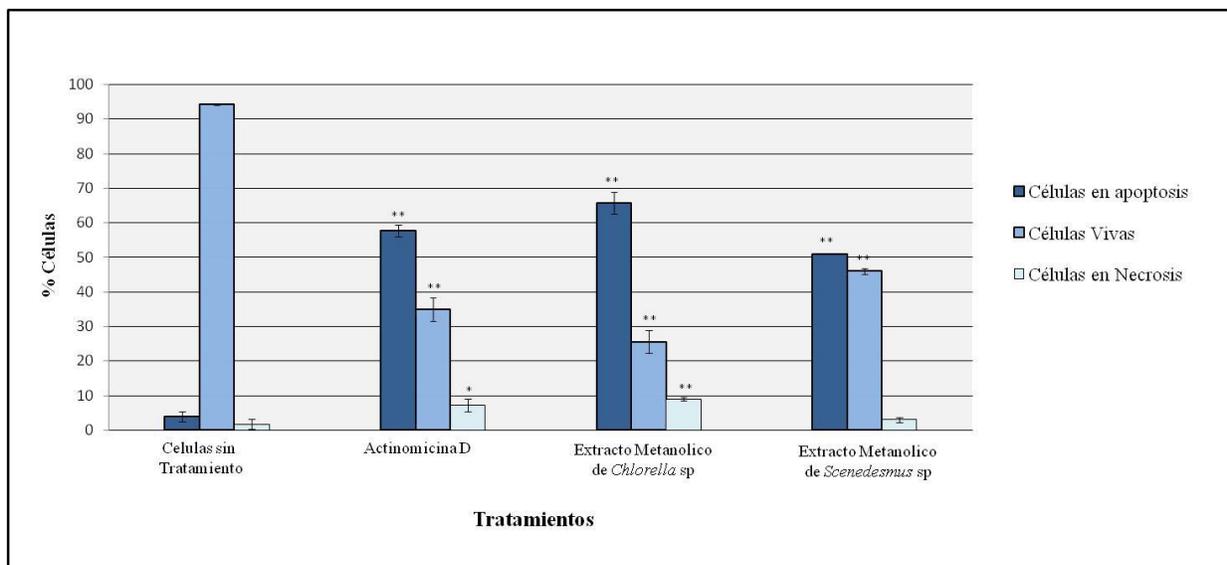


Figura 14. Porcentaje de células L5178Y-Rvivas, apoptóticas o necróticas, posterior al tratamiento por 24 horas con metanólicos de los aislamientos de *Chlorella* sp. (3) y *Scenedesmus* sp. (5) (500µg/mL) o con actinomicina D (20µg/mL) como control positivo. Las células fueron teñidas con tinción de naranja de acridina y bromuro de etidio. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ comparado con el control sin tratar.

7.7.2 Actividad apoptótica de los extractos metanólicos por medio de electroforesis en gel de agarosa.

Al igual que lo mencionado en el apartado de metodología, cuando las células entran en proceso de apoptosis, su ADN se degrada mostrando un patrón de escalera de múltiplos de aproximadamente 200 pares de bases, los cuales pueden ser observados al extraer el DNA y realizar una electroforesis en gel de agarosa. El análisis del DNA obtenido de la línea L5178Y-R tratada con los extractos de *Chlorella* sp. (3) y *Scenedesmus* sp. (5), como se puede ver en la figura 15. Los resultados mostraron que el ADN de las células de la línea L5178Y-R presentaron el patrón antes mencionado después de haber sido tratadas por 24 h con extractos metanólicos de ambos aislamientos de microalgas, comparable a los resultados obtenidos con actinomicina D que se utilizó como control positivo. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular de 100 pb, en los carriles 4 y 5 se observan las células tratadas con los extractos metanólicos de las microalgas y en el carril 6 las células tratadas con actinomicina D.

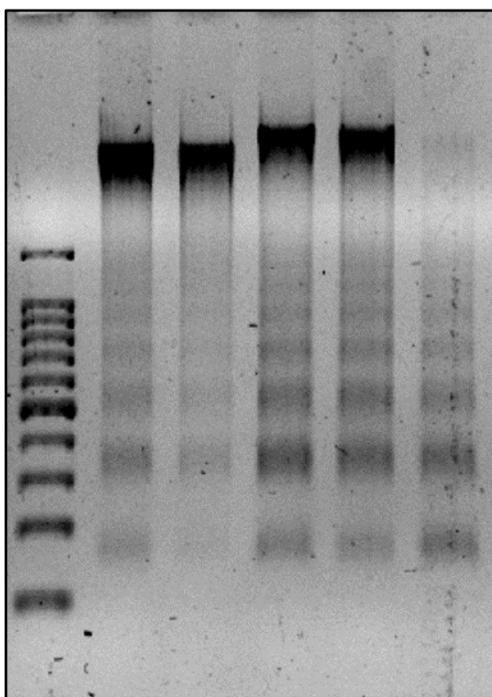


Figura 15. Gel de agarosa con DNA proveniente de la línea L5178Y- R después del tratamiento con extractos metanólicos

7.8 ACTIVIDAD LINFOPROLIFERATIVA DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS EN CONTRA DE LINFOCITOS DE TIMO DE RATÓN

Para la evaluación de la actividad inmunomoduladora de los extractos metanólicos de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. sobre la proliferación de células de timo, se empleó el método colorimétrico de MTT, en el cual las células se sometieron a diluciones seriadas del extracto, utilizando un mitógeno estimulante (concanavalina A). Al analizar la actividad de los extractos sobre la proliferación de los linfocitos de timo, los resultados no mostraron diferencia significativa entre los tratamientos con los extractos metanólicos en contra los linfocitos de timo, tanto en ausencia o presencia del mitógeno (Tabla VII y Figuras 16 y 17)

Tabla VIII. Efecto de los extractos metanólicos de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. sobre la viabilidad de linfocitos de timo *in vitro*.

Concentración del extracto (µg/mL)	Concanavalina A (µg/mL)	Viabilidad (%) con el extracto metanólico <i>Chlorella</i> sp.	Viabilidad (%) con el extracto metanólico <i>Scenedesmus</i> sp.
7.81	2.4	96.83 (± 1.71)	98.88 (± 2.84)
	0	95.81 (± 3.26)	99.22 (± 1.20)
15.62	2.4	97.36 (± 0.71)	96.96 (± 2.68)
	0	96.89 (± 2.58)	96.09 (± 1.65)
31.25	2.4	91.24 (± 3.30)	98.47 (± 2.01)
	0	95.35 (± 2.08)	98.00 (± 4.30)
62.5	2.4	81.09 (± 5.42)	97.19 (± 1.72)
	0	85.07 (± 1.27)	89.19 (± 2.97)
125	2.4	80.54 (± 5.00)	92.59 (± 4.71)
	0	83.07 (± 1.02)	81.93 (± 2.32)
250	2.4	60.52 (± 3.44)	71.51 (± 8.02)
	0	71.78 (± 1.29)	76.84 (± 1.27)
500	2.4	53.71 (± 3.55)	57.20 (± 0.10)
	0	73.89 (± 2.71)	80.81 (± 2.17)

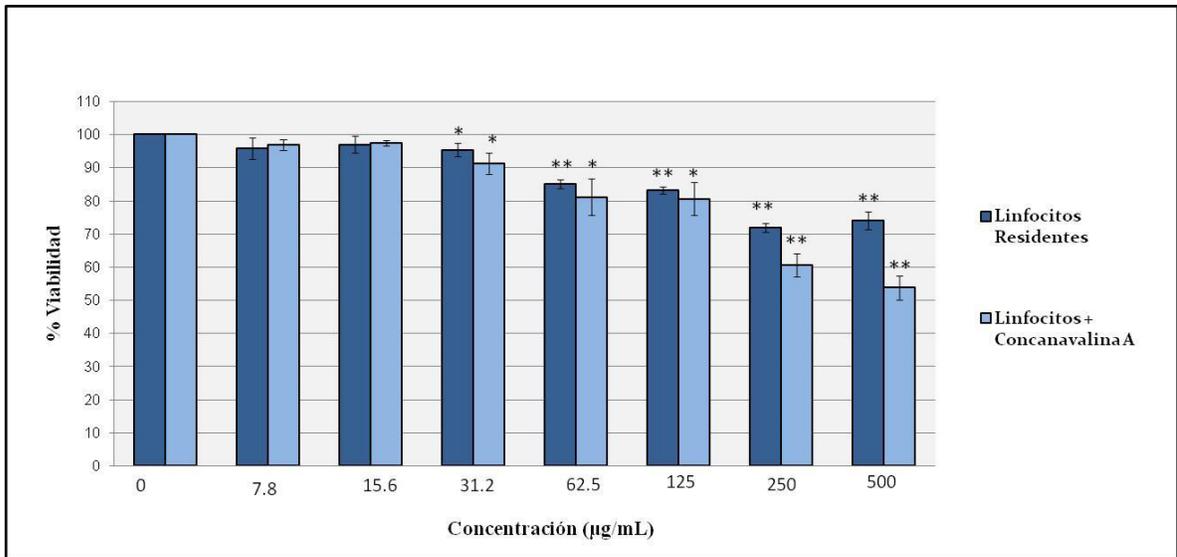


Figura 16. Linfoproliferación de linfocitos de timo de ratón (1×10^7 células/mL) después de probarse contra 6 concentraciones (7.8 - 500 µg/mL) del extracto metanólico de *Chlorella sp. (3)* en presencia y ausencia del mitógeno. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ comparado con el control sin tratar.

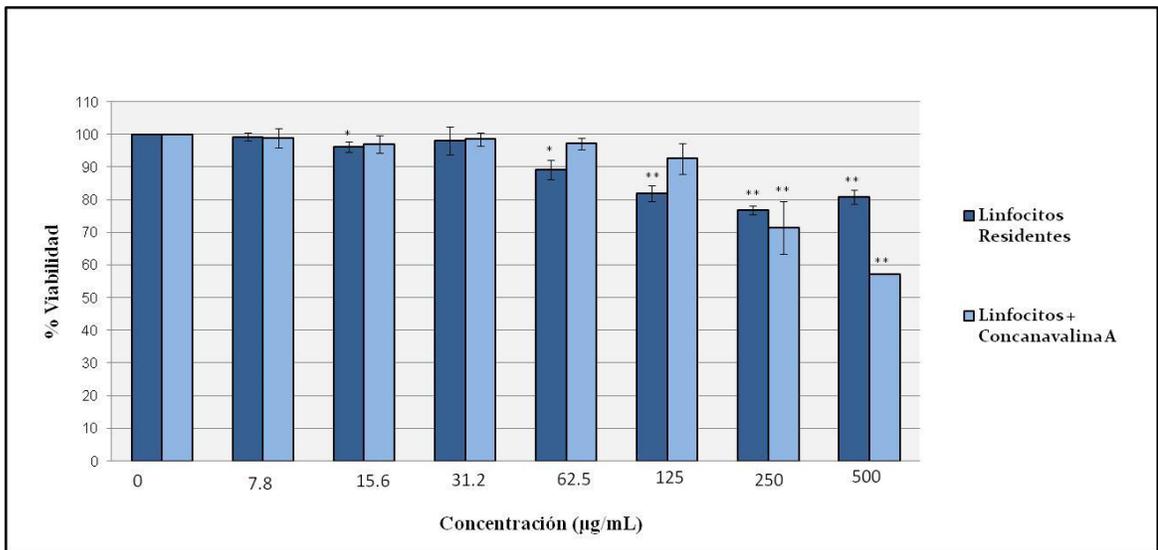


Figura 17. Linfoproliferación de linfocitos de timo de ratón (1×10^7 células/mL) después de probarse contra 6 concentraciones (7.8 - 500 µg/mL) del extracto metanólico de *Scenedesmus sp. (3)* en presencia y ausencia del mitógeno. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ comparado con el control sin tratar.

8. DISCUSIÓN

Los fármacos consumidos en la actualidad son en su mayoría derivados de productos naturales, ha sido demostrado que las microalgas tienen la capacidad de sintetizar una gran cantidad de compuestos bioactivos con capacidad potencial para el tratamiento del cáncer. Si bien hoy contamos con fármacos aprobados para el tratamiento de esta enfermedad existe resistencia a muchos de éstos, así como efectos secundarios devastadores en los pacientes, es por eso que nos dimos a la tarea de encontrar, aislar, purificar y evaluar el potencial de los aislamientos de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. obtenidos de cuerpos de agua del estado de Nuevo León, con el fin de buscar nuevas alternativas de origen natural para el tratamiento de dicha enfermedad.

Hasta nuestro conocimiento este es el primer trabajo en el norte de México en el que se logran aislar, purificar e identificar microalgas de los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus* con la finalidad de evaluar su capacidad terapéutica en contra de una línea celular de cáncer. Si bien hay algunos otros trabajos realizados en Nuevo León en los cuales se involucra el empleo de microalgas esto se ha hecho con fines de biorremediación, producción de biodiesel o simplemente para su caracterización y estudio morfológico (Garza-Gonzalez, 2005; Aguirre Cavazos, 2013; Reyna-Martínez y col., 2014).

El cultivo de los aislamientos de los géneros de *Chlorella* y *Scenedesmus* aislados durante el presente proyecto logró ser escalado en fotobiorreactores cerrados con luz artificial bajo condiciones previamente establecidas por el equipo de trabajo del Dr. Ulrico López, obteniendo una producción de biomasa seca de *Chlorella* sp. de 11.21 g. o 0.24 (\pm 0.01) g/ L. Por su parte, *Scenedesmus* sp. produjo ligeramente mayor biomasa, alcanzando 13.74 g de biomasa seca ó 0.30 (\pm 0.01) g/L. Dichos resultados fueron suficientes para obtener la biomasa requerida para llevar a cabo la extracción por método Soxhlet cumpliendo así con dicho objetivo del presente trabajo, sin embargo si se quisiera llevar este escalamiento al siguiente nivel tendríamos que optimizar las condiciones de crecimiento para cada uno de los aislamientos, ya que nuestros resultados se quedan cortos en relación a otros reportes, en los cuales mencionan alcanzar rendimientos mayores a 1.5 g/L/día (Ugwu y col., 2008).

Posterior al escalamiento de la producción de biomasa, se logró demostrar que los extractos metanólicos de los aislamientos de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. tienen actividad citotóxica significativa de manera dosis/respuesta dependiente *in vitro* en contra de la línea celular de cáncer murino L5178Y-R, obteniendo porcentajes de citotoxicidad de 61.89 (\pm 3.26) con el extracto metanólico de *Chlorella* sp., y de 74.77 (\pm 1.84) ambos a una concentración de 500 μ g/mL. Si bien estos resultados no pueden compararse aun con la potencia de la vincristina, las concentraciones y citotoxicidades obtenidas pueden equipararse a lo reportado por algunos otros autores ya que indican citotoxicidades *in vitro* del 50% en contra de líneas de cáncer cérvico uterino y de cáncer de mama utilizando extractos crudos acuosos o metanólicos de aislamientos de *Chlorella* a concentraciones de entre los 500 μ g/mL y los 1.6 mg/mL (Yusof y col., 2010; Kyadari y col., 2013).

Durante la presente investigación se logró constatar también que los extractos de los aislamientos de las microalgas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. causan muerte celular a la línea L5178Y-R por medio de apoptosis, esto se determinó mediante 2 métodos distintos; por medio de la tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio, así como por el método de extracción del ADN y observación del patrón de escalera. Por el primer método se pudo observar apoptosis en el 65.72 % (\pm 3.17) de las células tratadas con el extracto metanólico de *Chlorella* sp., y en 50.91 % (\pm 0.04) de las células tratadas con el extracto de *Scenedesmus* sp.; mientras que por el segundo método, se pudo observar claramente el patrón de escalera de ADN típico de las células que presentan apoptosis debido a la activación de DNAasa por medio de las caspasas, lo cual genera fragmentos de longitudes aproximadas a 180-200 pb, formándose así el patrón escalonado fácilmente reconocible mediante electroforesis en gel de agarosa (Nicholson y col., 1997; Nagata, 2000), lo cual es bien reconocido y típico marcador bioquímico de las fases tardías de la apoptosis (Zhou y col., 2003). Para ambos métodos los resultados resultaron equiparables a los obtenidos con la actinomicina D que se utilizó como control negativo debido a que es bien sabido que este compuesto causa apoptosis en esta línea celular (Quintanilla-Licea y col., 2012)

Todo lo anterior es de suma importancia ya que una de las características buscadas para que un compuesto o grupo de compuestos pueda ser considerado como potencial antineoplásico es que cause muerte celular de las células tumorales por medio de apoptosis evitando así daño agudo al tejido circundante al tumor.

En el estudio de inmunomodulación se utilizaron los 2 extractos metanólicos de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp., los cuales no alteraron la viabilidad de los linfocitos sanos de timo de ratón, lo cual es un indicio que los extractos actúan de manera citotóxica en contra de las células de linfoma L5178Y-R, pero que no alteran significativamente la linfoproliferación de células normales.

9. CONCLUSIONES

En Nuevo León existen cuerpos de agua en los cuales es posible aislar, purificar e identificar microalgas de distintos géneros, esto mediante técnicas sencillas como siembra en placa de agar por estría, tratamiento de los aislamientos con medio adicionado con antibióticos y observación con microscopía óptica.

Los aislamientos de microalgas de *Chlorella* y *Scenedesmus* utilizadas en el presente estudio y provenientes de cuerpos de agua de Nuevo León pueden ser escalados a nivel semi-piloto utilizando fotobiorreactores cerrados con luz y aireación artificial obteniendo suficiente biomasa para obtener extractos crudos y/o purificar compuestos presentes en ellas.

Los extractos metanólicos de las microalgas utilizadas en este proyecto de los géneros de *Chlorella* y *Scenedesmus* presentan citotoxicidad *in vitro* significativa en contra de la línea celular de cáncer murino L5178Y-R, lo cual se confirma por el método de microplaca y ensayo de MTT, aunque sin alcanzar los niveles de citotoxicidad mostrados por el control positivo vincristina.

La muerte de las células de cáncer murino de la línea L5178Y-R causada por los extractos metanólicos de las microalgas se dio por la vía de apoptosis, lo cual se confirmó por los métodos de tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio, así como por la observación del patrón de escalera del DNA obteniendo resultados similares a los mostrados en el control positivo.

Los extractos metanólicos de las microalgas de los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus* utilizadas en el presente proyecto no alteran significativamente la proliferación de los linfocitos sanos de timo de ratón *in vitro*.

10. PERSPECTIVAS

Al observar que las microalgas presentes en cuerpos de agua del estado de Nuevo León pueden ser fácilmente purificadas e identificadas, consideramos de suma importancia que en futuros trabajos se busquen nuevas fuentes de microalgas tanto en el estado de Nuevo León, así como en la región del noreste de México con el fin de aumentar el registro de estas y poder establecer colecciones de aislamientos, además de buscar nuevas fuentes de compuestos bioactivos. Consideramos también, que se tendrían que establecer y optimizar las condiciones adecuadas de escalamiento y producción de biomasa para cada una de las microalgas aisladas, variando los nutrientes, aireación e intensidad de luz.

Como se mencionó en la sección de Conclusiones, los extractos de microalgas que se utilizaron en el presente trabajo mostraron citotoxicidad contra la línea L5178Y-R pero no al grado de los obtenidos con el control positivo vincristina, esto nos da un indicio de la probabilidad de que dentro de los extractos metanólicos crudos se encuentren compuestos que pudiesen purificarse e identificarse, lo cual es fundamental para llevar a cabo el próximo nivel de experimentación y poder llevar a cabo los ensayos en una fase pre clínica *in vivo* como se ha realizado anteriormente en el laboratorio con extractos o compuestos provenientes de plantas de la región (Quintanilla-Licea y col., 2012). Esto fue considerado en un principio dentro de los objetivos del proyecto, sin embargo por causas de fuerza mayor durante el desarrollo del este no se pudo llegar a ese punto, por lo cual queda como una perspectiva.

Será de suma importancia que en caso de llevar este estudio al siguiente nivel de experimentación, en donde se incluyan ensayos *in vivo*, se analicen también los mecanismos de acción por los cuales se activa la vía de muerte celular por apoptosis, ya que otros autores mencionan aumento en el daño de ADN, así como aumento en la expresión de proteínas tales como P53, Bax, caspasa 3 y caspasa 7 (Yusof y col., 2010; Kubatka y col., 2014), pero con los experimentos realizados en el presente trabajo es difícil inferir algún mecanismo de acción que activara la muerte celular.

11. LITERATURA CITADA

1. Aguirre-Cavazos. 2013. Estudio taxonómico de microalgas productoras de lípidos intracelulares aisladas de agua dulce en el estado de Nuevo León. Tesis (Maestría), Universidad Autónoma de Nuevo León.
2. Azamai M, Sulaiman S, Habib M, Looi M, Das S, Hamid A, Ngh W, Yusof Y. 2009. *Chlorella vulgaris* triggers apoptosis in hepatocarcinogenesis induced rats. Journal of Zheijang University Science B. 10: 14 – 21. DOI: 10.1631/jzus.B0820168.
3. Bechelli J, Coppage M, Rosell K, Liesveld J. 2011. Cytotoxicity of Algae Extracts on Normal and Malignant Cells. Leukemia Research and Treatment. 3: 2 – 7. DOI: 10.4061/2011/373519.
4. Beer J, Budzicka E, Niepokojczycka E, Rosiek O, Szumiel I & Walicka M. 1983. Loss of tumorigenicity with simultaneous changes in radiosensitivity and photosensitivity during in vitro growth of L5178Y murine lymphoma cells. Cancer Research. 43: 4736-4742.
5. Belcher H, Swale E. 1976. A beginner's guide to Freshwater Algae. Institute of Terrestrial Ecology. ISBN: 0-11-881393-5
6. Bellinger E, Sigeo D. 2010. Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators. John Wiley and Sons, Ltd. ISBN: 978-0-470-05814-5. DOI: 10.1002/9780470689554.
7. Berry J, Gantar M, Gawley R, Wang M, Rein K. 2004. Pharmacology and toxicology of pahayokolide A, a metabolite from a freshwater species of *Lyngbya* isolated from the Florida Everglades. Comparative Biochemistry and Physiology – Part C, Toxicology and Pharmacology. 139: 231 – 238. DOI: 10.1016/j.cca.2004.11.005.

8. Borowitzka M. 1995. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of applied Phycology*. 7: 3 – 15. DOI: 10.1007/BF00003544.
9. Cardozo K, Guaratini T, Barros M, Falcao V, Tonon A, Lopes N, Campos S, Torres M, Souza A, Colepicolo P, Pinto E. 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 146: 60 – 78. DOI: 10.1016/j.cbpc.2006.05.007
10. Chen C, Yeh K, Aisyah R, Lee D, Chang J. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource technology*. 102: 71 – 81. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.06.159.
11. Chlipala G, Mo S, Orjala J. 2011. Chemodiversity in freshwater and terrestrial cyanobacteria – A source for drug discovery. *Current Drug Targets*. 12: 1654 – 1673.
12. Coligan J, Kruisbeek A, Margulis D, Savach E, Strower W. 1995. *Current protocols in Immunology*. Jhon Wiley, ISBN: 978-0-471-52276-8
13. Cowan M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 564-582.
14. Elizondo-Gonzalez R, Cruz-Suarez E, Ricque-Marie D, Mendoza-Gamboa E, Rodriguez-Padilla C, Trejo-Avila L. 2012. *In vitro* characterization of the antiviral activity of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* against Newcastle Disease Virus. *Virology Journal*. 9: 307 – 316. DOI: 10.1186/1743-422X-9-307.
15. Garduño-Solórzano G, Rodríguez-Palacio M, Martínez-García M, Quintanar-Zúñiga R, Lozano-Ramírez C, Campos-Contreras J, Monsalvo-Reyes A. 2011. Cultivos de Microalgas del lago Catemaco, Veracruz. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*. 2: 67 – 80.

16. Garza-Gonzalez T. 2005. Aislamiento de microorganismos con alta capacidad de tolerar y remover Pb(II), Cr (VI), Cd (II), Cu (II), Zn (II) y Ni (II). Tesis (Doctorado), Universidad de la Habana, Cuba.
17. Goldsby R, Kindt T, Osbourne B & Kuby J. 2002. Cancer and the Immune System. Immunology. H. Freeman and company U.S.A.: 499-522
18. Gomez-Flores R., Caballero-Hernández D, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C, Tamez-Guerra P., Rice CK, Hicks ME, Weber RJ. 2005. Increased Survival of Tumor-bearing Mice by the Delta Opioid SNC 80. Anticancer Research 25:4563-4568.
19. Graham J, Graham L, Wilcox L. 2008. Algae. Second Edition. Prentice Hall.
20. Guedes A, Amaro H, Malcata F. 2011. Microalgae as Sources of Carotenoids. Marine Drugs. 9: 625 – 644. DOI: 10.3390/md9040625.
21. Ismail M, Ali D, Fernando A, Abdraboh M, Gaur R, Ibrahim W, Raj M, Ouhtit A. 2009. Chemoprevention of rat liver toxicity and carcinogenesis by *Spirulina*. International Journal of Biological Sciences. 4: 377 – 387.
22. Jessani N, Niessen S, Mueller B, Cravatt B. 2005. Breast Cancer Cell Lines Grown *in vivo*, What goes in isn't always the same as what comes out. Cell Cycle. 4: 82 – 84.
23. Kubatka P, Kapinova A, Kruzliak P, Kello M, Vybohova D, Kajo K, Novak M, Chripkova M, Adamkov M, Pec M, Mojzis J, Bojkova B, Kassayova M, Stollarova M, Dobrota D. 2014. Antineoplastic effects of *Chlorella pyrenoidosa* in the breast cancer Model. Basic Nutritional Investigation. 31: 560 - 569. DOI: 10.1016/j.nut.2014.08.010.

24. Kyadari M, Fatma T, Azad R, Velpandian T. 2013. Evaluation of antiangiogenic and antiproliferative potential of the organic extract of green algae *Chlorella pyrenoidosa*. *Indian Journal of Pharmacology*. 45: 569 - 574. DOI: 10.4103/0253-7613.121366.
25. Loera-Quezada, Olguin E. 2010. Las microalgas oleaginosas como productoras de biodiesel: retos y oportunidades. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Algal*. 1: 91 – 116
26. López-Chuken U, Young S, Guzman-Mar L. 2010. Evaluating a ‘bioticligand model’ applied to chloride-enhanced Cd uptake by *Brassica juncea* from nutrient solution at constant Cd²⁺ activity. *Environmental Technology*. 31: 307 –318. DOI: 10.1080/09593330903470685.
27. Lordan S, Ross P, Stanton C. 2011. Marine Bioactives as Functional Food Ingredients: Potential to Reduce the Incidence of Chronic Diseases. *Marine Drugs*. 9: 1056 – 1100. DOI: 10.3390/md9061056.
28. Martins R, Ramos M, Herfindal L, Sousa J, Skaerven K, Vasconcelos V. 2008. Antimicrobial and Cytotoxic Assesment of Marine Cyanobacteria – *Synechocystis* and *Synechococcus*. *Marine Drugs*. 6: 1 – 11.
29. Mata T, Martins A, Caetano N. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14: 217 – 232.
30. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods*. 65:55–63.
31. Nagata S. 2000. Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental Cell Research*; 256: 12-18.

32. Nicholson DW, Thornberry NA. 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochemical Science*; 22: 299-306.
33. Oftedal L, Skjaerven H, Coyne R, Edvarsen B, Rohrlack T, Skulberg Olav, Doskeland S, Herfindal L. 2010. The apoptosis inducing activity towards leukemia and lymphoma cells in a cyanobacterial culture collection is not associated with mouse bioassay toxicity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 38: 489 – 501. DOI: 10.1007/s10295-010-0791-9.
34. Organización Mundial de la Salud. 2013. Cáncer – Datos y cifras [Online]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
35. Pasquet V, Morisset P, Ihammouine S, Chepied A, Aumailley L, Berard J, Serive B, Kaas R, Lanelluc I, Thiery V, Lafferriere M, Piot J, Patrice T, Cadoret J, Picot L. 2011. Antiproliferative Activity of Violaxanthin Isolated From Bioguided Fractionation of *Dunalliella tertiolecta* extracts. *Marine Drugs*. 9: 819 - 831. DOI: 10.3390/md9050819.
36. Prescott L, Harley J, Klein D. 2002. *Microbiology Fifth Edition*. The McGraw-Hill Companies.
37. Pulz O. 2001. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology & Biotechnology*. 57: 287 – 293. DOI: 10.1007/s002530100702.
38. Qian F, Hanahan D & Weissman L. 2001. L- Selectin can facilitate metastasis to lymph nodes in transgenic mouse model of carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 27: 3976-3981. DOI: 10.1073/pnas.061633698.

39. Quintanilla-Licea R, Morado-Castillo R, Gomez-Flores R, Laatsch H, Verde-Star J, Hernandez-Martinez H, Tamez-Guerra P, Tamez-Guerra R, Rodriguez-Padilla C. 2012. Bioassay-Guided Isolation and Identification of Cytotoxic Compounds from *Gymnosperma glutinosum* Leaves. *Molecules*. 17: 11229 - 11241. DOI: 10.3390/molecules170911229.
40. Reyna-Martínez R, Gomez-Flores R, López-Chuken U, González-González R, Fernández-Delgadillo S, Balderas-Rentería I. 2014. Lipid Production by Pure and Mixed Cultures of *Chlorella pyrenoidosa* and *Rhodotorula mucilaginosa* Isolated in Nuevo Leon, Mexico. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 175: 354 -359. DOI: 10.1007/s12010-014-1275-6.
41. Rodolfi L, Zitelli G, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici M. 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 102: 100 – 102. DOI: 10.1002/bit.22033.
42. Sánchez-Torres L, Vargas F. 2003. Apoptosis: el fenómeno y su determinación. *Técnica Pecuaria en México*. 41: 49 – 62.
43. Shalaby E. 2011. Algae as promising organisms for environment and health. *Plant signaling and behavior*. 9: 1338 – 1350. DOI: 10.4161/psb.6.9.16779.
44. Teas J, Irhimeh R. 2012. Dietary algae and HIV/AIDS: proof of concept clinical data. *Journal of Applied Phycology*. 24: 575 – 582. DOI: 10.1007/s10811-011-9766-0.
45. Ugwu C, Aoyagi H, Uchiyama H. 2008. Photobioreactors for mass cultivation of microalgae. *Bioresource Technology*. 99: 4021 - 4028. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.01.046.

46. Van-Bureen S, Taylor J, Gerber A, Van-Ginkel C. 2006. Easy identification of the most common freshwater algae. A guide for the identification of microscopic algae in South African freshwater. North-West University Potchefstroom. ISBN: 0-621-35471-6.
47. Viramontes-Ramos S, Portillo-Ruiz M. 2009. Atlas para la identificación de algas y protozoos de vida libre. Colección de textos universitarios. ISBN: 978-970-748-088-9.
48. Yusof Y, Saad S, Makpol S, Shaaman N, Ngah W. 2010. Hot water extract of *Chlorella vulgaris* induced DNA damage and apoptosis. *Clinics*. 65(12): 1371 – 1377. DOI: 10.1590/S1807-59322010001200023.
49. Zhou BR, Gumenscheimer M, Freudenberg M., Galanos C. 2003. A striking correlation between lethal activity and apoptotic DNA fragmentation of liver in response of D-galactosamine-sensitized mice to a non-lethal amount of lipopolysaccharide¹. *Acta Pharmacol Sinica*. 24 (3): 193-198.

APÉNDICE A, LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

UV	Ultra Violeta
CO ₂	Dióxido de Carbono
ISO	International Organization for Standarization
OMS	Organización Mundial de la Salud
mM	Mili Molar
μM	Micro Molar
pM	Pico Molar
Nm	Nano Metro
UI	Unidades Internacionales
Cels	Células
L	Litros
mL	Mililitro
pH	Potencial de Hidrógeno
Kg	Kilogramo
h	Horas
Min	Minutos
Mg	Miligramos
G	Gramos
Rpm	Revoluciones por Minuto
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Pb	Pares de Bases
μL	Microlitros

APÉNDICE B, PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

Solución de sales para algas: Para preparar 1 L, se colocan 900 mL de agua desionizada en un recipiente, se agregan 5 mL de la solución A, 5 mL de la solución B, 1 mL de la solución C, y 4 mL de la solución D, se agita manualmente y se afora a 1 L. Se esteriliza por calor húmedo a 103.5 kPa por 15 min. La solución se almacena en refrigeración a 4°C hasta su posterior uso.

Medio semisólido para el mantenimiento de algas: Se agregan los compuestos y soluciones de la misma manera que la solución de sales para algas, se agrega 15 g de agar bacteriológico y se disuelve con ayuda de un agitador magnético y calor. Se esteriliza por calor húmedo a 103.5 kPa por 15 min y justo después de esterilizarse se coloca en placas de Petri estériles y se almacenan en refrigeración a 4°C hasta su posterior uso.

Medio RPMI 1640: Se pesan 10.2 g de medio RPMI 1640 en polvo y se disuelven en 950mL de H₂O destilada; se pesan 2g de bicarbonato de sodio y se disuelven en 50mL de H₂O destilada, y a esta se le añaden 10mL de antibióticos (penicilina, estreptomina, anfotericina) y 10 µL de L-glutamina, ambas soluciones se mezclan y se esteriliza por medio de filtración con vacío.

MTT: Se disolvió 250mg de MTT en polvo en 50mL de PBS, para que se ajuste a 5mg/mL, después se esterilizó con filtro de 0.22 µm, se guarda en refrigeración y se cubre de la luz.

PBS: Se disolvió 1.48g de Na₂HPO₄ en 1l de H₂O destilada, y se le agregó 0.43g de NaH₂PO₄ y 7.2g de NaCl, se esterilizó en autoclave.

Resumen Autobiográfico

Candidato para el grado de:

Doctor en Ciencias con Acentuación en Microbiología

Tesis:

“AISLAMIENTO DE MICROALGAS DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL CONTRA EL LINFOMA MURINO L5178Y-R”

Campo de estudio: Microbiología

Biografía:

Datos personales: Nacido en San Nicolás de los Garza N.L, el 10 de Agosto de 1988, hijo de Gustavo Raúl Reyna Sánchez y María Guadalupe Martínez Monsiváis.

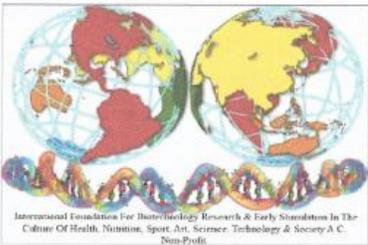
Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grados obtenidos: Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo en 2008, Maestría en Ciencias con Acentuación en Microbiología en 2012.

Publicaciones: Gomez-Flores, R., **Reyna-Martinez,R.**, Tamez-Guerra, P., Quintanilla-Licea, R. 2012. Antibacterial activity of *Oenothera rosea* (L 'Hér) leaf extracts. 2012.British Journal of Medicine and Medical Research. 2 (3): 396-404. ISSN: 2231-0614.<http://www.sciencedomain.org/issue.php?iid=120&id=12>.

Reyna-Martínez R, Gomez-Flores R, López-Chuken U, González-González R, Fernández-Delgadillo S, Balderas-Rentería I. 2014. Lipid Production by Pure and Mixed Cultures of *Chlorella pyrenoidosa* and *Rhodotorula mucilaginosa* Isolated in Nuevo Leon, Mexico. Applied Biochemistry and Biotechnology. 175: 354 -359. DOI: 10.1007/s12010-014-1275-6.

PRODUCTOS ENTREGABLES

Participación en: Biotechnology Summit 2014 en modalidad de cartel del 8 al 10 de Octubre de 2014, en Huatulco, México.



International Foundation for Biotechnology Research & Early Stimulation in the Culture of Health, Nutrition, Sport, Art, Science, Technology & Society A.C. Non-Profit

Certifies that

Raúl Reyna-Martínez, Diana E. Caballero-Hernández, Ulrico Lopez, Ricardo Gomez-Flores and Patricia Tamez-Guerra presented the poster "Chlorella sp. and Scenedesmus sp. Microalgae Cytotoxic Activity against L5178Y-R Murine Lymphoma Cells"

In the **Biotechnology Summit 2014**
October 08-10, 2014, Santa María Huatulco, México.

Susana Lozano
DRA. SUSANA LOZANO MUÑOZ
International Biotechnology Foundation

"Among individuals as among nations, respect for the right of others is peace"

