

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL Y
ANTIVIRAL *in vitro* DE LA PRODIGIOSINA PRODUCIDA
POR *Serratia marcescens***

Por

Q.B.P. ADELA SÁNCHEZ OSEGUERA

Como requisito parcial para obtener el Grado académico de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con orientación en **Microbiología
Aplicada**

JULIO, 2017.

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL Y ANTIVIRAL *in vitro* DE
LA PRODIGIOSINA PRODUCIDA POR *Serratia marcescens***

Comisión de tesis:

Dra. Pilar C. Morales San Claudio
Director de tesis

Dr. E. Allan Blanco Gámez
Co-director

Dr. Ernesto Torres López
Co-director externo:

Comité tutorial:

Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño

Dr. Ulrico J. López Chuken

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL Y ANTIVIRAL *in vitro* DE
LA PRODIGIOSINA PRODUCIDA POR *Serratia marcescens***

Aprobación de tesis:

**Dra. Pilar C. Morales San Claudio
Presidente**

**DR. Juan Francisco Villarreal Chiu
Secretario**

**Dr. Ulrico J. López Chuken
Vocal**

**DRA. MA. ARACELI HERNÁNDEZ RAMÍREZ
Sub-Directora de Estudios de Posgrado**

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL Y ANTIVIRAL *in vitro* DE LA PRODIGIOSINA PRODUCIDA POR *Serratia marcescens*

Presentado por:

Q.B.P. ADELA SÁNCHEZ OSEGUERA

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Biotecnología 1, de Biología Molecular y el de Ingeniería Genética de la Facultad de Ciencias Químicas, en el laboratorio de Inmunovirología del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina, ambas Facultades pertenecientes de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Pilar C. Morales San Claudio, co-dirección del Dr. E. Allan Blanco Gámez y del Dr. Ernesto Torres López.

Se contó con la valiosa colaboración del Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu, Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño, Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera, Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza.

Y con el apoyo de CONACYT por la beca brindada.

Directora:

Dra. Pilar C. Morales San Claudio

Co-director:

Co-director:

Dr. E. Allan Blanco Gámez

Dr. Ernesto Torres López

Nuestra recompensa se encuentra
en el **esfuerzo**, no en el resultado.
Un esfuerzo total es una
Victoria completa.
Mahatma Gandhi

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle a la persona que a lo largo de este sueño me brindo su amistad y me brindo su conocimiento la Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio, le doy las gracias por su paciencia, consejos y dedicación durante el desarrollo de la tesis. Y sobre todo agradezco que me permitiera desarrollar mi tesis bajo su dirección.

A Facultad de Medicina, Departamento de Inmunología, Laboratorio de Inmunovirología principalmente al Dr. Ernesto Torres López por el tiempo que me atendió para el desarrollo de la tesis y también sus consejos que fueron de mucha ayuda.

A la Dra. Monica, el Dr. Eder y el Dr. Isaias por acogerme en su grupo de trabajo por las atenciones que tuvieron, por los puntos de vista en cuestiones de la tesis. Les estaré agradecida por todo eso.

A mi comité tutorial Dr. Francisco, Dr. Alberto, Dr. Allan, Dr. Ulrico por su corrección en el escrito y sus ideas aportada para la mejora de nuestro trabajo de tesis, quiero decirles que no todos con el grado de Doctores muy buenos en su trabajo y ustedes todo el tiempo estaban alegres, con pasión en lo que realizan. De ante mano muchas gracias.

A la Dra. Ma. Elena Cantú quiero agradecer sus atenciones, su tiempo y la oportunidad de aceptarme dentro del patrón de estudios de Posgrado, por su tiempo para los trámites de la beca y sobre todo por su aportación del conocimiento durante las clases y durante el desarrollo de la tesis.

Al M.C Carlos Zacarías quiero agradecerle por responder siempre a las cuestiones y curiosidades, por la aportación a mi trabajo de tesis, de ante mano muchas gracias.

A mis compañeros de los múltiples laboratorios en los que trabaje por sus aportaciones de conocimiento, su tiempo para realizar el trabajo de tesis y su ayuda muchas gracias; Dalia, Mariana, Alejandra, Leonel, Ángeles, Ávila, Yuridia, Elizabeth, Jesús, Zacatecas, Jorge, Adriana.

A mis compañeros del posgrado Zulem, Alejandra, Anahid y Brayan por todo el tiempo que convivimos en el avance de nuestros conocimientos.

A CONACYT por la beca otorgada la cual contribuyo al sustento del desarrollo de este gran sueño.

DEDICATORIA

Quiero dedicarles este éxito en mi vida a mis padres **Juana Oseguera Gómez** y **Fulgencio Othón Sánchez Riaño** ustedes con su amor, cariño, comprensión, amistad, conversaciones, entre tantas cosas que me brindaron para poder guiarme por el mejor camino, de las difíciles decisiones de mi vida.

A mi Hermano **Jesús Sánchez Oseguera** porque gracias a tu ejemplo de vida estoy cumpliendo una meta más en la vida, un sueño que hace tiempo se veía muy lejos y hoy lo he culminado.

A mi hermanito menor **Juan Iyair Sánchez Oseguera** por su ayuda incondicional que siempre me ha brindado su entusiasmo y alegría.

A mi hermanito adoptado Jorge Mora Ruiz porque tiene las ocurrencias más locas y siempre me hace sentir como su ejemplo a seguir.

A mi abuelito Mucio Oseguera Gómez porque siempre estuvo al pendiente de mi formación profesional, por su apoyo y sus consejos.

A mis amigos Daniela Meza, Juan Carlos, Miguel, Ana María, Diana y Miriam gracias por su apoyo en todo este tiempo, ustedes me dieron consejos de seguir adelante y nunca abandonar mi sueño, gracias a sus consejos, apoyo incondicional y su cariño.

Sé que ya nos acompaña en este mundo pero no podía dejar de agradecerle y dedicarle este éxito en mi vida aún recuerdo las palabras que me dio para el resto de ella. ***Nunca dejes de soñar los sueños son parte de ti. Haz todo lo que este en tus manos para convertirlos en realidad mediante el rumbo que le des a Tú vida.*** Y así con estas palabras escritas fueron el aliento a seguir durante este tiempo, sé que era adolescente y como todo tuve mis complicaciones pero usted veía algo más que desde mi alcance era tal cortó. Pero usted marco mi vida desde la adolescencia y me animo a seguirla con entusiasmo ya alegría, gracias Profe. Carlos Francisco.

Con cariño y Amor Ade.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO	PAG.
ÍNDICE DE CONTENIDO	I
ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE GRÁFICAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	V
BREVIATURAS Y SÍMBOLOS	VI
RESUMEN	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 AGENTES BIOACTIVOS DE ORIGEN MICROBIANO	3
1.1.1 <i>Serratia marcescens</i>	3
1.1.2 Prodigiosina	4
1.1.3 Biosíntesis de la PG	4
1.1.4 Localización celular y funciones de la PG	5
1.1.5 Otros microorganismos productores de PG	7
1.2. EL CÁNCER	8
1.2.1 Epidemiología del cáncer	8
1.2.2 Tratamientos y resistencia del cáncer	9
1.3. VIRUS DEL HERPES SIMPLE TIPO 1	10
1.3.1 Situación actual del VHS-1	10
1.3.2 Características de la Infección del virus	11
1.3.3 Tratamientos y su resistencia del VHS-1	11
1.4 JUSTIFICACIÓN	12
1.5 ANTECEDENTES	
1.5.1 Actividad antitumoral de la PG	13
1.5.1.1 Mecanismo de acción en la actividad antitumoral	15
1.5.2 Metabolitos con actividad antiviral	
1.5.2.1 Actividad antiviral de la violaceína	16
1.5.2.2 Actividad antiviral de la PG	16
1.6 APORTACIÓN CIENTÍFICA	17
1.7 HIPÓTESIS	17
1.8 OBJETIVOS	
1.8.1 Objetivo general	18
1.8.2 Objetivos específicos	18
2. MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 Crecimiento de <i>Serratia marcescens</i> y producción de la PG	19
2.1.1 Purificación de la PG	20

2.1.2	Preparación de la molécula de la PG para la determinación de las actividades biológicas	20
2.2	Cultivos y condiciones de crecimiento de las células	21
2.2.1	Ensayo de citotoxicidad de la PG en la línea celular Vero	21
2.2.2	Ensayo citotóxico de la PG en las líneas celulares tumorales HT-29 y SiHa	23
2.3	Cuantificación de las partículas virales por titulación viral	24
2.3.1	Determinación de la actividad antiviral de la PG	26
2.4	Análisis estadísticos	27
3. RESULTADOS		
3.1	Obtención, purificación y caracterización de la PG	28
3.2	Citotoxicidad en la línea celular Vero	32
3.3	Actividad citotóxica de la prodigiosina en las líneas celulares tumorales HT-29 y SiHa	35
3.4	Cuantificación de las partículas virales mediante la titulación del virus	40
3.5	Actividad antiviral de la PG en las células Vero en un modelo de infección con el VHS-1	44
4. DISCUSIÓN		
47		
5. CONCLUSIONES		
54		
6. PERSPECTIVAS		
55		
REFERENCIAS		
56		
APÉNDICES		
APÉNDICE A		
63		
APÉNDICE B		
64		
APÉNDICE C		
65		

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	PAG.
1. Análisis de varianza (Anova) de Citotoxicidad de la PG en Vero	34
2. Análisis de varianza (Anova) de la Actividad Citotóxica de la PG en HT-29	37
3. Análisis de varianza (Anova) de la Actividad Citotóxica de la PG en SiHa	39
4. Análisis de varianza (Anova) de la Actividad Antiviral	46

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA	PAG.
1. Citotoxicidad de la PG en la línea celular Vero a las 24 h, 48 h y 72 h	34
2. Actividad citotóxica de la prodigiosina en la línea celular HT-29 a las 72 h	36
3. Comparación de la bioactividad citotóxica de la PG y VCR en las células HT-29 a las 72 h	37
4. Actividad citotóxica de la prodigiosina en la línea celular SiHa a las 72 h.	38
5. Comparación de la actividad citotóxica de la PG y VCR en las células SiHa a las 72 h	39
6. Actividad antiviral de la PG contra el VHS-1 a 72 h	46

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PAG.
1. Estructura de la Prodigiosina	4
2. Ruta biosintética bifurcada de Prodigiosina	5
3. Estructura del virus del Herpes	10
4. Mecanismos de acción de la Prodigiosina en el cancer	15
5. Representación de la placa de 96 pozos para el ensayo de viabilidad de la línea celular Vero	22
6. Representación de la placa de 96 pozos para el ensayo citotóxico de HT-29 y SiHa	23
7. Diluciones para la cuantificación de las partículas virales por titulación viral	25
8. Esquema de la distribución de las concentraciones de la PG y los controles utilizados	26
9. Obtención y purificación de la PG	28
10. Cromatografía de capa fina de la PG	29
11. Espectro UV/vis de la PG	30
12. Espectro de IR de la PG	31
13. Análisis de la morfología celular de las células Vero	32
14. Análisis del cambio de la morfología celular de las células HT-29 y SiHa	35
15. Efecto citopático de las célula Vero con VHS-1	41
16. Formación de placas líticas a diferentes diluciones en la titulación viral	42
17. Unidades formadoras de placa	43
18. Formación de las Unidades formadoras de placa de la PG contra el VHS-1	45

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ACV	Aciclovir
ADN	Ácido desoxirribonucleico
A-DMEM	Medio basal de Eagle modificado de Dulbecco-Advance
ATCC	Colección de cultivos y cultivos americana
CCF	Cromatografía en capa fina
cm ⁻¹	Centímetros a la menos uno
CO ₂	Dióxido de carbono
Da	Daltons
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
h	Hora
HT-29	Línea celular de cáncer de colon
IgG	Inmunoglobulina G
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IR	Espectroscopia de infrarrojo
KOS	Cepa de virus de Herpes simple tipo 1
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Miliolar
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
nm	Nanometros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer fosfato salino
PG	Prodigiosina
pH	Potencial de Hidrógeno
PM	Peso molecular
R _f	Coefficiente del factor de retención
rpm	Revoluciones por minuto
SBF	Suero fetal bovino
SiHa	Línea celular de cáncer de cervix
U	Unidad

UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UV	Espectroscopia ultravioleta-visible
UFP	Unidades Formadoras de Placa
Vero	Línea celular, fibroblastos de riñón de mono verde africano
VHS-1	Virus del Herpes simple tipo 1
VCR	Vincristina
(+)	Control positivo
(-)	Control negativo
μM	Micromolar
λ	Longitud de onda

RESUMEN

Fecha de la obtención del grado: Julio 2017

Q.B.P Adela Sánchez Oseguera
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

Título de estudio:

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL Y ANTIVIRAL *in vitro* DE LA PRODIGIOSINA PRODUCIDA POR *Serratia marcescens*

Número de páginas: 65

**Candidata para el grado de Maestría en Ciencias
Con Orientación en Microbiología Aplicada**

Área de estudio: Microbiología Aplicada

Propósito y Método del Estudio: *Serratia marcescens* produce un metabolito secundario llamado prodigiosina (PG). La PG tiene distintas actividades biológicas actúa como antimicrobiano, antifúngico, antiprotozoario, antitumoral y antiviral. Estas dos últimas actividades se analizaran en el trabajo de investigación. Según la OMS el cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial y los tratamientos clásicos empleados en el cáncer han creado resistencia de las células madre cancerosas, lo que permite la persistencia de la enfermedad. Por otro lado el Virus del Herpes Simple tipo 1 (VHS-1) causa una gran variedad de trastornos patológicos, desde una infección leve hasta formar infecciones persistentes e incluso mortales. Se estima que el 80 % de la población tiene el VHS-1 y los medicamentos sintéticos empleados en el tratamiento del virus no radica el virus, además se ha registrado la aparición de nuevas cepas del virus resistente a estos fármacos principalmente en pacientes inmunocomprometidos. Se ha motivado la búsqueda de nuevas sustancias químicas de origen natural con menos efectos adversos y mayor potencia terapéutica, en el cancer y en el VHS-1.

En el presente estudio, se obtuvo la PG a partir del cultivo con medio cacahuete al 1%, además se evaluó la citotoxicidad en las células Vero. Se determinó la actividad antitumoral en las líneas celulares tumorales HT-29 y SiHa, además se evaluó la actividad antiviral de la PG contra el VHS-1. Para determinar la citotoxicidad y la actividad antitumoral se realizó con 7×10^3 células por el método de MTT y para evaluar la actividad antiviral se analizó con 0.5×10^6 células a 100 UFP por el ensayo de reducción en placa.

Contribuciones y Conclusiones: se confirmó la existencia de la prodigiosina, como molécula principal con las pruebas de cromatografía en capa fina, UV e IR. La PG tuvo un 10% de citotoxicidad en las células Vero. Adicionalmente la PG presento actividad citotóxica sobre las líneas celulares tumorales HT-29 y SiHa a la concentración de 30 μM (55.9%,64.7%), mostrando un mayor efecto citotóxico en las células HT-29. La cual podría ser una molécula selectiva para el tratamiento de este tipo de Adenocarcinoma. Por otro lado se concluyo que la PG tiene actividad antiviral a una concentración de 3.75 μM , ya que redujo hasta un 51% de la UFP líticas. Con esto podemos proponer a la PG como un candidato para un tratamiento nuevo contra el VHS-1.

Directora de la Tesis:

Dra. Pilar C. Morales San Claudio

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

A lo largo del tiempo se ha motivado la búsqueda de nuevos agentes bioactivos, los cuales causen menos efecto secundario en un organismo y estos a la vez sean productos naturales microbianos como los metabolitos secundarios (Deorukhkar *et al.*, 2007).

Un ejemplo claro de un microorganismo productor de un metabolito secundario es la bacteria *Serratia marcescens*, produce un pigmento rojo llamado prodigiosina (PG) (Venil y Lashmanperumalsamy, 2009). Y este metabolito secundario tiene distintas funciones biológicas como antimicrobiana, antifúngica, antiprotozoaria, antitumoral y además antiviral.

Es importantes señalar que el cáncer es una patología que se genera a partir de una célula anormal, este tipo de células son llamadas así por tener una alteración en crecimiento, desarrollo y reproducción (Stewart y Weinberg, 2000). La OMS reporto en el 2015 que el cáncer de colon ocupa el segundo lugar en mortalidad en el género masculino y por otro lado el cáncer de cérvix es el principal causante de la morbilidad en la mujeres (Siegel *et al.*, 2017).

Los tratamientos clásicos del cáncer es la quimioterapia y radioterapia, sin embargo en estos tratamientos es muy común que la enfermedad se vuelva persistente en el paciente, debido a que las células cancerosas resisten los tratamientos (Colvin y Mori, 2017). Es por esto que se requiere encontrar nuevos compuestos químicos con menos toxicidad en las células normales y

con mayor actividad en las células cancerígenas que los tratamientos clásicos empleados en la enfermedad del cáncer (Hassankhani *et al.*, 2015).

Por otra parte el Virus del Herpes Simple tipo 1 (VHS-1) se encuentra ampliamente distribuido por el mundo, afectando a países industrializados y se estima que el 80% de la población está infectada (Ferrándiz, 2001; Whitley y Roziman 2001). El VHS-1 causa una gran variedad de trastornos patológicos causando el desarrollo de úlceras principalmente en pacientes inmunosuprimidos e infantes (Schubert *et al.*, 2014). Además está estrechamente relacionada en la enfermedad de Alzheimer (Fica, *et al.*, 2005).

El tratamiento de esta infección causada por el VHS-1 son medicamentos sintéticos como Aciclovir. Sin embargo los medicamentos empleados el tratamiento no radican el virus del huésped, además ha aumentado la resistencia a los fármacos contando con una significativa toxicidad; por lo cual su uso es limitado. Como consecuencia ha motivado la búsqueda adicional de nuevos agentes antivirales con mayor potencia terapéutica y menos efectos adversos (Schubert *et al.*, 2014; McClain, 2015; Sauerbrei *et al.*, 2010).

En este trabajo analizamos la potencial aplicación de la PG en su uso antitumoral y antiviral de la PG de *S. marcescens* aislada del Estado de Nuevo León, México. Esto con el fin de comparar las funciones reportadas de la PG empleada en el mercado con la PG que obtuvimos. La actividad antitumoral se analizó con las líneas celulares HT-29 y SiHa analizada mediante la técnica de MTT y además se adiciono el análisis de citotoxicidad de la línea celular Vero con la técnica antes mencionada. La actividad antiviral se determinó por la técnica de reducción de placas líticas, en un modelo de infección con el VHS-1 en la línea celular Vero.

1.1 AGENTES BIOACTIVOS DE ORIGEN MICROBIANO

Los metabolitos secundarios son productos naturales de origen microbianos. A menudo estas sustancias químicas son agentes con alguna actividad biológica (Deorukhkar *et al.*, 2007).

Estos metabolito no son esenciales en el crecimiento, desarrollo y reproducción del microorganismo. Los compuestos sirven para satisfacer las necesidades secundarias de los organismos productores. Proveen mecanismos defensivos (competencias inter-especies), pigmento, antibacterianos, antifungicos, drogas anticancerígenas, inmunosupresores, antiparasitarios, herbicidas y algunos son usados en el tratamiento de algunas enfermedades. La búsqueda de estos agentes bioactivos es debido a la gran demanda de productos farmacéuticos (Vaishnav y Demain, 2010).

1.1.1 *Serratia marcescens*

S. marcescens pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Es un bacilo móvil por sus flagelos peritricos, tiene un diámetro de 0.5-0.8 μm y una longitud de 0.9-2.0 μm , es gram negativo y no forma esporas (Holt *et al.*, 1994; Samrot *et al.*, 2011). Las características de las colonias en el agar son de forma circular, elevación convexa y margen entero.

Además esta bacteria es causante de infecciones hospitalarias como nosocomiales, urinarias, entre otras (Tazón-Varela *et al.*, 2016; Soria *et al.*, 2016). Sin embargo produce un metabolito secundario con pigmento rojo llamado prodigiosina (PG) (Venil y Lashmanperumalsamy, 2009).

S. marcescens es un microorganismo anaerobio facultativo, quimiorganotrofico y por otro lado el pigmento es producido por la bacteria durante la fase estacionaria del crecimiento, en condiciones aerobias, pH de 7 y a 28°C (Helvia *et al.*, 2010; Samrot *et al.*, 2011; Kurbanoglu *et al.*, 2014).

1.1.2 Prodigiosina

El nombre de PG fue otorgado por Kraft, el cual la extrajo de *Bacillus prodigiosus*, un antiguo sinónimo de *S. marcescens* (Kraft, 1902). No fue hasta el año 1929, año que la PG fue aislada por Wrede y Hettche (Wrede y Rothhaas, 1934).

La PG tiene una estructura química formada por tres anillos tripirrólicos lineales (2-metil-3-pentil-6-metoxi; Giriet *al.*, 2004) (Figura 1). Tiene una masa molecular de 323.44 Da y su fórmula molecular es $C_{20}H_{25}N_3O$ (Harris *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2006) (figura 1).

La PG no es difusible y es sensible a la luz (Yu, 1979). Es insoluble en agua, moderadamente soluble en alcohol y éter, y soluble en cloroformo, metanol, acetonitrilo y DMSO (Grimont e Ichikawa, 1991; Khanafari *et al.*, 2006). A este metabolito secundario de *S. marcescens* se le atribuyen distintas actividades biológicas que se han reportado en diferentes trabajos de investigación (Manderville, 2001).

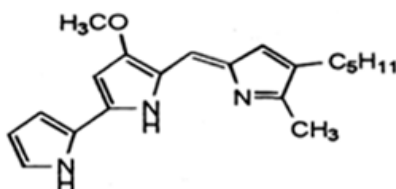


Figura 1. Estructura de la Prodigiosina (Montaner y Pérez., 2001).

1.1.3 Biosíntesis de la PG

Para la producción de la PG, la bacteria tiene dos rutas biosintética separadas en las cuales se incorporan una serie de intermediarios; la ruta MAP forma un monopirrol (2-metil-3-n-amil-pirrol) y la ruta MBC sintetiza un bipirrol (4-metoxi-2,2'-bipirrol-5-carbaldehído).

Las dos rutas convergen al final de las rutas en donde participa una enzima condensante para dar lugar al pigmento (Williamson *et al.*, 2005) (Figura 2).

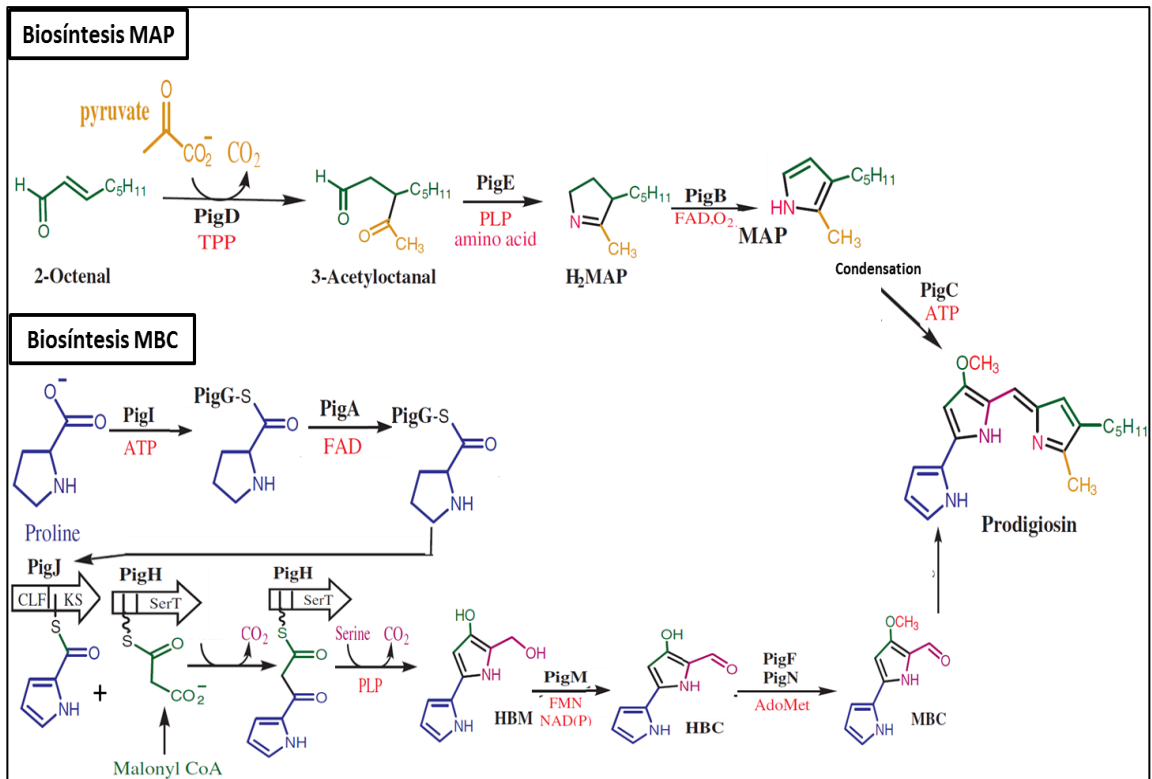


Figura 2. Ruta biosintética bifurcada de Prodigiosina (Modificado de Williamson *et al.*, 2005).

1.1.4 Localización celular y funciones de la PG

En la célula la PG se encuentra asociada a vesículas extracelulares y a gránulos intracelulares (Matsuyama *et al.*, 1986; Kobayashi e Ichikawa, 1991).

Este metabolito secundario es multifarmacéutico (Manderville, 2001). Tiene diferentes funciones biológica actúa como antimicrobiano, antifúngico, antiprotozoario y además antitumoral (Montaner *et al.*, 2000; Montaner *et al.*, 2005; Genes *et al.*, 2011; Duzhak *et al.*, 2012; Lapenda *et al.*, 2014; Sumathi *et al.*, 2014). La PG además de inducir a muerte celular en las líneas celulares tumorales, no son tóxicos para las células sanas (Montaner *et al.*, 2000).

- Actividad antiprotozoaria de la PG

Genes *et al.*, (2011) trabajaron en la investigación con la enfermedad de Chagas causada por *Trypanosomacruzi* de la cepa SN3 (TCI) y AF1c7 (TC II), ambos obtenidos de infecciones en líneas celulares Vero. Se realizó una suspensión del sedimento, se usó el medio de cultivo RPMI con suero fetal bovino, se cultivó a 28 °C por 24 h. Se comparó la actividad antiprotozoaria de la PG contra el tratamiento común de Benznidazol en las cepas SN3 y AF1c7. En ensayos de citotoxicidad reportaron un IC₅₀ con el uso de PG en las cepas SN3 (2.2 µM) y AF1c7 (2.49 µM), mientras que el tratamiento con Benznidazol se obtuvo una IC₅₀ en SN3 (34.62 µM) y AF1c7 (4.69 µM). Se obtuvo una mayor actividad con la PG, la cual podría ser un agente potencialmente útil para detener el ciclo de vida natural del parásito. Por lo tanto la PG podría ser un buen candidato para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

- Actividad antimicrobiana de la PG.

Lapenda *et al.*, (2014) examinaron la actividad antimicrobiana con diferentes cepas resistentes a Oxacilina como; *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* y *Acinetobacter* sp. El experimento se realizó usando el método de difusión de disco, las pruebas se realizarán usando diferentes antibióticos para comparar con la PG. Los antibióticos usados fueron: ampicilina (10 µg), cloranfenicol (10 µg) y gentamicina (10 µg), y PG (300 µg). Las cepas bacterianas se inocularon en medio de Mueller Hinton a 37°C durante 24 h. La inhibición se midió en (mm) considerando sólo halos de más de 6 mm. En los ensayos con PG obtuvieron resistencia en *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter*. Sin embargo, se encontró inhibición significativa en *S. aureus* (35±0.6 mm), *E. faecalis* (22±1.0 mm) y *S. pyogenes* (14±0.6 mm), por lo tanto *S. aureus* demostró una mayor sensibilidad a la PG en comparación con los antibióticos estándar probados.

En este estudio los autores concluyen que la PG podría ser un buen antimicrobiano, además en futuras investigaciones podría emplearse como un antibiótico en terapias dirigidas ORSA.

- Actividad antifúngica

Duzhak *et al.*, (2012) probaron la actividad antifúngica de la PG con *Didymella applanata*. El experimento se realizó mediante el método de *Shternshis*, incubado en medio LB a 28°C por 3 días. Los resultados arrojaron una IC₅₀ de 0.14 µM para la PG, en el cual obtuvieron un bajo crecimiento de *D. applanata*, en el ensayo con la PG. Por lo tanto se encontró que la PG tiene funciones vitales para suprimir a *D. applanata*,

1.1.5 Otros microorganismos productores de PG

Además de *S. marcescens* este pigmento es producido por diferentes microorganismos como *Vibrio psychroerythrus*, *Streptomyces coelicolor*, *Pseudomonas magnesorubra*, *Streptomyces lividans*, *Alteromonas rubra*, *Streptomyces* sp., *Hahellachejuensis*, *Denitrificans pseudovibrio*, *Pseudoalteromonas rubra*, y *Nocardia* sp. (Giriet *al.*, 2004; Sevcikova y Kormanec, 2004).

1.2. EL CÁNCER

El cáncer es una patología que se genera a partir de una célula anormal, este tipo de células son llamadas así por tener una alteración en crecimiento, desarrollo y reproducción. Estas alteraciones son debidas a las mutaciones en el DNA, la variación de las proteínas implicadas en el crecimiento y la pérdida de señales que controlan; el crecimiento, la supervivencia, el metabolismo, la migración, la proliferación y la muerte celular por apoptosis (Stewart y Weinberg, 2000; Bogenrieder *et al.*, 2003). Es de esta manera que las células cancerígenas son autosuficientes para proliferar descontroladamente causando daño en tejidos, avanzando a los órganos y finalmente provocando la muerte de la persona (Hanahan y Weinberg, 2000).

El cáncer es un problema de salud pública a nivel mundial, ya que esta enfermedad no distingue entre clases sociales, raza, edades, etc. Además aumenta cada día, debido al crecimiento y envejecimiento de la población; así como una creciente prevalencia de factores de riesgo establecidos como el tabaquismo, el sobre peso, la inactividad física y los cambios de patrones entre la urbanización y el desarrollo económico. Además, genera un alto gasto monetario para la sociedad en países menos desarrollados, por el costo elevado de los tratamientos. (Torre *et al.*, 2012).

1.2.1 Epidemiología del cáncer

Es importante mencionar que el cáncer provocó 8.2 millones de muertes en el 2012 y además aparecieron 14.1 millones de nuevos casos, lo que convierte a esta enfermedad la principal causa de muerte a nivel mundial (Torre *et al.*, 2012).

La OMS reportó en el 2015 que el cáncer de colon ocupa el segundo lugar en mortalidad en el género masculino y por otro lado el cáncer de cérvix es el principal causante de la morbilidad en la mujeres (Siegel *et al.*, 2017).

Por otro lado, en el 2013 en México se reportó que el cáncer de órganos hematopoyéticos es la principal causa de morbilidad hospitalaria en la población de 0 a 19 años (62% en mujeres y 58.7% en los hombre).

Y la población de 20 años y más, la principal causa de mortalidad es el cáncer en órganos digestivos (INEGI).

1.2.2 Tratamientos y resistencia del cáncer

Los tratamientos clásicos en el cáncer son la quimioterapia y radioterapia, sin embargo existen otros tratamientos dependiendo el tipo de cáncer como la cirugía, la inmunoterapia, la terapia dirigida, terapia antihormonal y la terapia fotodinámica (Capaccio, 2013).

Aunque el cáncer puede mostrar buena respuesta a los tratamientos clásicos, es muy común que se repita el desarrollo de la patología en fechas posteriores. Debido a que las células cancerosas tienen mecanismos de protección a nivel celular y ADN, contra los tratamientos; mediante la capacidad en excluir fármacos por medio de los canales de la membrana celular (Colvin y Mori, 2017; Choi *et al.*, 2017).

Es por eso que se requiere encontrar nuevas sustancias químicas con menos toxicidad en la células normales y con mayor actividad en las células cancerosas, que los tratamientos clásicos empleados (Hassankhani *et al.*, 2015).

1.3. VIRUS DEL HERPES SIMPLE TIPO 1

El Virus del Herpes Simple tipo 1 (VHS-1) pertenece a la familia *Herpesvirus*, subfamilia *Alphaherpesviridae*, género *Simplexviru*. Son virus de doble cadena lineal de ADN, aproximadamente de 155 kb (Glückel *et al.*, 2015).

La morfología del virión del herpes está formado por cuatro estructuras principales como: el núcleo interno que contiene el ADN, está protegido con una cápside icosaédrica, y esta a su vez se encuentra rodeado por el tegumento, finalmente tiene una envoltura lipídica que contiene proteínas codificadas por el virus algunas son glicosiladas (Mettenleiter, 2003) (Figura 3).

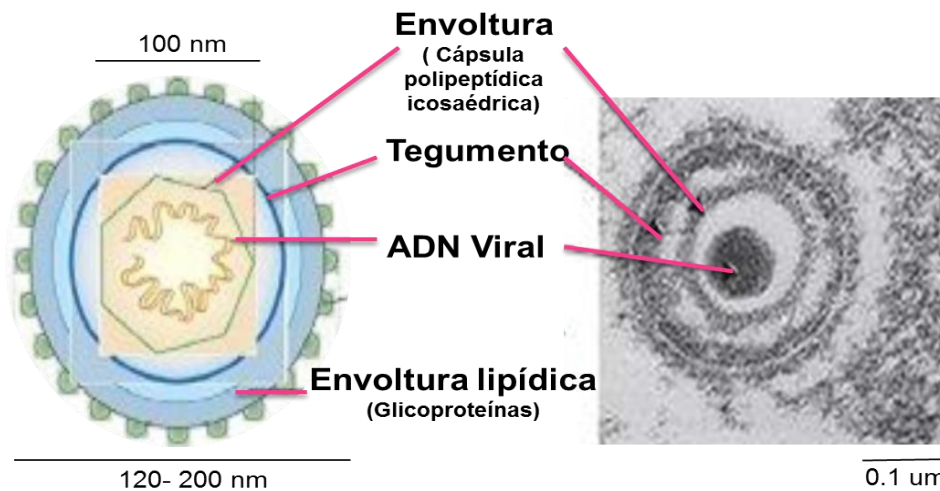


Figura 3. Estructura del Virus del Herpes (adaptada de Mettenleiter, 2003).

1.3.1 Situación actual del VHS-1

El VHS-1 está ampliamente distribuido en el mundo, con una gran prevalencia en países en vía de desarrollo como en el caso de México (Ferrándiz, 2001; Roizaman *et al.*, 2007), basado en la evidencia serológica, se estima que el 80% de la población adulta está infectada por el VHS-1 (Whitley y Roziman 2001).

1.3.2 Características de la Infección del virus

Para causar la infección se requiere de contacto directo con la lesión o con fluidos corporales contaminados por el VHS-1 (Whitley, 2001), causando una gran variedad de trastornos patológicos. Establece desde una infección leve (lítica) en células epiteliales hasta formar infecciones graves (latente) en neuronas sensoriales, esta última es persistentes e incluso mortales, principalmente en pacientes inmunosuprimidos e infantes (Novak y Peng, 2005; Roizman *et al.*, 2007; Schubert *et al.*, 2014).

La manifestación clínica de la infección por VHS-1 se desarrolla en la zona orofacial en forma de úlceras, conocido como el herpes labial (Glückel *et al.*, 2015). El virus se puede diseminar al cerebro durante la infección primaria o en las recurrencias las principales manifestaciones son cefalea, fiebre, entre otras, además está estrechamente relacionada en la enfermedad de Alzheimer (García-Rodríguez y Picazo, 1999; Fica, *et al.*, 2005).

Además el VHS-1 puede causar Gingivoestomatitis Herpética, Encefalitis Herpética y Queratoconjuntivitis Herpética (Ferrándiz, 2001; Kumar *et al.*, 2005; García-Rodríguez, 1999; Fica *et al.*, 2005).

1.3.3 Tratamientos y resistencia del VHS-1

Los tratamientos de esta infección causada por el virus son medicamentos análogos de la guanina como Aciclovir, Famciclovir, Penciclovir y Brivudin. Sin embargo; estos agentes no radican el virus del huésped, además ha aumentado la resistencia viral a los fármacos lo cual ha motivado la búsqueda adicional de agentes antivirales que desean inhibidores con mayor potencia terapéutica y menos efectos adversos (Schubert *et al.*, 2014; McClain, 2015; Sauerbrei *et al.*, 2010).

1.4 JUSTIFICACIÓN

Según la OMS el cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial y los tratamientos clásicos empleados en el cáncer han creado resistencia de las células cancerosas, lo que permite la persistencia de la enfermedad.

Por otro lado El VHS-1 causa una gran variedad de trastornos patológicos, desde una infección leve hasta formar infecciones persistentes e incluso mortales. Se sabe el 80% de la población tiene el VHS-1. Los medicamentos sintéticos empleados en el tratamiento del virus no radica el virus y además se ha registrado la aparición de nuevas cepas del virus, resistente a estos fármacos principalmente en pacientes inmunocomprometidos.

Estas son las razones que nos han motivado a la búsqueda de nuevas sustancias químicas de origen natural con menos efectos adversos y mayor potencia terapéutica, en el cancer y en el VHS-1.

1.5 ANTECEDENTES

1.5.1 Actividad antitumoral de la PG

Montaner *et al.*, (2000) analizaron la actividad apoptótica de la PG sobre líneas celulares de cáncer hematopoyético: Jurkat E6-1 (células de Leucemia aguda), NSO (células de Mieloma), HL-60 (células de Leucemia promielocítica) y Ramos (células de Linfoma de Burkitt); y en células no malignas: NIH-3T3 (células embrionarias de ratón) y MDCK (células epiteliales). Se cultivaron en medio RPMI 1640, NIH-3T3 fue cultivada en medio DMEM y MDCK se cultivó en medio MEM a 37°C, 5% de CO₂ durante 24 h. Se realizó el análisis con la técnica de MTT y obtuvieron una IC₅₀ de PG para: Jurkat E6-1 (1.45 µg), NSO (5 µg), HL-60 (3.14 µg) y Ramos (3.03 µg); NIH-3T3 (10 µg) y MDCK (10 µg). Estos resultados indican que la PG de *S. marcescens* induce a apoptosis en las cuatro líneas celulares de cáncer hematopoyéticos (Jurkat, NSO, HL-60 y Ramos). La PG podría ser un buen fármaco antineoplásico.

Montaner y Pérez, (2001) caracterizaron la capacidad apoptótica de la PG en la línea celular SW-620 (Adenocarcinoma de cáncer de colon), en comparación con líneas celulares no malignas NRK (células del riñón de rata) y Swiss-3T3 (líneas celulares de ratón suizo). Células NRK se cultivaron en medio RPMI 1640; SW-620 y Swiss-3T3 fueron cultivadas en medio DMEM, 37°C, 5% de CO₂. Se realizó el análisis mediante MTT, en donde se obtuvo una IC₅₀ de PG en la línea celular SW-620 (0.275 µM). Y las células no malignas NRK y Swiss-3T3 obtuvieron el 90% de viabilidad a 1.2 µM. La PG presentó un efecto apoptótico estadísticamente significativo y se confirmó que la PG induce a apoptosis en esta línea celular de cáncer.

Campas *et al.*, (2003) analizaron la actividad apoptótica de PG con Leucemia linfocítica crónica (LLC). Se trabajaron con 32 muestras de pacientes con diagnóstico de LLC, fueron incubadas con el medio RPMI 1640 a 37°C, 5% de CO₂. Se analizó la viabilidad de las células durante 48 h y con el uso de la técnica de MTT se determinó la actividad antitumoral. En los resultados se

obtuvo una IC_{50} de PG de $0.116 \pm 0.25 \mu M$. Y concluyeron que la PG induce a apoptosis en las células de cáncer primario humano.

Deorukhkar *et al.*, (2007) investigaron la actividad antitumoral en dos líneas celulares diferentes a las mencionadas anteriormente; trabajaron con U937 (Leucemia promielocítica humana) y LS-A (Linfosarcoma de ratón). Las líneas celulares fueron cultivadas en el medio RPMI 1640 a $37^{\circ}C$, 5% de CO_2 . Se realizó el ensayo de viabilidad mediante MTT y se encontraron una IC_{50} para U937 ($1.59 \mu M$) y LS-A ($0.176 \mu M$), se obtuvo que estas concentraciones provocaron la muerte celular de manera significativa. Reafirmando que el metabolito secundario de *S. marcescens* podría servir como un nuevo compuesto anticancerígeno.

Además Kavitha *et al.*, (2010) encontraron propiedades de la PG con un efecto inhibitorio en la línea celular Hela-229 (Carcinoma de cáncer cervical). La célula se cultivó en medio DMEM a $37^{\circ}C$, 5% de CO_2 durante 24 h. Trabajaron esta línea celular en un ensayo de viabilidad con MTT. En los resultados obtuvieron una IC_{50} de PG de $0.7 \mu M$. Y concluyeron que la PG en diferentes líneas celulares tumorales ha demostrado tener una buena actividad antiproliferativa.

Samrot *et al.*, (2011) analizaron la actividad antitumoral en la línea celular Hep2 (Cáncer de laringe) y analizaron la actividad en la línea celular no maligna Vero. Se determinó mediante la técnica de MTT y obtuvieron una IC_{50} de PG en Hep2 ($1.93 \mu M$) y Vero ($77.29 \mu M$), en donde obtuvieron que la PG causa un mayor daño en las células de cancer de laringe que en las células control.

Sumathi *et al.*, (2014) evaluaron el impacto antitumoral empleando diferentes líneas celulares Hela (Adenocarcinoma cervical), Hep2 (Cáncer de laringe) y KB (Cáncer oral). La actividad la determinaron por la técnica de MTT y obtuvieron una IC_{50} de PG en Hela ($4.3 \mu M$), HEp2 ($5.2 \mu M$) y KB ($4.8 \mu M$). Con estos resultados concluyeron que la PG podría ser un agente potencial para el uso terapéutico en la actividad antitumoral.

1.5.1.1 Mecanismo de acción en la actividad antitumoral

En lo que se refiere a los mecanismos de acción de la PG sobre las células cancerosas se han reportado 4 rutas posibles: como modulador del pH, inhibidor del ciclo celular, agente de escisión de DNA ó activador mitógeno de las proteínas reguladoras de las quinasas, estos mecanismos envían a la célula a la muerte por apoptosis. Esta molécula se puede combinar con algún otro agente contra el cáncer (Pérez *et al.*, 2003; Montaner *et al.*, 2005) (Figura 4).

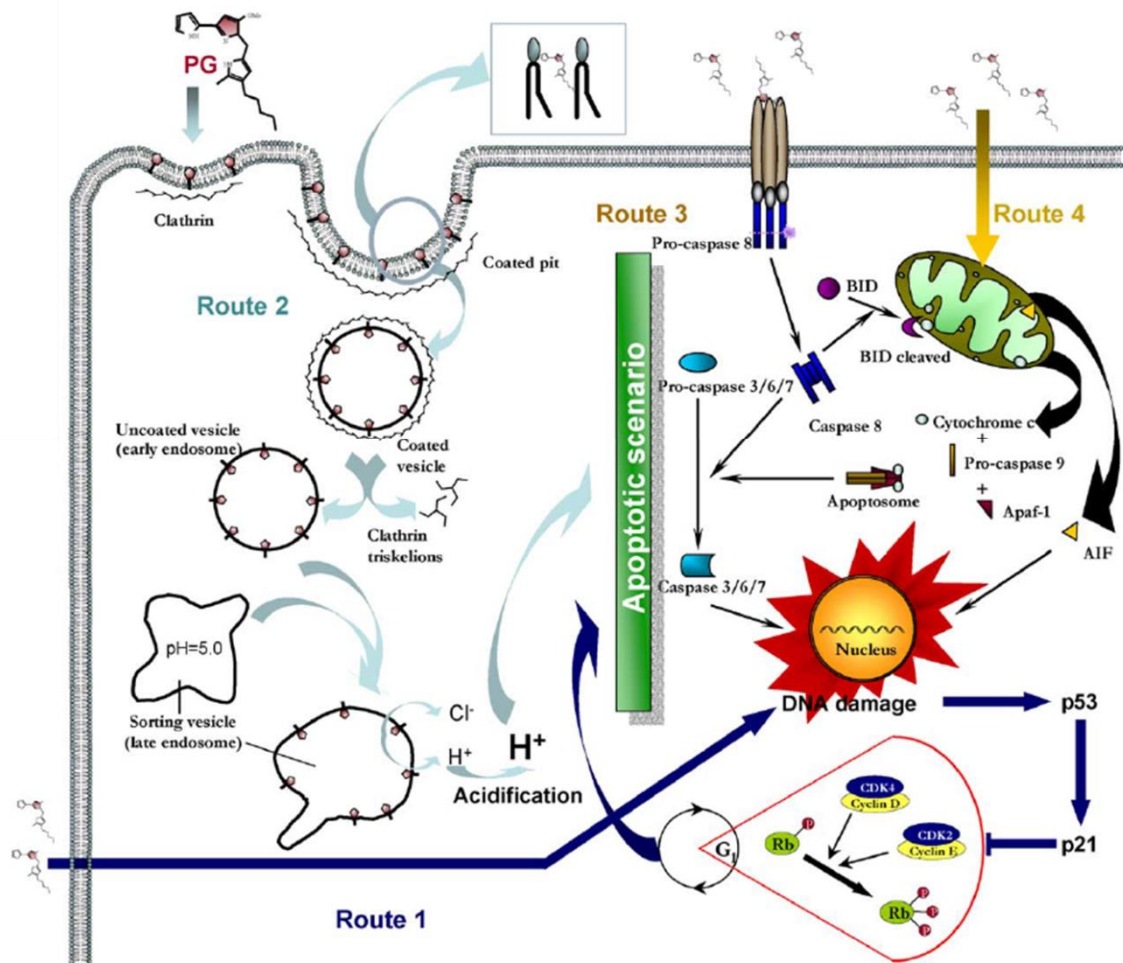


Figura 4. Mecanismos de acción de la Prodigiosina en el cáncer (Pérez *et al.*, 2003)

1.5.2 Metabolitos con actividad antiviral

1.5.2.1 Actividad antiviral de la violaceína

Chromobacterium violaceum produce un metabolito secundario que se encuentra dentro del pigmento llamado violaceína, su coloración es violeta (Bromberg y Duran, 2001). *C. violaceum* pertenece a la familia de las *Neisseriaceae* y es una bacteria gram negativa. Por otro lado la violaceína tiene distintas funciones medicinales como: antibiótico, antichagas, antileishmaniasis, antitumoral y además antiviral (Duran y Menck., 2001; Melo *et al.*, 2000; Leon *et al.* 2001).

Fröhner *et al.*, (2003) analizaron la actividad antiviral de la violaceína, en distintos modelos de infección con distintos virus: VHS-1, Poliovirus-2, Rotavirus de simio SA11, virus de Hepatitis A y adenovirus-5. Y se determinó la actividad antiviral mediante la técnica de MTT. Consiguieron una IC_{50} de la violaceína para cada virus: VHS-1 ($0.312 \mu\text{M}$), Poliovirus-2 ($0.625 \mu\text{M}$) y Rotavirus de simio SA11 ($1.25 \mu\text{M}$). Mientras que el virus de Hepatitis A y el adenovirus-5 no mostraron actividad antiviral todos estos en los ensayos. Sin embargo ellos concluyeron que la violaceína podría ser selectiva para el tratamiento del VHS-1, el Poliovirus-2 y el Rotavirus.

1.5.2.2 Actividad antiviral de la PG

Zhou *et al.*, (2016) estudiaron la actividad antiviral de la PG sobre células infectadas con el virus *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV). Incubaron 1×10^4 células de BmN (células de *Bombyx mori*, perteneciente a la mariposa de seda) en una placa de 96 pozos infectadas con BmNPV, con medio TC-100 y con PG durante 72 h a 28°C . La actividad se analizó mediante la técnica de MTT y obtuvo una IC_{50} de $1.56 \pm 0.18 \mu\text{M}$. En este trabajo se concluyó, que la PG en concentraciones no tóxicas mató selectivamente células infectadas con el virus.

1.6 APORTACIÓN CIENTÍFICA

El presente trabajo generara conocimiento sobre la potencial aplicación de la PG en su uso antitumoral y antiviral.

1.7 HIPÓTESIS

La prodigiosina producida por *S. marcescens* aislada del Estado de Nuevo León, México, presentará citotoxicidad en las líneas celulares tumorales y en línea celular con infección de VHS-1 en ensayos *in vitro*.

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 Objetivo general

Evaluar la actividad citotóxica en líneas celulares tumorales y la actividad antiviral contra el VHS-1 *in vitro*, de la prodigiosina producida por *S. marcescens*.

1.8.2 Objetivos específicos

1. Obtener prodigiosina a partir del cultivo de *S. marcescens*.
2. Evaluar la citotoxicidad de la prodigiosina en la línea celular Vero.
3. Determinar la actividad citotóxica de la prodigiosina en las líneas celulares tumorales HT-29 y SiHa.
4. Evaluar la actividad antiviral de la prodigiosina en un modelo de infección *in vitro* del VHS-1 en la línea celular Vero.

CAPITULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Crecimiento de *Serratia marcescens* y producción de la PG

La cepa de *S. marcescens* fue proporcionada por el Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu del Laboratorio de Biotecnología 1 perteneciente a la Facultad de Ciencias Químicas, de la UANL. Los colaboradores de este grupo de trabajo aislaron la bacteria de *S. marcescens* del Estado de Nuevo León, México.

S. marcescens se reactivó en un medio con extracto de cacahuete. El medio cacahuete se realizó de la siguiente manera: se usarón 500 g de cacahuete macerado con 600 mL de éter de petróleo (Sigma aldrich) en una relación 1:2 con respecto al producto macerado. La mezcla se agito durante 2 horas y se dejó reposar por 12 horas, para su posterior filtración. Se eliminó el solvente por medio de un evaporador rotado para reducir consumibles y el impacto al ambiente, y el aceite de cacahuete obtenido se refrigero a 4°C para su posterior uso.

Para el crecimiento de la bacteria se preparó el cultivo, el cual requirió 1% de aceite de cacahuete en 100 mL de agua destilada. Se incubó durante 48 h a 28°C en agitación constante de 150 rpm.

Una vez obtenido el cultivo de 100 mL, se procedió a la extracción de la prodigiosina, se colocó 50 mL de la producción del cultivo en un tubo de 50 mL y se centrifugó durante 10 min a 4000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento con 3 mL de cloroformo (Sigma aldrich). Se ultrasónico (Fisher scientific a 120 watt, 20 kHz) en 3 series de 1 min., y se

repositó la muestra 2 min., después se centrifugó nuevamente a 4°C. Se tomó en cuenta la fase superior para la purificación, y se conservó a 4°C para su purificación posterior (Avila-Galindo *et al.*, 2015).

2.1.1 Purificación de la PG

Se realizó la purificación con la cromatografía en columna, con una fase estacionaria de sílica/gel (Sigma aldrich) y una fase móvil con cloroformo/metanol (Sigma aldrich) a una relación 9:1. La longitud de la columna fue de 35 cm, volumen de muestra fue de 5 mL, la recuperación de las fracciones fue a un flujo de 50 µL/min a temperatura ambiente y un tiempo de corrida de 12 h aproximadamente (Avila-Galindo *et al.*, 2015).

Además se analizó la estructura de la molécula de PG, a las diferentes fracciones obtenidas en la purificación y se realizó una cromatografía en capa fina (CCF) para cada una de ellas. A la fracción 3 se le realizó un espectro de UV/vis en un intervalo de 430-570 nm y se adiciono un espectro de infrarrojo (IR). En el análisis espectral de UV se restituyo la muestra de la PG con 1 µL etanol y se usó el etanol como blanco de absorción.

2.1.2 Preparación de la molécula de la PG para la determinación de las actividades biológicas

Para las Actividades Biológicas de la PG, se realizó un concentrado a 30 µM de la molécula de la PG. La PG se disolvió en 2 mL y se filtró en una membrana MF-milipore de 0.22 µM para su esterilización.

2.2 Cultivos y condiciones de crecimiento de las células

Se trabajó con tres líneas celulares: Vero (riñón de mono verde africano, ATCC CCL-81) donada por el Dr. Ernesto Torres López de la Facultad de Medicina de la UANL, HT-29 (Adenocarcinoma colorectal humano, ATCC HTB-38) y SiHa (Carcinoma escamoso humano de segundo grado, ATCC HTB-35) proporcionadas por la Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

Se cultivó la línea celular control Vero en medio A-DMEM (Biowest), suplementado con 2% SBF inactivado (Biowest) y 2 mM de L-glutamina (Biowets). Las líneas tumorales HT-29 y SiHa se cultivaron en medio EMEM (GIBCO) suplementados con 10% SBF, 100 U/mL de penicilina (Biowest) y 0.1 mg/mL de estreptomina (GIBCO), a 37°C, en atmosfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. (Montaner, 2005).

2.2.1 Ensayo de citotoxicidad de la PG en la línea celular Vero

El ensayo de citotoxicidad de la PG se realizó con la línea celular Vero (Mosmann, 1983). Las células Vero se incubaron en una placa microtitulación con 7×10^3 células por pocillo, con el medio A-DMEM 24 h antes del tratamiento (para que las células se formaran monocapa) a las condiciones antes mencionadas.

Se emplearon los siguientes controles: el control (-) células sin tratamiento, control (+) de células tratadas con Tritón 1% (Sigma aldrich), control de medio solo, control de células con DMSO a 0.02%. Por último se usó la PG en diluciones seriadas 1:2 obteniendo diferentes concentraciones: 30, 15, 7.5, 3.75, 1.875, 0.937, 0.468, 0.234 y 0.11 μ M, y se incubaron a diferentes horas (24, 48 y 72 h).

Se evaluó mediante la técnica de MTT; se colocó medio nuevo con 100 μ L de MTT 5 mg/mL (diluido en PBS), se incubó por 4 h en oscuridad. Después de la

incubación se retiró el medio y se disolvió los cristales con 100 μ L de DMSO. Se midió la absorbancia a 560 nm en el lector de placa (Bio-Tek, Elx 800, US). La viabilidad celular se expresará como un porcentaje de control (Montaner *et al.*, 2000). Se realizó tres ensayos por triplicado cada uno.

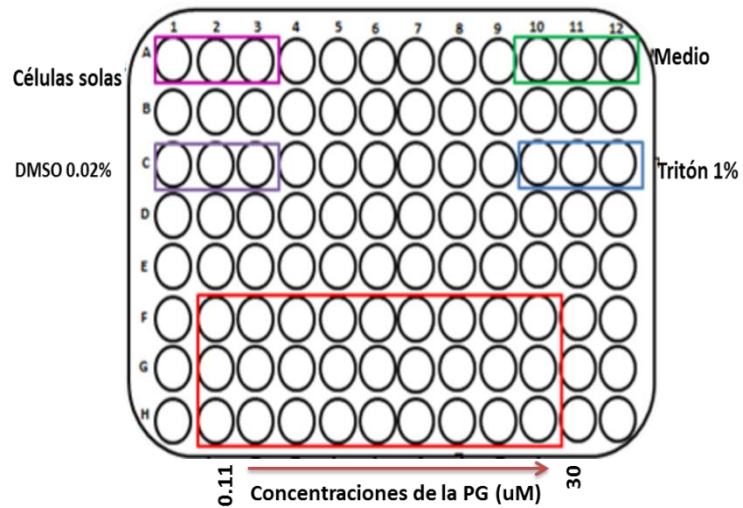


Figura 5. Representación de la placa de 96 pozos para el ensayo de viabilidad de la línea celular Vero. Con las concentraciones de la PG y los controles utilizados.

2.2.2 Ensayo citotóxico de la PG en las líneas celulares tumorales HT-29 y SiHa

El ensayo citotóxico de la PG se realizó con las líneas celulares HT-29 y SiHa. Se colocaron 7×10^3 en la placa microtitulación con medio EMEM.

Después de un período de 24 h de incubación, se colocó medio nuevo con los siguientes controles; el control (-) de células sin tratamiento, control (+) de células tratadas con Vincristina (VCR) (Sigma aldrich), control de medio solo, control de células con DMSO a 0.02%. Por último se usó la PG en diluciones seriadas 1:2 obteniendo diferentes concentraciones: 30, 15, 7.5, 3.75, 1.875, 0.937, 0.468, 0.234 y 0.11 μM , se incubó a 72 h.

Se determinó con el ensayo de MTT y se colocó medio nuevo con 100 μL de MTT 5 mg/mL (diluido en PBS), se incubó por 4 h en oscuridad. Después de la incubación se retiró el medio y se disolvió los cristales con 50 μL de DMSO. Se midió la absorbancia a 540 nm en el lector de placa. La viabilidad celular se expresará como un porcentaje de control (Montaner *et al.*, 2001). Se realizó tres ensayos por triplicado cada uno.

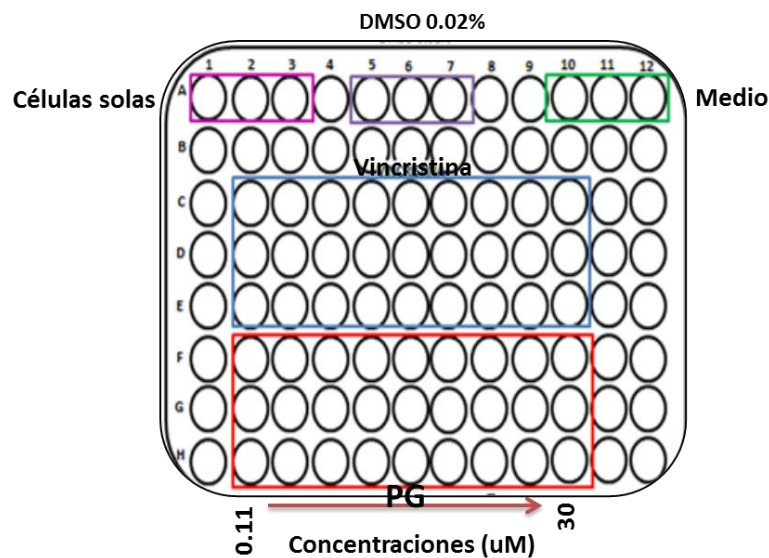


Figura 6. Representación de la placa de 96 pozos para el ensayo citotóxico de HT-29 y SiHa. Con las concentraciones de la PG y los controles utilizados.

2.3 Cuantificación de las partículas virales por titulación viral

La cuantificación de las partículas virales se trabajó con el VHS-1 y se determinó mediante la técnica de neutralización de placas (KOS, ATCC VR-1493) proporcionado por el Dr. Ernesto Torres López de la Facultad de Medicina de la UANL.

Para la cuantificación de las unidades virales se realizó un título viral mediante diluciones seriadas logarítmicas base 10 de un concentrado del VHS-1. En la serie de tubos se adiciono una solución diluyente en PBS al 0.1% glucosado, con una relación 1:10. Los 10 tubos se manejaron a 4°C, cada tubo se homogenizó y 1 mL fue transferido con una pipeta serológica estéril a cada tubo.

Se sembró una placa de 6 pozos con células Vero aproximadamente 0.5×10^6 por pozo, se colocó en los pozos 1 mL de cada tubo de las diluciones y se incubo durante 1 h, a 37°C en agitación de 60 rpm.

Transcurrido el tiempo se desechó la solución viral y se adicionó 3 mL de A-DMEM suplementado con inmunoglobulina G (IgG) (Grifols) al 0.32% y las placas fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂ por 72 h. Se utilizaron controles de crecimiento celular: células sin presencia del virus (para observar la monocapa).

Al finalizar la incubación, se realizó una tinción con el colorante Giemsa (Sigma aldrich) para observar las UFP/mL (Unidades Formadoras de Placa por mililitro) en cada pozo con los pasos siguientes: primero se desechó el medio, se adiciono metanol por 5 min. para fijar las células, posteriormente se decantado y se agregó Giemsa por 10 minutos; la placa se lavó con agua y se dejó secar.

Se contaron las zonas líticas de cada pozo con el invertoscopio, es decir, donde hubo infección por parte del virus causando la lisis de la célula, determinando las UFP/mL para cada una de las diluciones trabajadas (Morales-San Claudio, 2013).

Empleándose las siguientes fórmulas:

$$\frac{\text{UFP contadas en el pozo}}{\text{UFP del título}} = \text{concentración de UFP/mL}$$

El volumen necesario del tituló para obtener 100 UFP de VHS-1.

$$\frac{100 \text{ UFP}}{\text{No.UFP contadas}} = \text{mL necesario para las UFP}$$

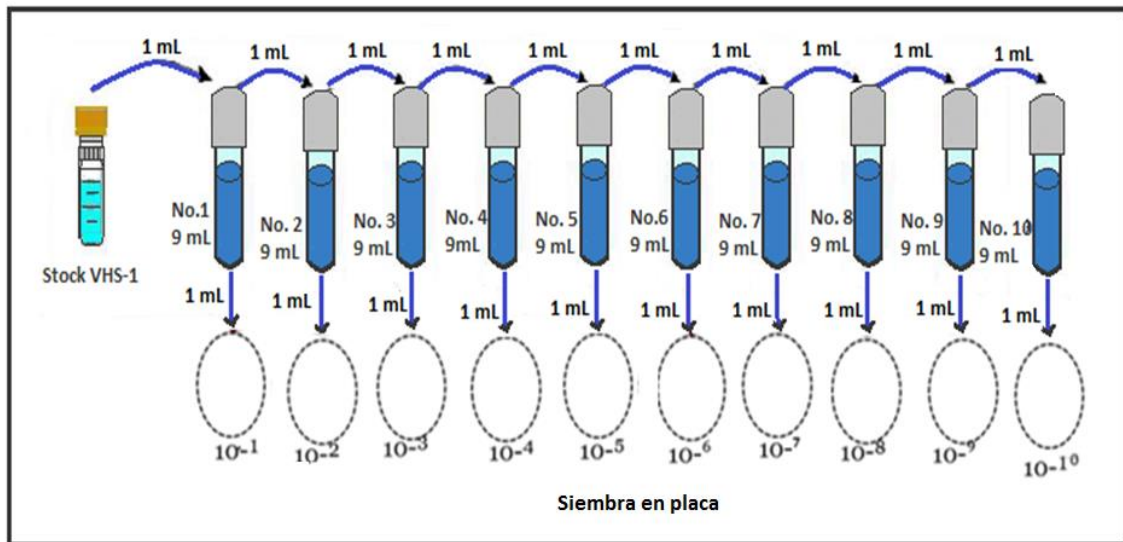


Figura 7. Diluciones para la cuantificación de las partículas virales por titulación viral.

2.3.1 Determinación de la actividad antiviral de la PG

La actividad viral, se determinó mediante el ensayo de reducción de placas líticas y tinción con el colorante giemsa.

Se sembró 0.5×10^6 células Vero en una placa de 6 pozos 24 h antes de la infección. Se colocó 0.3 mL de la dilución 10^5 del VHS-1 con la pipeta serológica estéril a cada pozo de la placa de cultivo, para tener aproximadamente 100 por pozo. La placa fue colocada en agitación de 60 rpm a 37°C durante 1 h.

Transcurrido el tiempo se desechó la solución viral, se le adiciono 3 mL de A-DMEM suplementado con inmunoglobulina G (IgG) al 0.32%. Se emplearon los siguientes controles: el control (-) del crecimiento celular, células sin infección (para observar la monocapa completa), el control de las UFP y el control (+) de células tratadas con Aciclovir (ACV) (Laciken) $8.8 \mu\text{M}$. Por último se usó la PG en diluciones seriadas 1:2 obteniendo diferentes concentraciones: 30, 15, 7.5, 3.75, 1.875, 0.937, 0.468, 0.234 y $0.11 \mu\text{M}$, fueron incubados a 37°C con 5% de CO_2 por 72 h.

Al finalizar la incubación, se realizó una tinción con Giemsa antes mencionada y se observó al invertoscopio. El ensayo fue por triplicado.

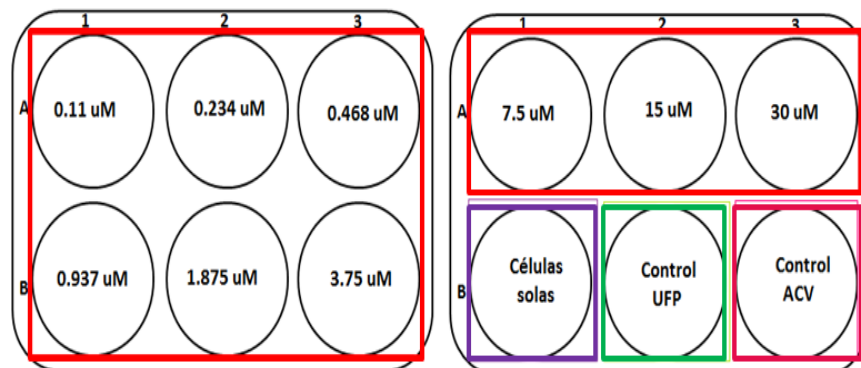


Figura 8. Esquema de la distribución de las concentraciones de la PG y los controles utilizados.

2.4 Análisis estadísticos

Las diferencias significativas fueron determinadas usando un análisis de varianza (ANOVA), Se consideró un $p < 0,05$ como significativo.

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 Obtención, purificación y caracterización de la PG

La producción de la PG de *S. marcescens* en el medio cacahuete al 1 %, se observan de color rojizo el cual es característico de este pigmento. De igual modo el pigmento se visualiza en el vial después de la purificación y se obtuvieron 30 mg de la PG a partir de 100 mL por producción (Figura 9).



Figura 9. Obtención y purificación de la PG. A) Producción de PG en 100 mL del medio cacahuete al 1%, B) 30 mg de PG por producción.

En la parte de la caracterización de la molécula de la PG, se realizó la técnica analítica de CCF y se detectó una banda bien definida con un factor de retención (R_f) de 0.72. La banda perteneciente a la PG se presentó con pequeños ruidos por debajo de ella (Figura 10).

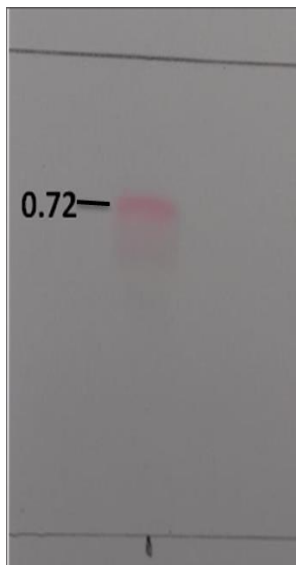


Figura 10. Cromatografía de capa fina de la PG. Se detectó una banda con un R_f de 0.72, correspondiente a la PG y de acuerdo a los solventes usados como fase móvil.

Para el análisis estructural de la molécula de la PG se obtuvo un espectro de absorbancia UV/Vis. La cual fue posible observar que la molécula de la PG absorbe a una longitud de onda máxima de 538.301 nm y una absorbancia de 0.37899, la cual es distribuida en el espectro de acuerdo a la excitación de la molécula de la PG presente. Sin embargo la señal se visualiza con una pequeña elevación en la longitud de onda de 500-510 nm y la campana no se visualiza uniforme (Figura 11).

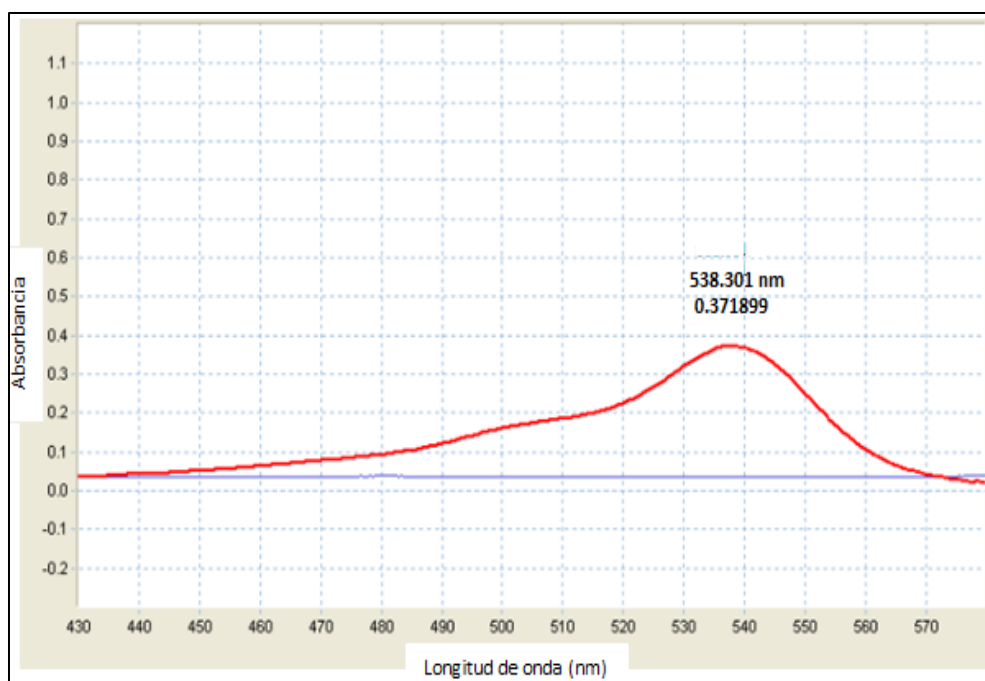


Figura 11. Espectro UV/vis de la PG. Se Observa el espectro de absorción UV/vis de la PG a una longitud de onda de 538.301 nm.

Además se determinó el análisis de la caracterización de la PG por espectro de IR, en donde es importante señalar que se encontró los principales grupos funcionales de la PG.

Con esto se demuestra que la PG se encuentra como molécula principal, según los picos obtenidos de 3295.88, 2851.18, 1651.96, 1460.39, 1377.44 y 1097.68 cm^{-1} . Ya que estos picos concuerda con la literatura reportada para la PG, en donde el pico a 3446.64 corresponde para amina primaria ($-\text{NH}$), el 2922.99 a grupo metil ($-\text{CH}_3$), 1638.98 a grupo pirrol ($\text{C}=\text{N}$), 1464 a grupos aromáticos ($\text{C}=\text{C}$), 1379 grupo ester ($\text{C}-\text{O}$), y 1083 cm^{-1} a una amina alifática ($-\text{C}-\text{N}$) (Figura 12).

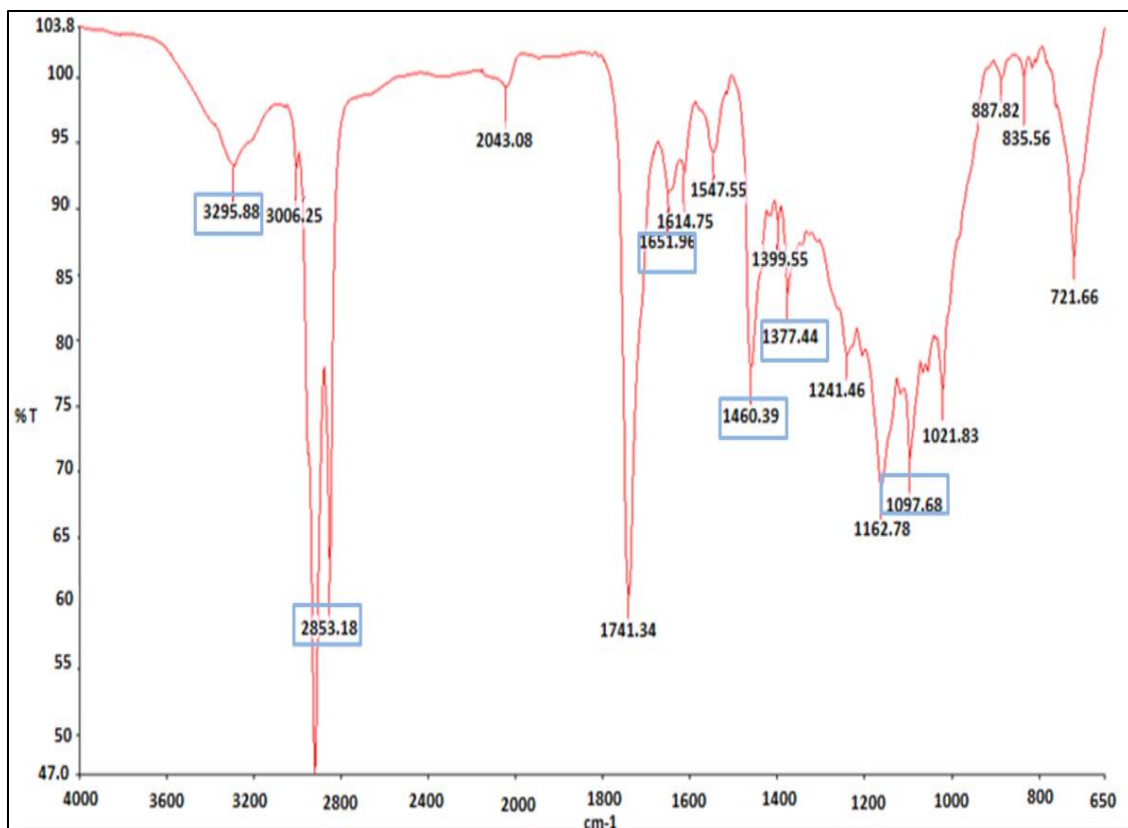


Figura 12. Espectro de IR de la PG. En los cuadros azules se resaltan los picos de los grupos funcionales más cacterísticos para la molécula de la PG.

3.2 Citotoxicidad en la línea celular Vero

Tal como se mencionó en la sección de materiales y métodos, se analizó el daño celular de las células Vero las cuales las podemos llamar células no malignas “células control”. La citotoxicidad se analizó en estas células con el fin de visualizar el daño que causa la PG sobre células no malignas. En la figura 13, podemos visualizar el crecimiento control de las células Vero las cuales se encuentra en una monocapa confluyente al 90% y sin cambios morfológico (morfología característica de células alargadas y núcleos definidos). Por otra parte en las células con 30 μM de PG se visualizaron con una confluencia del 80%, con un desprendimiento de células en la monocapa muy baja. Estos resultados se pueden cualitativos se puede corroborar con la gráfica 1.

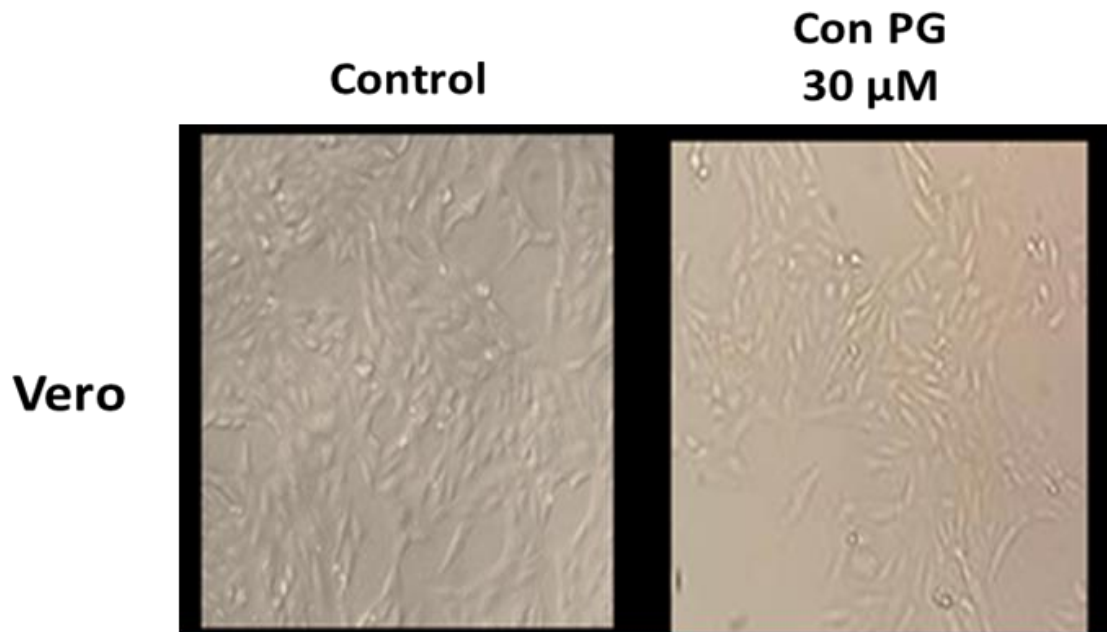


Figura 13. Análisis de la morfología celular de las células Vero. En el control de células Vero se visualizan con una monocapa confluyente, y con 30 μM de PG se desprende un poco de células.

En este ensayo se realizó un análisis cuantitativo de la citotoxicidad en la línea celular Vero a diferentes horas: 24, 48 y 72.

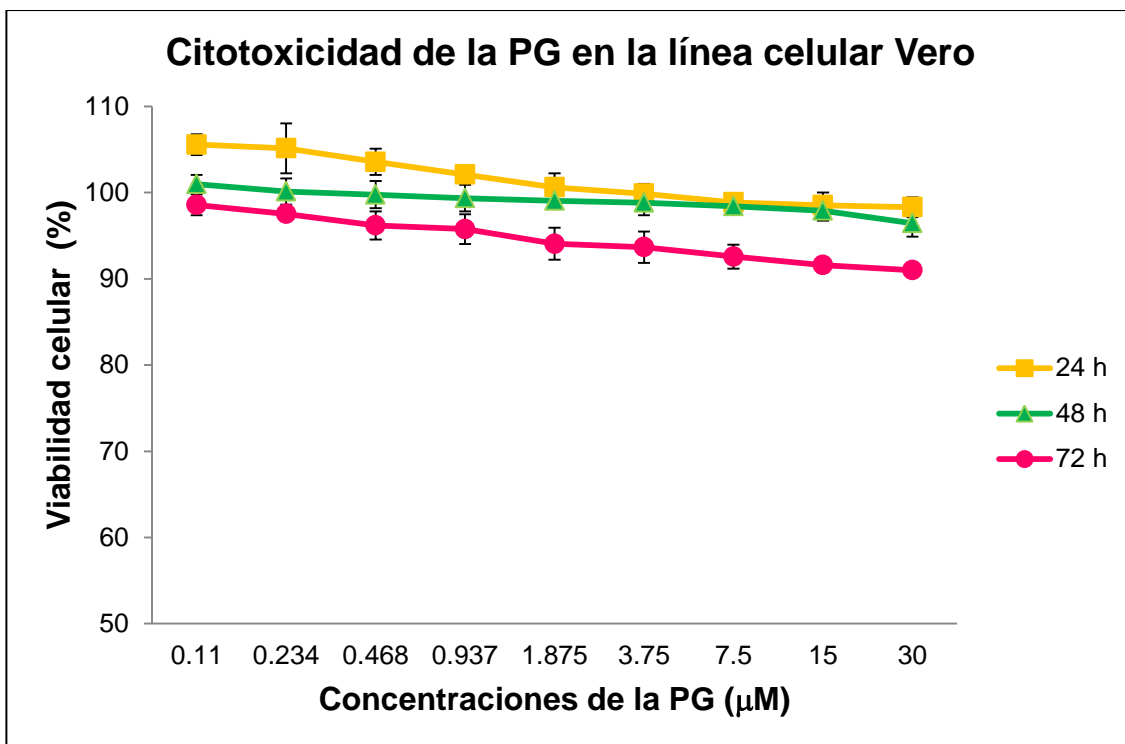
Los resultados de citotoxicidad se graficaron con la viabilidad celular en porcentaje y la concentración de la PG en la línea celular Vero.

Se determinó que a las 24 h en la concentración de 0.11 μM de PG hay un 105.5% de viabilidad y a la concentración de 30 μM de PG aún hay un 98.3% de viabilidad. Por otro lado a las 48 h del ensayo se observó que a las concentraciones de 0.11 μM y 30 μM de PG hay un 100.9 % y 96.4% de viabilidad respectivamente. Adicionalmente en el ensayo de la 72 h se visualizó que en las concentraciones 0.11 μM y 30 μM de PG hay una viabilidad de 98.5% y 90.9%, estos ensayos muestran un fenómeno dosis-respuesta.

Demostrando que en el ensayo de las 72 h en la mayor concentración de 30 μM de PG, la viabilidad reduce un 10%. Con la figura 13 y la gráfica 1 se confirma que la PG no causa un daño alto en el crecimiento de las células Vero (Gráfica 1).

Con el análisis anterior se procedió a realizar los siguientes ensayos de las actividades biológicas a las 72 h.

También se consideró realizar un estudio estadístico con el análisis de varianzas en este ensayo, se visualizó que no existe una $p < 0.05$; es decir que los resultados no tuvieron significancia para predecir una citotoxicidad en las células Vero.



Gráfica 1. Citotoxicidad de la PG en la línea celular Vero a las 24 h, 48 h y 72 h. Podemos observar la viabilidad de la línea celular Vero con respecto a la concentración de la PG mostrando un fenómeno de dosis-respuesta. Tres ensayos por triplicado.

ANÁLISIS DE VARIANZA DE CITOTOXICIDAD DE LA PG EN VERO						
Origen de las varianza de cuadrados de libertad	de los cua	F	Probabilidad	lor crítico para F		
Entre grupos	134.81	8	16.85125	1.39393705	0.26438354	2.5101579
Dentro de lo	217.601289	18	12.0889605			
Total	352.411289	26				

Tabla 1. Análisis de varianza (Anova) de Citotoxicidad de la PG en Vero. Valor de $p < 0.05$.

3.3 Actividad citotóxica de la prodigiosina en las líneas celulares tumorales HT-29 y SiHa

Para la determinación de la actividad citotóxica de la PG se analizó en dos líneas celulares HT-29 y SiHa ambas se trataron en un rango de 0.11-30 μ M.

Se observó el daño morfológico de ambas líneas celulares con respecto a PG y VCR a la concentración de 30 μ M.

En el control de las células HT-29 se visualiza una confluencia del 95%, mientras que con PG y VCR se representó cambio de morfología y disminución de la confluencia.

Por otro lado el control de las células SiHa se expone a una confluencia del 80% y con PG y VCR se observa que disminuye la confluencia como en el caso de las células HT-29 (Figura 14).

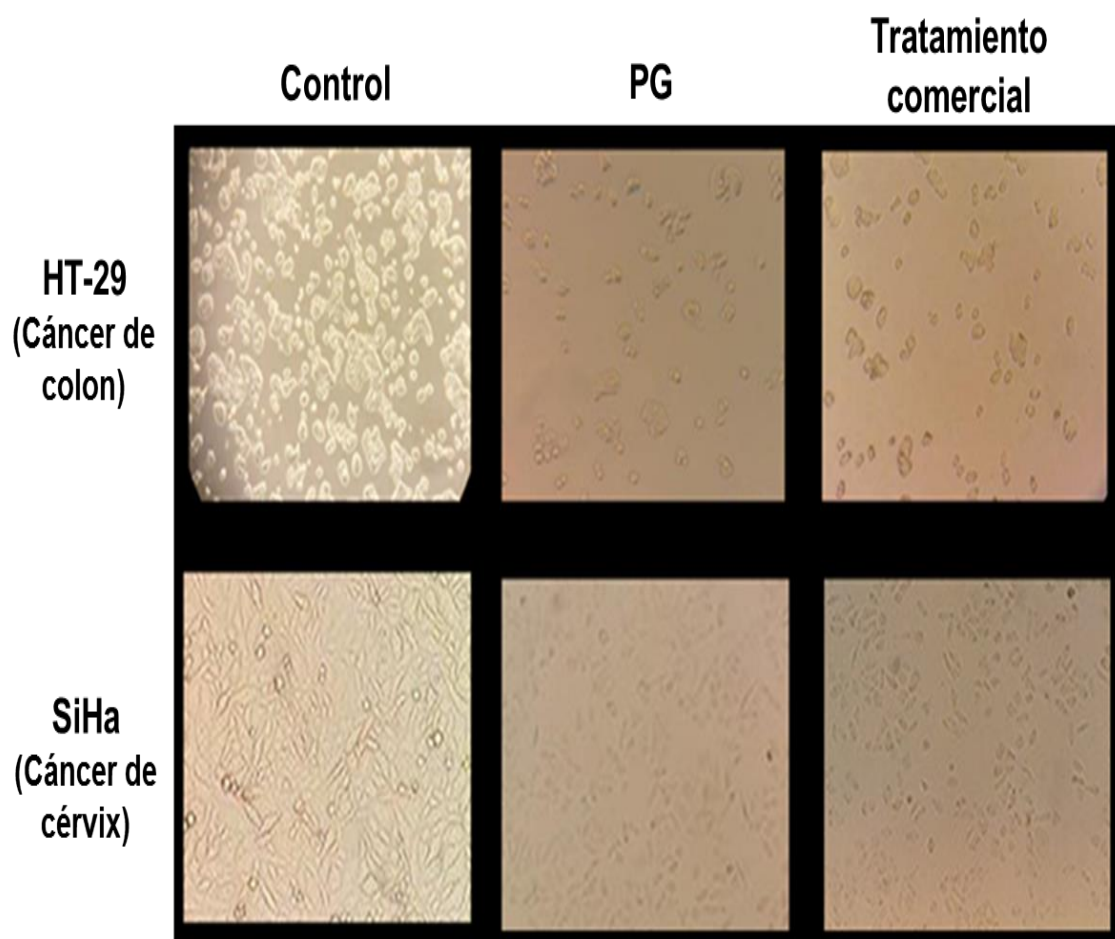


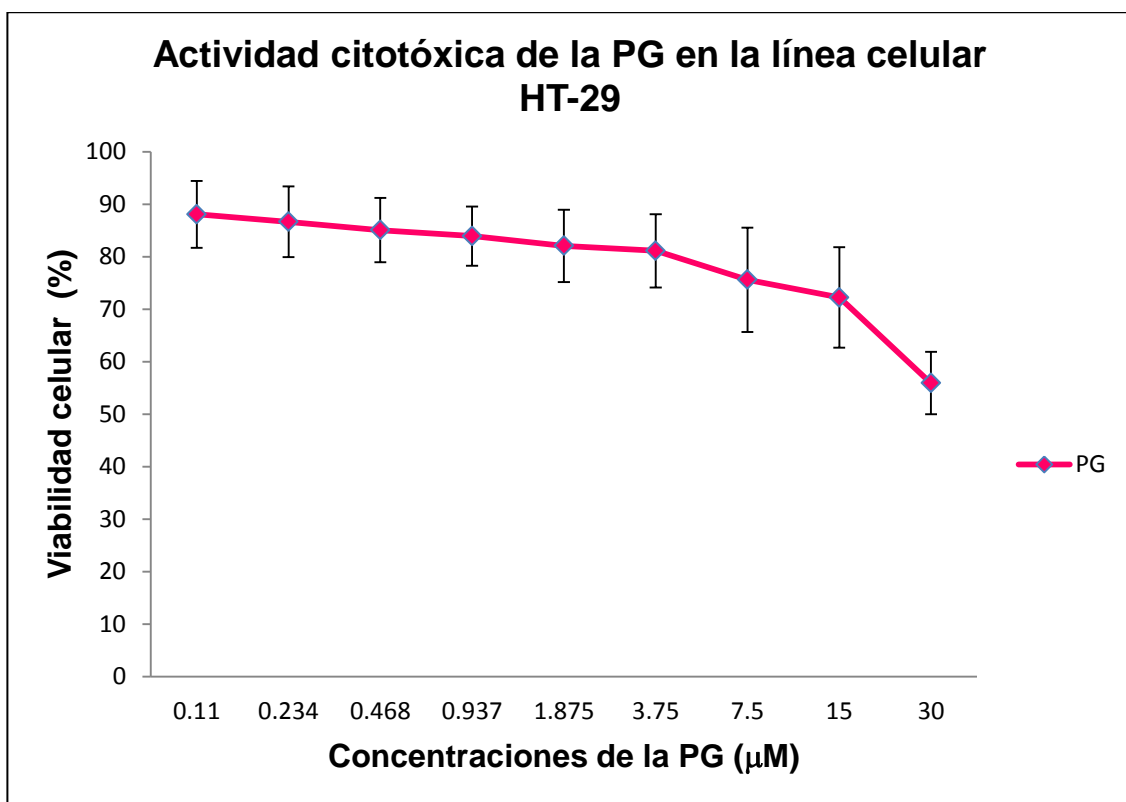
Figura 14. Análisis del cambio de la morfología celular de las células HT-29 y SiHa. Se observaron en el invertoscopio a 10X las células con los tratamientos PG y tratamiento comercial (VCR), ambas a una concentración de 30 μ M.

En los resultados graficados de la Actividad citotóxica, se muestra la viabilidad celular con respecto a la concentración de la PG en las líneas celulares tumorales HT-29 y SiHa.

El análisis de la línea celular HT-29 se muestra que a partir de la concentración de 0.11 μM de la PG la viabilidad disminuyó hasta un 12%, entre las concentraciones 0.11-3.75 μM se mantuvo la viabilidad alrededor de un 80%. Y a partir de la concentración de 7.5 μM comenzó a disminuir hasta llegar a la concentración de 30 μM con un 55.9% de viabilidad. La gráfica representa un efecto dosis-respuesta (Gráfica 2).

Con el análisis de Anova se presentó que este ensayo es estadísticamente significativo lo cual la $p < 0.05$ fue de 0.001.

En este análisis la PG si tiene efecto citotóxico sobre la línea celular de cáncer de colon.

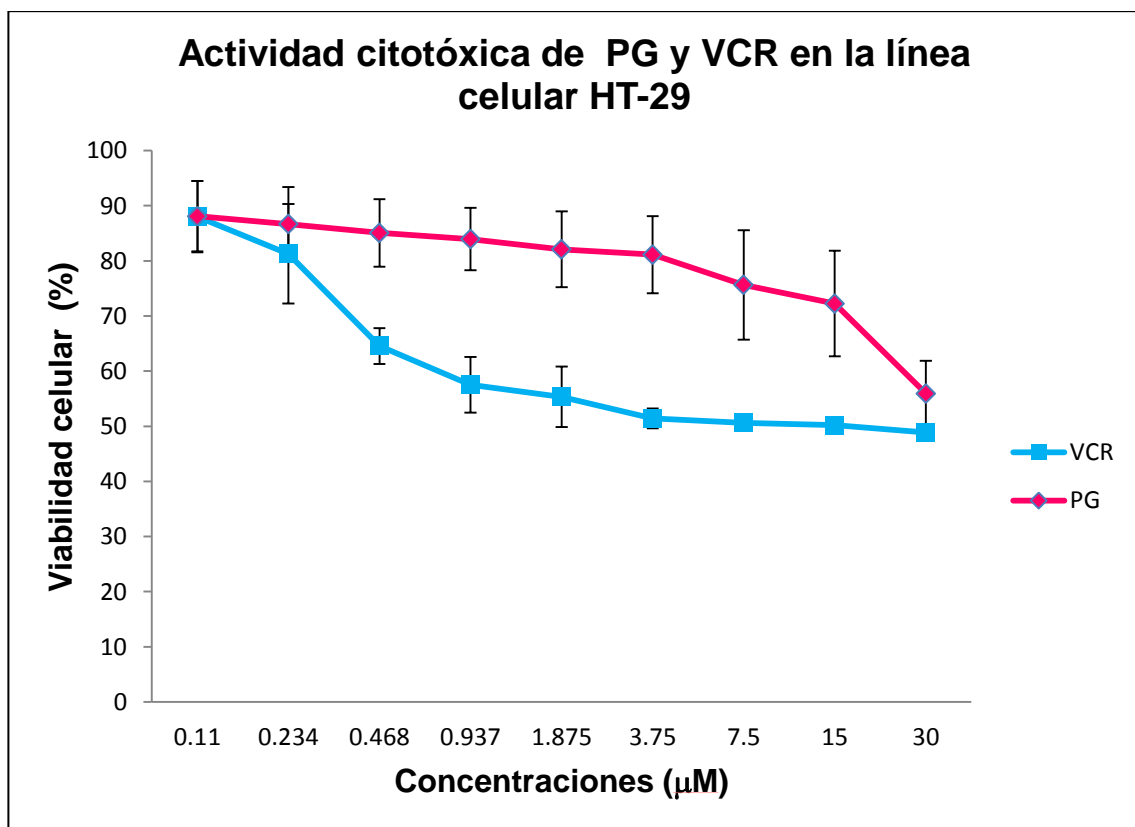


Gráfica 2. Actividad citotóxica de la prodigiosina en la línea celular HT-29 a las 72 h. Se muestra una reducción a partir de 7.5 μM , y en 30 μM se obtiene una viabilidad del 55.9%. 3 ensayos por triplicado.

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE HT-29						
Origen de la variación de cuadrados de libertad	de los cua	F	Probabilidad crítica para F			
Entre grupos	2415.29416	8	301.91177	5.69549093	0.00106968	2.5101579
Dentro de lo	954.160393	18	53.0089107			
Total	3369.45456	26				

Tabla 2. Análisis de varianza (Anova) de la Actividad Citotóxica de la PG en HT-29. Valor de $p < 0.05$.

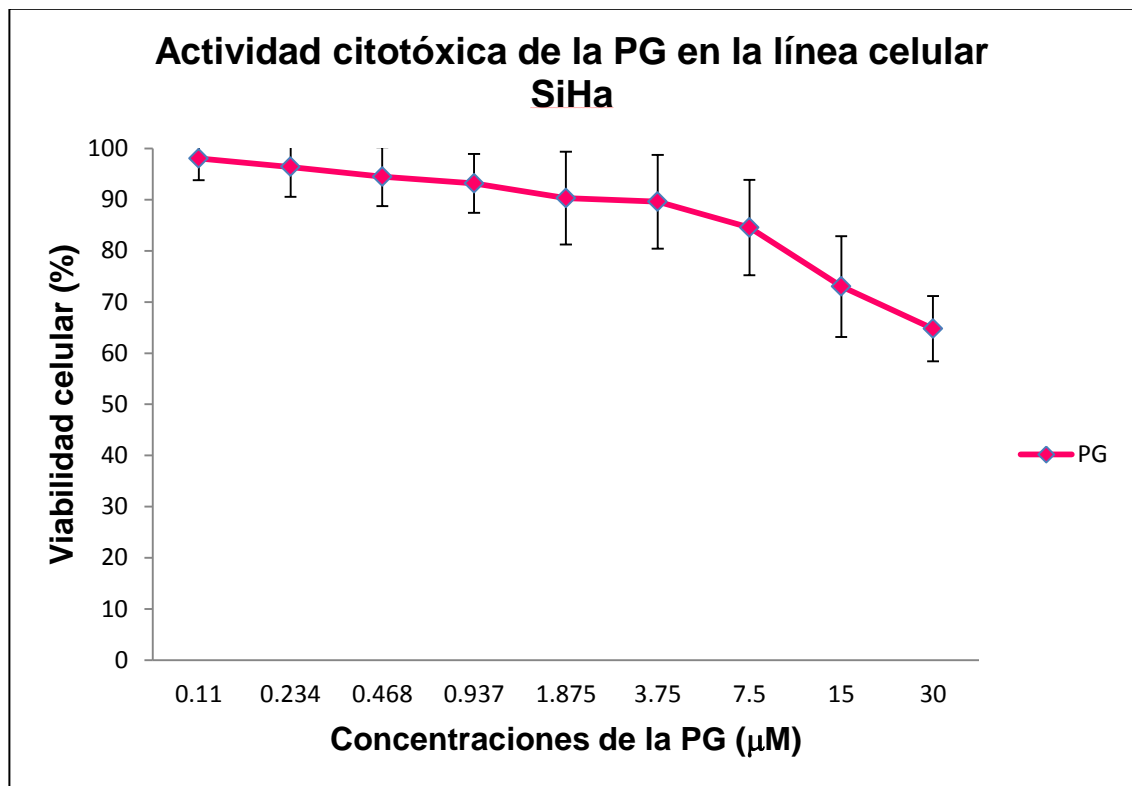
Además se comparó la PG con la VCR, en donde podemos analizar que a la concentración de $0.11 \mu\text{M}$ tuvieron una viabilidad muy cercana alrededor del 87%. Con el aumento de concentraciones la VCR se observaba con mejor efecto sobre las células tumorales que la PG entre las concentraciones $0.2-15 \mu\text{M}$, sin embargo a la concentración de $30 \mu\text{M}$ tienen una viabilidad muy cercana 55.9% y 48.8% respectivamente (Gráfica 3).



Gráfica 3. Comparación de la bioactividad citotóxica de la PG y VCR en las células HT-29 a las 72 h. A la concentración de $30 \mu\text{M}$ se obtuvieron viabilidades muy cercanas, PG (55.9%) y VCR (48.8%). 3 ensayos por triplicado.

El análisis cuantitativo de la línea celular SiHa, se muestra que a partir de la concentración de 0.11 μM hasta 1.875 μM se mantuvo alrededor de un 90% de viabilidad, y a partir de la concentración de 3.75 μM comenzó a disminuir hasta llegar a la concentración de 30 μM se obtuvo un 64.7% de viabilidad, estos resultado demuestran un efecto de dosis-respuesta. Y además demuestran que la PG tiene actividad citotóxica en las células SiHa, sin embargo se visualizó un mejor efecto con las células HT-29 (Gráfica 4).

Se realizó el análisis de varianza y se presentó que en este ensayo con las células de cáncer de cérvix es estadísticamente significativo lo cual la $p < 0.05$ fue de 0.0004.

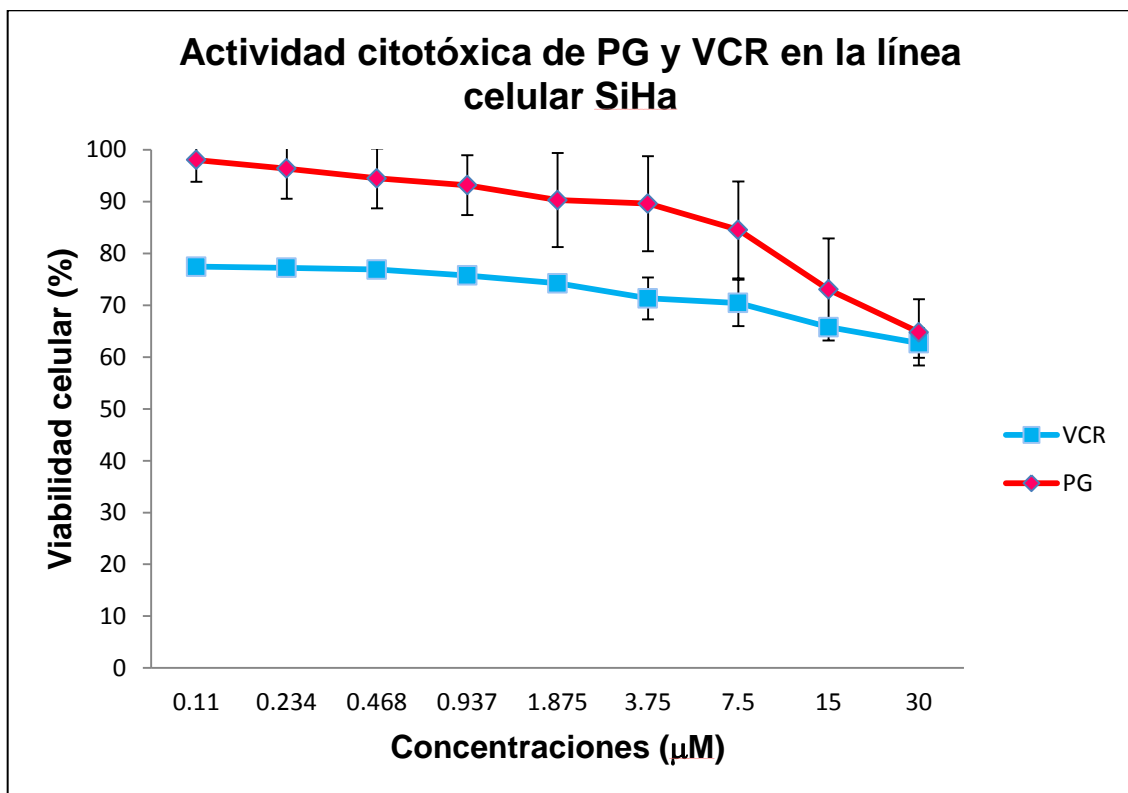


Gráfica 4. Actividad citotóxica de la prodigiosina en la línea celular SiHa a las 72 h. Se muestra que a la concentración mayor de 30 μM se tiene un 64.7% de viabilidad. 3 ensayos por triplicado.

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE SIHA						
Origen de la variación de cuadrados de libertad de los cua	F	Probabilidad/crítico para F				
Entre grupos	3049.22615	8	381.153269	6.72582118	0.00040033	2.5101579
Dentro de lo	1020.06263	18	56.6701461			
Total	4069.28878	26				

Tabla 3. Análisis de varianza (Anova) de la Actividad Citotóxica de la PG en SiHa. Valor de $p < 0.05$.

En este ensayo también se comparó la PG con la VCR con en las células SiHa. Se observó que las células SiHa con PG a la concentración de $0.11 \mu\text{M}$ tuvo una viabilidad de 98% y con VCR tuvo una viabilidad del 77.4%. A la concentración de $30 \mu\text{M}$ tienen una viabilidad muy cercana entre la PG y la VCR con un 64.7% y 62.6% viabilidad respectivamente. Visualizando también un mayor efecto de la VCR que la PG en esta línea celular (Gráfica 5).



Gráfica 5. Comparación de la actividad citotóxica de la PG y VCR en las células SiHa a las 72 h. Al principio de las concentraciones mínimas los dos tratamientos se observan separados y a $30 \mu\text{M}$ tienen una viabilidad muy cercana con PG un 64.7% y con VCR un 62.6%. 3 ensayos por triplicado.

3.4 Cuantificación de las partículas virales mediante la titulación del virus

Antes de realizar la actividad antiviral de la PG se determinó las unidades formadoras de placa líticas (UFP/mL) del VHS-1 KOS, presente en 1 mL de cada dilución (1-10) del título viral. Esto con el fin de cuantificar cuantas partículas virales se cuentan en cada mL.

La infección por el VHS-1 causa daño celular, provocando cambios en la morfología de la célula y lisis celular son visibles a microscopía óptica. La morfología de las células con un efecto citopático consiste en hinchamiento de la célula y desprendimiento celular progresivo del soporte, formación de sincitios o pequeños huecos en la monocapa celular.

En la examinación visual directa de las diluciones del VSH-1 en campo fresco, se observa el efecto citopático de la célula de las diferentes diluciones. En las células control sin infección se observa la monocapa intacta sin ningún cambio morfológico, células alargadas y con núcleos definidos. En el apartado A se observa con mayor efecto citopático debido a que la cantidad de las partículas virales es mayor, en donde las células perdieron su capacidad de adherencia y las células presentaron más daño celular que finalizó en la lisis celular. En el apartado B y C aún se visualiza separación de las células, las células se ven de forma redonda y desprendidas, existe un menor daño citopático. El Apartado D se observa la monocapa con poco daño celular. En el Apartado E y F se visualizan con formación de sincitios o zonas líticas. En apartado G, H, I y J se visualiza la monocapa sin zonas líticas debido a que las partículas virales de estas diluciones son muy pocas. (Figura 15).

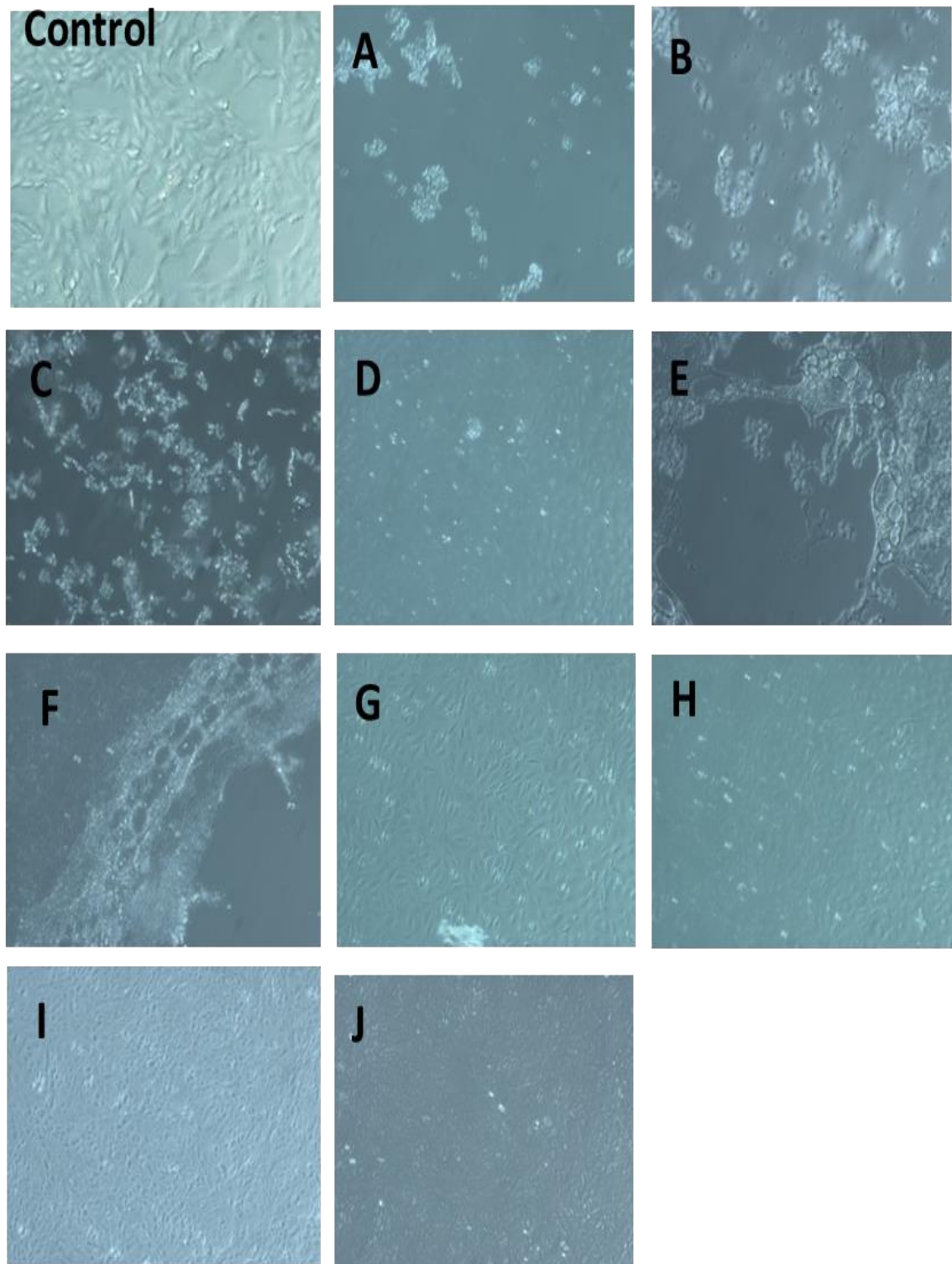


Figura 15. Efecto citopático de las célula Vero con VHS-1. Se observa cambio citopático de la monocapa de las células infectadas con el VHS-1, desde la dilución 10^{-1} perteneciente a letra A, hasta 10^{-10} perteneciente a la letra J, además un control de células sin infección con la monocapa completa a 20X.

Adicional a este ensayo se realizó una tinción de Giemsa para la visualización de las UFP del VHS-1 en las células Vero. En las 2 primeras diluciones (10^{-1} y 10^{-2}) se lisaron completamente las células por el alto contenido de partículas virales y debido a esto no se alcanza a ver la monocapa. En la dilución 10^{-3} y 10^{-4} se observan restos de células pero sin formación de zonas líticas definidas. En la dilución 10^{-5} y 10^{-6} permite cuantificar las UFP líticas (343 UFP y 16 UFP). En la 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} se alcanza a visualizar la monocapa sin UFP líticas por que las partículas existentes en esta dilución son muy pocas (Figura 16).

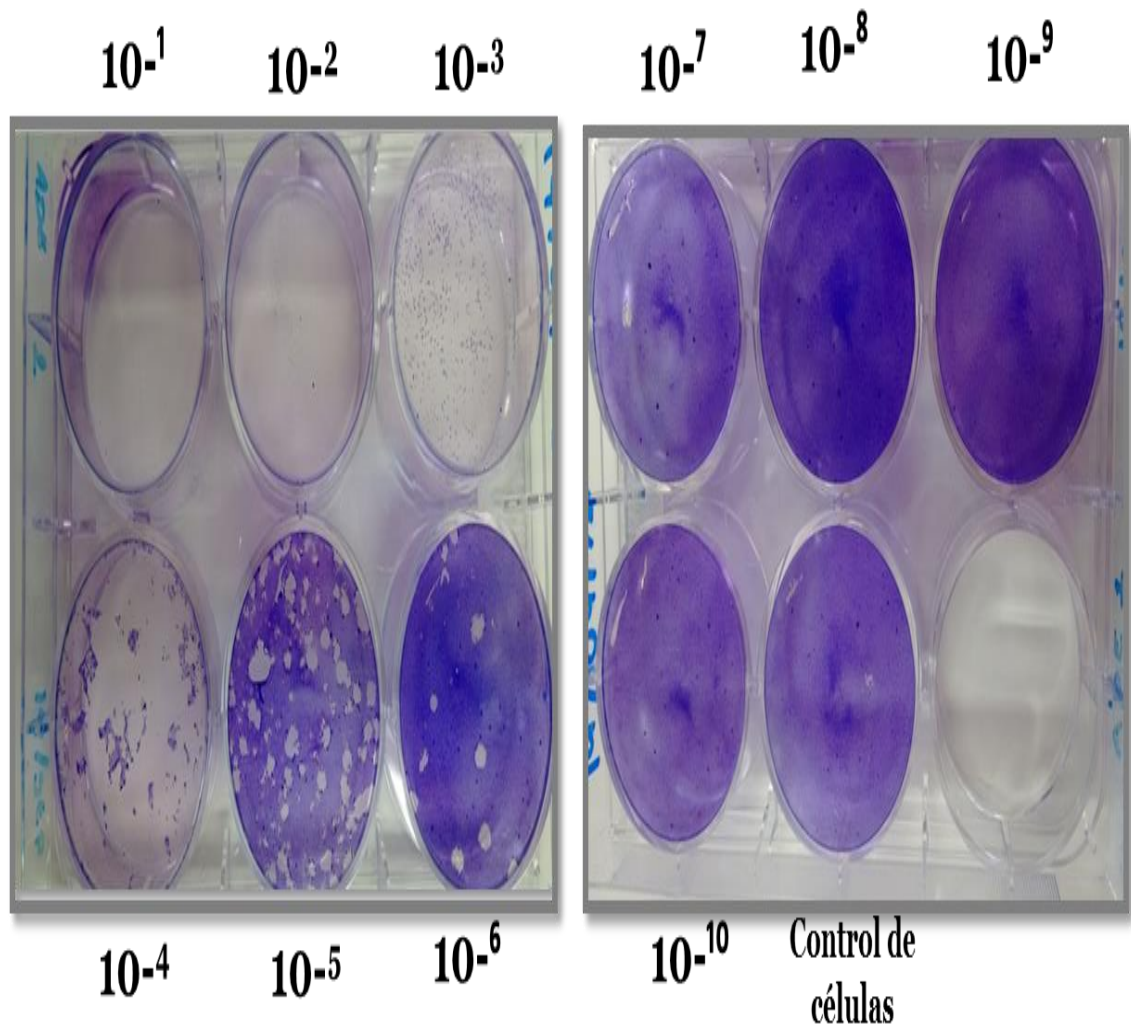


Figura 16. Formación de placas líticas a diferentes diluciones en la titulación viral. Se representan dos placas a diferentes diluciones del virus.

Además en la Figura 17, en el apartado A se visualiza en el campo claro la transformación de una monocapa sin infección a una con infección con el VHS-1. Se muestra el efecto citopático por la replicación de la partícula viral con manifestación de cambio morfológico (de una célula alargada a una célula redondeada). Y en el apartado B se visualiza las UFP causadas por las partículas virales con la tinción Giemsa.

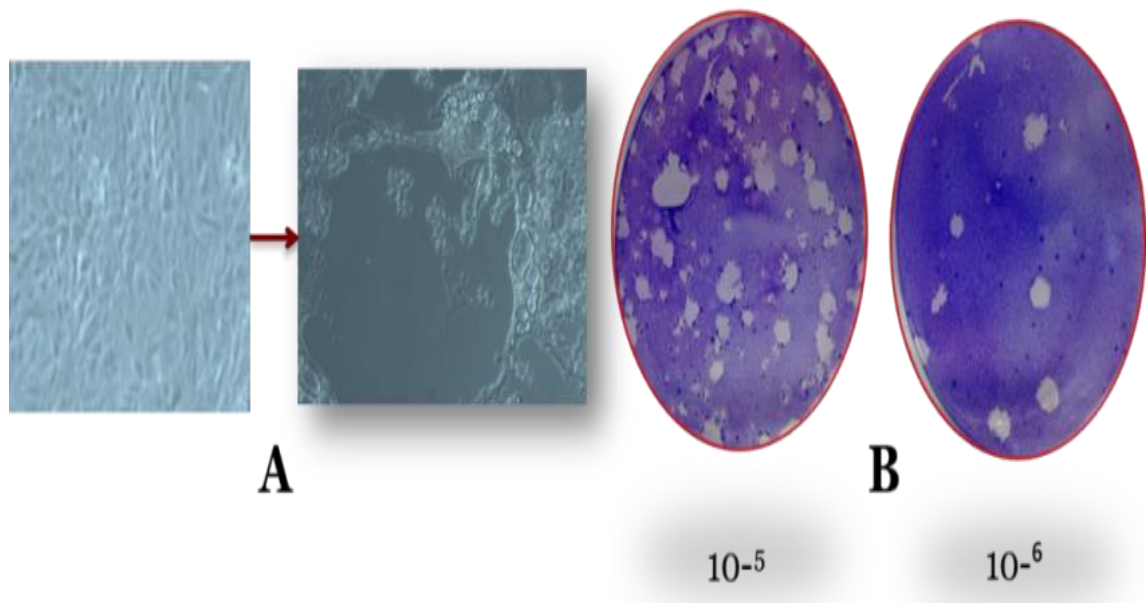


Figura 17. Unidades formadoras de placa. A) Campo claro con la formación de las UFP desde una monocapa sin infección pasando a una monocapa con infección lítica la cual forma pequeños huecos llamados UFP. B) Tinción giemsa se observa las UFP de la dilución 5 y 6 se observa a 10X.

3.5 Actividad antiviral de la PG en las células Vero en un modelo de la infección con el VHS-1

En base al método anterior se procedió a realizar la actividad antiviral de la PG con el método de reducción de placas líticas. En los resultados graficados de la Actividad antiviral de la PG, se muestran las UFP esto podría deducirse como Unidades virales del VHS-1 con las concentraciones de la PG.

Con la tinción Giemsa se analizó la actividad antiviral, se obtuvo que a la concentración de 30 y 15 μM de PG no existen formación de UFP, mientras a partir de las concentraciones de 7.5 μM comienza a existir zonas líticas cuantificables (11 UFP), 3.75 μM (50 UFP), 1.875 μM (65 UFP), 0.937 μM (73 UFP), 0.468 μM (76 UFP), 0.234 μM (82 UFP) y 0.11 μM (86 UFP) (Figura 18).

Se determinó que entre mayor es la concentración de la PG mayor es la reducción de las UFP líticas. Y se puede analizar que a partir de la concentración de 0.11 μM de PG reduce 15 % de las partículas virales, en la concentración de 3.75 μM reduce un 51% de la UFP, reduciendo el daño citopático de la infección viral y a la concentración de 30 μM no se visualizan zonas líticas causadas por el VHS-1 (Grafica 6). Se usó un control con el fármaco usado en tratamiento del VHS-1 el Aciclovir con 8.8 μM , con esta concentración la monocapa se encuentra completa.

Es importante señalar que en la actividad antiviral se obtuvo una $p < 0.05$, lo cual este ensayo es estadísticamente significativo. Y se evidencia una actividad bioactiva de la PG sobre el VHS-1.

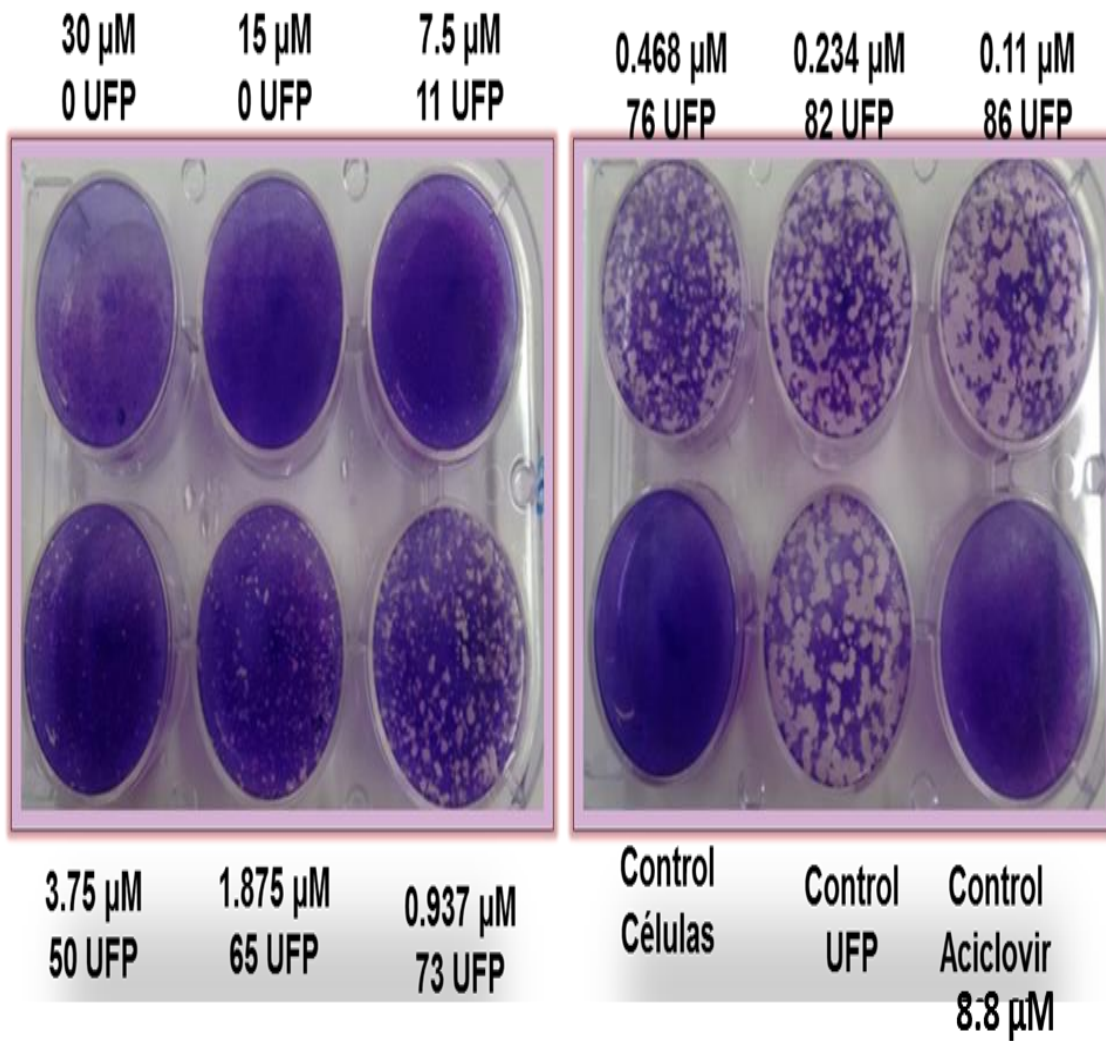
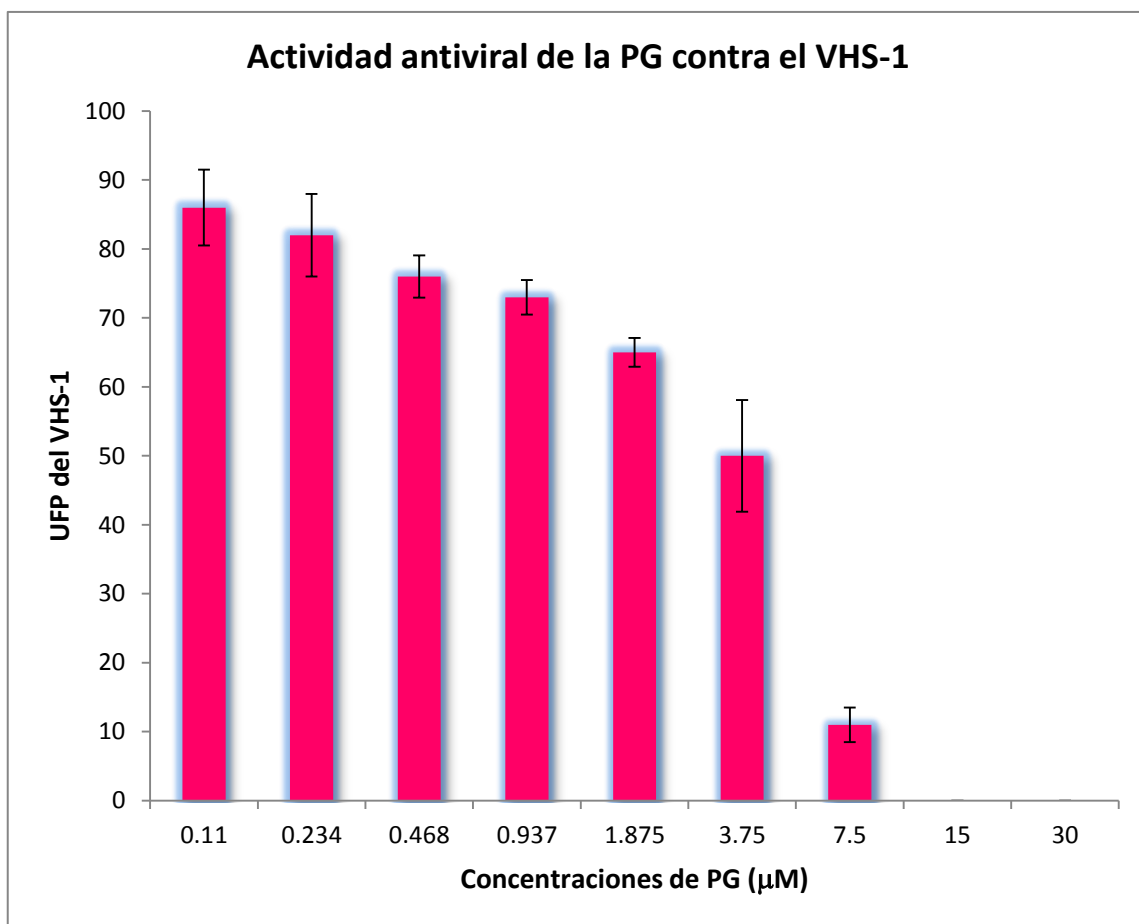


Figura 18. Formación de las Unidades formadoras de placa de la PG contra el VHS-1. Se observa que a mayores concentraciones de PG mayor es el efecto que causa la sobre el VHS-1, se visualizan las concentraciones y las UFP de cada una de ellas. Ensayo por triplicado.



Gráfica 6. Actividad antiviral de la PG contra el VHS-1 a 72 h. Se observa reducción de placas virales a mayores concentraciones de PG.

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL						
Origen de las varian	de cuadrados	de libertad	de los cua	F	Probabilidad	crítico para F
Entre grupos	29042.6667	8	3630.33333	18.4802036	3.3796E-07	2.5101579
Dentro de lo	3536	18	196.444444			
Total	32578.6667	26				

Tabla 4. Análisis de varianza (Anova) de la Actividad Antiviral. Valor de $p < 0.05$.

CAPITULO 4

DISCUSIÓN

Obtención de la PG

La PG es un metabolito secundario caracterizado por ser un pigmento rojo producido por *S. marcescens*. A la PG se le atribuye distintas bioactividades: antimicrobiana, antifúngica, antiprotozoaria, antitumoral y antiviral (Stankovic *et al.*, 2014).

La producción de la PG depende de algunos nutrientes para la biosíntesis de este metabolito como tiamina y ácido férrico; y durante un tiempo se buscó una serie de medios de cultivo para mejorar la producción de la PG de *S. marcescens*. Por otro lado Giri *et al.*, (2004) descubrió un nuevo caldo hecho con la semilla de cacahuate, el cual da una mayor producción de la PG. En nuestro presente trabajo, utilizamos el medio con extracto de cacahuate utilizando solo el 1%.

De acuerdo al medio patentado por Nakamura *et al.*, (1986) utilizo 2% de oleato de sodio para la producción de PG además agregó ácido oleico y trioleína en donde obtuvo 0.69 mg/mL de PG, por otra parte nosotros obtuvimos alrededor de 30 mg/100 mL, posiblemente por una mayor adición de aceite que necesita la bacteria para la producción de PG.

Después de la purificación, se determinó la identificación de la PG con el análisis de CCF, espectro de UV y espectro de IR; en la CCF se usó el solvente para la migración cloroformo/metanol (9:1), obtuvimos un R_f 0.72.

Para el espectro de absorción de UV/vis de la PG se obtuvo una longitud de onda de 538.301 nm, lo cual es muy similar con lo reportado por Husain *et al.*, (2012) y Patil *et al.*, (2011) reportaron una longitud de onda de 534 nm y 536 nm respectivamente.

Según Giri *et al.*, (2004) la molécula de la PG está formada principalmente por tres anillos tripirrólicos y su estructura química es la siguiente: (2-metil-3-pentil-6-metoxi). Se determinó el espectro de IR y se comprobó que la molécula de la PG se encuentra como molécula principal según los picos obtenidos de 3295.88, 2851.18, 1651.96, 1460.39, 1377.44 y 1097.68 cm^{-1} ; estos coinciden con lo reportado por Chauchan *et al.*, 2015, el pico de 3446.64 pertenece a $-\text{NH}$, el de 2922.99 a $-\text{CH}_3$, el de 1638.98 a $\text{C}=\text{N}$, el de 1464 a $\text{C}=\text{C}$, el de 1379 a $\text{C}-\text{O}$, el de 1083 cm^{-1} a $-\text{C}-\text{N}$.

Efecto de citotoxicidad de la PG en la línea celular Vero

Con el ensayo de citotoxicidad en las células Vero (control) se analizó y evaluó el efecto citotóxico de la PG, se realizó mediante la técnica de MTT.

A la concentración de 0.11 μM de PG se obtuvo un 98% de viabilidad celular y a la concentración de 30 μM de PG aún hay un 90% de viabilidad. Samrot *et al.*, (2001); realizaron un ensayo de citotoxicidad en la línea celular Vero con la PG y obtuvieron una IC_{50} de 77.29 μM . En estos resultados se determinó que la acción inhibitoria de la PG se encuentra por debajo a lo reportado por el autor antes mencionado. Además los resultados son comparables ya que se mantiene que la PG no causa daño a niveles bajos, pero sí a muy altas concentraciones de ella.

Determinación la actividad citotóxica de la PG en las líneas celulares tumorales HT-29 y SiHa

El cáncer es un problema de salud pública, siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo. En esta enfermedad las células cancerígenas proliferan sin control, dañando tejidos y avanzando a los órganos.

Seleccionamos dos líneas celulares para el análisis de la actividad citotóxica HT-29 y SiHa. Los resultados de las células HT-29 (línea celular de cáncer de colon); demostraron que a las concentraciones de 0.11-3.75 μM de PG se mantuvo alrededor de un 80% de viabilidad, a partir de la concentración de 7.5 μM comenzó una disminución de supervivencia inversamente proporcional al aumento de la concentración de la PG que se trabajaron y finalmente a la concentración de 30 μM se obtuvo un 55% de viabilidad.

Comparado con otros autores el análisis de PG en HT-29 analizado, tuvieron una viabilidad del 50% a la concentración de 0.1 μM de PG (Hassankhani *et al.*, 2015). Además en los trabajos de Montaner y Pérez, (2001), trabajaron con la línea celular SW-620, en la cual tuvieron un 50% de viabilidad a la concentración de 0.27 μM . Ambos trabajos difieren con nuestros resultados posiblemente por las condiciones de trabajo (número de células, horas del tratamiento, medios de cultivo y cambio genético).

Este mismo ensayo de las células HT-29 se comparó la PG y la VCR en las mismas concentraciones, se analizó que a la concentración de 0.11 μM tuvieron una viabilidad (80%) muy próxima en ambas moléculas. Conforme aumentaron las concentraciones estas se visualizaron muy próximas pero la VCR, parecía tener un mejor efecto sobre estas células. Sin embargo a la concentración de 30 μM ambas moléculas tienen una reducción de viabilidad muy cercana 51% (PG) y 44%(VCR).

Por otro lado la línea celular SiHa (línea celular de cáncer de cérvix); se determinó que a las concentración de 0.11-1.875 μM de PG se mantuvo alrededor de un 90% de viabilidad, a partir de la concentración de 7.5 μM disminuyó un 15% y la concentración de 30 μM se obtuvo un 64% de viabilidad.

Comparado en la literatura Kavitha *et al.*, (2010) y Sumathi *et al.*, (2014) ambos trabajaron con la línea celular Hela obtuvieron el 50% de viabilidad a la concentración de 0.7 μM y 4.3 μM de PG, y estos reportes son muy diferente a lo que nosotros obtuvimos por las razones antes mencionadas.

No obstante al analizar nuestros ensayos de la actividad de citotóxica en ambas líneas celulares con la PG, las líneas celulares HT-29 y SiHa mostraron ser sensibles a la molécula de la PG. Sin embargo se ve claramente su selectividad de inhibición en las células HT-29 en ambos ensayos en paralelo. Un factor que influye notoriamente en la selectividad de la PG sobre la línea celular HT-29 es que las células pertenecen a un tumor de I grado (invade mucosa) esto quiere decir que se encuentra en etapas tempranas del tumor y SiHa es de II grado del tumor (invade la capa subserosa o más allá) por lo tanto el tumor es más avanzado.

Además en este mismo ensayo se comparó la PG y la VCR en las células SiHa a las mismas concentraciones. A la concentración de 0.11 μM de PG se observan con una viabilidad alrededor del 100% y 70%, en donde parecía que la VCR tenía mejor efecto citotóxico en las células SiHa. Y a la concentración de 30 μM ambas moléculas tienen una viabilidad muy cercana un 64% (PG) y un 62% (VCR). En un estudio con VCR en células SiHa se obtuvo un 50% de viabilidad a la concentración de 3.57 μM SiHa, lo cual es muy diferente a lo que nosotros obtuvimos podría ser debido a las condiciones del analista o las disoluciones de la concentración (fallas en el pipeteo) (Moghe *et al.*, 2010).

Por otro se han descrito posibles mecanismos acción de la PG sobre las células cancerosas: como modulador del pH, inhibidor del ciclo celular, agente de escisión de DNA ó activador mitógeno de las proteínas reguladoras de las quinasas, todas las rutas envían a la célula a la muerte por apoptosis (Montaner *et al.*, 2005). Y la VCR actúa como inhibidor de los microtúbulos en las células cancerosas, deteniendo su ciclo celular (Fang *et al.*, 2017).

La VCR es el fármaco utilizado en el tratamiento del cancer, en el tratamiento de la quimioterapia se utiliza una dosis de 1mg/mL equivalente a 1.21 μ M de VCR por semana (Drugs).

En la actualidad el cáncer es resistente a los tratamientos empleados, y la resistencia les permite auto-renovación de células cancerígenas, llevando una persistencia de la enfermedad. Por lo cual la PG podría ser un fármaco de mejor utilidad que los tratamientos clásico usados en esta enfermedad (Montaner y Pérez-Tomas 2001).

Según Darshan *et al.*, (2015) la PG tiene propiedades químicas inertes muy interesantes; no es irritante, no es tóxica, no es alergénica, no es carcinógena y es fotoestable, la cual puede usarse sin problemas en el tratamiento futuro de esta enfermedad.

Evaluación de la actividad antiviral de la PG contra el VHS-1

Se estima que el VHS-1 se encuentra distribuido en el mundo y causa una gran variedad de trastornos patológicos, desde una infección lítica o latente hasta la muerte.

Para la actividad antiviral de la PG se estableció a 100 UFP del VHS-1, en nuestros resultados se observó un 50% de la reducción de las UFP a partir de la concentración de 3.75 μ M y además se determinó la susceptibilidad de la PG contra el VHS-1 en los ensayos *in vitro*.

Zhou *et al.*, (2016) estudiaron la actividad antiviral de la PG sobre células infectadas con el virus Bombyx mori nucleopolyhedrovirus (BmNPV) por el

método de MTT y obtuvieron una IC_{50} de $1.56 \pm 0.18 \mu M$. Estos resultados son muy semejantes a los nuestros al concluir que la PG tiene actividad antiviral, sin embargo debemos tomar en cuenta que son dos métodos diferentes: el MTT se fundamenta principalmente en la actividad metabólica de las células, en el cual las deshidrogenasas mitocondriales reduce las sales de (MTT) sales de tetrazolio a formazan y el método que empleamos se basó principalmente el reducir las placas líticas del virus.

El fármaco control de ACV se utilizó en su IC_{50} de $8.8 \mu M$ (Sangdara y Bhattarakosol, 2008) y se observó una total reducción de las UFP con susceptibilidad al VHS-1. Sin embargo se ha reportado resistencia del virus a este fármaco principalmente en pacientes inmunosuprimidos, es por esto que se buscan nuevos tratamientos contra el VHS-1, con menos resistencia y mayor efecto terapéutico.

Con esto podemos deducir que la PG podría ser un buen fármaco para el tratamiento del virus, debido a que la molécula tiene actividad antiviral.

Para que un medicamento antiviral sea seguro en la terapia, debe cumplir dos requisitos; primero que sea específico y segundo que tenga un índice terapéutico adecuado. Se define el índice terapéutico como la relación entre la dosis que inhibe la replicación viral y la dosis tóxica para el huésped (Vargas-Córdoba, 2002).

Además Zhou *et al.*, (2016) buscaron la posible ruta de la PG sobre el virus BmNPV realizaron ensayos de fluorescencia, los cuales mostraron que la localización de la PG predomina en el citoplasma y ellos sugieren que podrían interactuar con factores del citoplasma para inhibir la replicación del virus, y las progeñe del virus mediante el daño del ADN viral.

Mientras la acción del ACV es selectiva para el VHS-1, debido a que la forma inactiva de ACV es fosforilada selectivamente por una timidina-quinasa codificada por el virus, formando ACV monofosfato es posteriormente convertido en ACV difosfato por una guanilato de quinasa. Y consecutivamente

la molécula se activa a ACV trifosfato, se incorpora a la ADN polimerasa del virus, e inactiva irreversiblemente el virus (Velázquez *et al.*, 2009).

Por todo lo anterior apoya nuestra hipótesis: La prodigiosina de *S. marcescens* aislada del Estado de Nuevo León, México, presento citotoxicidad en las líneas celulares tumorales y en línea celular con infección de VHS-1 en ensayos *in vitro*.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

1. Se obtuvo 30 mg de PG por cada 100 mL del cultivo en un medio cacahuete al 1%, a 28 °C, en condiciones aeróbicas y un pH de 7. Y se confirmó la existencia de la prodigiosina, como molécula principal con las pruebas de cromatografía en capa fina, UV e IR.
2. Con el ensayo de citotoxicidad de la PG en la línea celular Vero, se determinó que a la mayor concentración de 30 μ M de PG aún hay un 90.9 % de viabilidad.
3. Se determinó la actividad citotóxica de la PG en las células HT-29 y SiHa, en la concentración de 30 μ M de PG se obtuvo un 55.9 % y 64.7% de viabilidad de cada línea celular.
5. En la actividad citotóxica se obtuvo que la PG tiene mayor efecto citotóxico en las células HT-29, la cual podría ser una molécula selectiva para el tratamiento de este tipo de Adenocarcinoma.
6. Se demostró que la PG tiene actividad antiviral desde la concentración de 3.75 μ M, la cual reduce un 51% de la UFP líticas. Con esto podemos deducir que la PG podría ser un tratamiento nuevo contra el VHS-1.

6. PERSPECTIVAS

- Incrementar el rango de la PG en ambas actividades.
- Determinar la selectividad en otras líneas celulares tumorales.
- Usar otros tipos de Virus para evaluar la actividad antiviral de la PG.
- Determinar la genotoxicidad de la PG en el modelo de infección con el VHS-1.
- Analizar la neurotoxicidad de la PG, ya que el VHS-1 invade el sistema neuronal.
- Encontrar el mecanismo de acción de la PG sobre el VHS-1.
- Realizar un ensayo de virucidad extracelular.
- Valorar los genes implicados en el mecanismo de PG en el VHS-1.
- Evaluar los niveles de toxicidad y efectos farmacológicos en un modelo murino de la PG.

REFERENCIAS

- Avila-Gaindo, L. F., Acosta-Aguilar, L. A., Álvarez-Valencia, L. H., Morales-San Claudio, P. C., Villarreal-Chiu, J. F. 2015. Producción, Extracción, y Purificación de prodigiosina a partir de una bacteria nativa del estado de Nuevo León.
- Bogenrieder, T., Herlyn, M. 2003. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metástasis. *Oncogene*, 42, 6524-36.
- Bromberg, N., Duran, N. 2001. Violacein transformation by peroxidases and oxidases: implications on its biological properties. *Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 463-467.
- Campas, C., Dalmau, B., Montaner, M., Barragan, B., Bellosillo, D., Colomer, G., Pons, R., Perez-Tomas, R. 2003. Prodigiosin induces apoptosis of B and T cells from B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 17,746–750.
- Capaccio, G. 2013. *Cancer Treatmens*. Edi. Marshall Cavendish Benchmark, 64, 20-45.
- Chauchan, K., Dalsaniya, p., Pathar, H. 2015. Optimization of Prodigiosin-type Biochrome Production and Effect of Mordants on Textile Dyeing to Improve Dye Fastness. *Springer*, 16, 802-808.
- Choi, H. S., Kim, D. A., Chung, H., Park, I. H., Kim, B. H. 2017. Screening of breast cancer stem cell inhibitors using a protein kinase inhibitor library. *Cancer cell International*, 17, 2-12.
- Colvin, H., Mori, M. 2017. Getting to the heart of the matter in cancer: Novel approaches to targeting cancer stem cells. *Proceedings of the Japan Academy*, 93, 146-154.
- Darshan, N., Manonmani, H. K. 2015. Prodigiosin and its potential applications. *Association of Food Scientists & Technologists*, 52, 5393-5407.
- Deorukhkar, A. A., Chander, R., Ghosh, S. B., Sainis, K. B. 2007. Identification of a red-pigmented bacterium producing a potent anti-tumor N-alkylated prodigiosin as *Serratia marcescens*. *Microbiology*, 158, 399- 404.
- Drugs (consultado en www.drugs.com/dosage/vincristine.html) consultado el 20 de Abril del 2017.
- Duran, N., Menck, F. M., 2001. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspective. *Microbiology*, 27: 201-222.

- Duzhak, A. B., Panfilova, Z. I., Duzhak, T. G., Vasyunina E. A., Shternshis M. V. 2012. Role of prodigiosin and chitinases in antagonistic activity of the bacterium *Serratia marcescens* against the fungus *Didymella applanata*. *Biochemistry*, 8, 77-78.
- Fang, G., Rui, D., Qi, Z., Wei, C., Feifei, L., Long, L., Wei, L., Linna, L., Dexuan, Y., Lan, X., Shoujun, Y., Lili, W. 2017. WX-132-18B, a novel microtubule inhibitor, exhibits promising anti-tumor effects. *Oncotarget*, 10, 186-190.
- Fica, A. C., Pérez, C. C., Reyes, O. P., Gallardo, P. S., Calvo, P. X., (2005). *Infectología*. 1, 38-46.
- Ferrándiz, C. 2001. *Dermatologia Clínica*. Elsevier. 2, 45-46.
- Fröhner, A., Antonio, C. R., Creczynski-Pasa, R. V., Barardi, T. B., Simões, C. M. O. 2003. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *SciELO*, 98, 843-844.
- García-Rodríguez, J. A., Picazo, J.J. 1999. Elsevier. 1, 294-29.
- Genes, C., Baquero, E., Echeverri, F., Maya, J. D., Triana, O. 2011. Mitochondrial dysfunction in *Trypanosoma cruzi*: the role of *Serratia marcescens* prodigiosin in the alternative treatment of Chagas disease. *Springer*, 4, 66-68.
- Giri, A. V., Anandkumar, N., Muthukumar, G., Pennathur, G. 2004. A novel medium from the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiology*, 4, 1-18.
- Glûck, B., Mõbius, U., Pfaff, F., Zell, R., Sauerbrei, A. 2015. Novel method for genotyping clinical herpes simplex virus type 1 isolates. *Springer*, 5, 44-46.
- Grimont, P. A. D., Ichikawa, H. L. C. 1991. *Serratia*. *General Microbiology*, 18, 66.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 1, 57-70.
- Harris, A. K. P., Williamson, N. R., Slater, H., Cox, A., Abbasi, S., Foulds, I., Simonsen, H. T., Leeper, F. J., Salmond, G. P. C. 2004. The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, show species and strain-dependent genome context variation, *microbiology*, 150, 3247-60.

- Hassankhani, R., Mohammad, S., Esmaeilou, M., Ahangar, P. 2015. Prodigiosin isolated from cell wall of *Serratia marcescens* alters expression of apoptosis-related genes and increases apoptosis in colorectal cancer cells. *Medical Oncology*, 32, 366-367.
- Helvia, W., Casullo, A., Fukushima, K., Galba, M., Campo, T. 2010. Prodigiosin Production by *Serratia marcescens* UCP 1549 using Renewable-Resources as a Low Cost Substrate. *Molecules*, 15, 6931-6940.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. A., Staley, J. T., Williams, S. T. 1994. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. Ed. William & Wilkins, 9^o edition. 84.
- Husain, M., Jahagirdar, N., Aruna K. 2012. Study on Optimization of Prodigiosin production by *Serratia marcescens* MSK1 Isolated from Air, *International Journal of Advanced Biological Research*, 2, 671-680.
- INEGI. (disponible en <http://www.inegi.org.mx/>) consultado el 14 de Junio del 2017.
- Kavitha, R., Aiswariya, S., Chandana, R. M. 2010. Anticancer activity of red pigment from *Serratia marcescens* in Human cervix carcinoma. *Pharmaceutical*, 2, 784-787.
- Khanafari, A., Assadi, M. M., Fakhr, F. A. 2006. Pigmentation in *Serratia marcescens*. *Biology Science*, 1, 1-13.
- Kobayashi, N., Ichikawa, Y: 1991. Separation of the prodigiosin localizing crude vesicles which retain the activity of protease and nuclease in *Serratia marcescens*. *Microbiology Immunology*, 35, 607-614.
- Kraft, E., 1902. Beitrage zur biologie des *B. Prodigiosus* und zum chemischen verhalten seines pigments. University of Wurzburg, Germany, 2, 3-8.
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. 2005. *Patología Estructural y Funcional*. Elsevier, 7, 369-371.
- Kurbanoglu, E. B., Ozdal, M., Ozdal, O. G., Algur, O. F. 2014. Enhanced production of prodigiosin by *Serratia marcescens* MO-1 using ram horn peptone. *Microbiology*, 46, 631-637.

- Lapenda, J. C., Silva, P. A., Vicalvi, M. C., Sena, K. R., Nascimento, C. 2014. Antimicrobial activity of prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* UFPEDA 398. *Microbiology y Biotecnology*, 8, 4-5.
- Leon, L. L., Miranda, C. C., Souza, A. O., Duran, N. 2001. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. *Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 449-450.
- McClain, L., Zhi, Y., Cheng, H., Ghosh, A., Piazza, P., Michael, B., Kumar, S., Milosevic, J., Bloom, D., Arav-Boger, R., Kinchington, P. R., Yolken, R., Nimgaonkar, V., D'Aiuto, L. 2015 Broad-spectrum non-nucleoside inhibitors of human herpesviruses. *Antiviral*, 121, 16–23.
- Maderville, R. A. 2001. Systemic, proton affinity and anticancer properties of the prodigiosin group natural products. *Medicinal Chemistry*, 1, 195-218.
- Matsuyama, T., Murakami, T., Fujita, M., Fujita, S., Yano, I. 1986. Extracellular vesicle formation and biosurfactant production by *Serratia marcescens*. *Microbiology*, 132, 865-875.
- Mettenleiter, T. C. 2003. Pathogenesis of Neurotropic Herpesviruses: Role of Viral Glycoproteins in Neuroinvasion and Transneuronal Spread. *Virus Research*, 92, 197-206.
- Melo, P. S., Maria, S. S., Vidal, B. C., Haun, M., Duran, N. 2000. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells *In vitro*. *Bioone*, 36, 639-543.
- Moghe, A. S., Gangal, S. G., Shikar, P. R. 2011. *In vitro* cytotoxicity of *Bryonia laciniata* (Linn) Naud. On human cancer cell line. 3, 322-329.
- Montaner, B., Navarro, S., Pique, M., Vilaseca, M., Martinell, M., Giralt, E., Gil, J., Perez-Thomas, R. 2000. Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induce apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *Pharmacology*, 131, 585-593.
- Montaner, B., Perez-Tomas, R. 2001. Prodigiosin-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Sciences*, 68, 2025–2036.
- Montaner, B., Castillo-Avila, W., Martinell, M., Ollinger, R., Aymami, J., Giralt, E., Perez-Tomas, R. 2005. DNA interaction and dual topoisomerase I and II inhibition properties of the anti-tumor drug prodigiosin. *Toxicological*, 85, 870–879.

- Morales-San Claudio. 2013. Identificación de antígenos Inmunodominantes del VHS-1 en pacientes con infección activa y sus comparación de la Infección latente *In vitro*. UANL, 30.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immunology methods*, 65, 55-63.
- Nakamura, A., Nagai, K., Ando, A., Tamura, G. 1986. Selective suppression by prodigiosin of the mitogenic response of murine splenocytes. *Antibiotics*, 39, 1155-9.
- Novak. N., Peng. W. M. 2005. *Clinical And Experimental Immunology. Pediatric Allergy*, 142, 405-410.
- OMS. (disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>) consultado el 12 de febrero del 2017.
- Patil, C. D., Patil, S. V., Salunke, B. K., Salunke, R.B. 2011. Prodigiosin produced by *Serratia marcescens* NMCC46 as a mosquito larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Parasitology Res*, 109, 1179–1187.
- Perez-Tomas, R., Montaner, B., Llagostera, E., Soto-Cerrato, V.2003. Theprodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties. *Pharmacology*, 66, 1447–1452.
- Roizaman, B., Knipe, D. M., Whitley, R. J. 2007. Herpes simplex virus. *Lippincott*. 1, 2501-2602.
- Roizman, B., Knipe, D, M., Whitley, R, J. 2007. Herpes simplex viruses. In: DMknipepmhowleydegriffinralambma martin. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia. P.A.: Lippincott-Williams y Wilkins, 45.
- Samrot, V., Chadana, K., Senthilkumar, P., Kumar, G., 2001. Optimization of prodigiosin production by *Serratiamarcescens*SU-10 and evaluation of its bioactivity. *Biotechnology*, 2,128-133.
- Samrot, A. V., Chandana, K., Senthilkumar, P., Nerendrakumar. G. 2011. Optimized production of Prodigiosin from *Serratia Marcescens* SU-10 Grom as Batch Culture and Evaluation of Bioactivity of Produced Prodigiosin. *Microbiological*, 3, 145-150.

- Sangdara, A., Bhattarakosol, P. 2008. Aciclovir susceptibility of herpes simplex virus isolates at King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok. *Medical Association of Thailand*, 6, 908-12.
- Sauerbrei, A., Deinhardt, S., Zell, R., Wutzler, P. 2010. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir resistant clinical isolates of herpes simplex virus. *Antiviral*, 86,246-52.
- Schubert, A., Gentner, E., Bohn, K., Schwarz, M., Mertens, T., Sauerbrei, A. 2014. Single nucleotide polymorphisms of thymidine kinase and DNA polymerase genes in clinical herpes simplex virus type 1 isolates associated with different resistance phenotypes. *Antiviral Research*, 107, 16–22.
- Sevcikova, B., Kormanec, J. 2004. Differential production of two antibiotics of *Streptomyces coelicolor*A3, actinorhodin and undecylprodigiosin, upon salt stress conditions. *Microbiology*, 181, 384–389.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Jemal, A. 2017. Cancer Statistics. *Cancer clinical*, 67, 7-30.
- Stankovic, N., Senerovic, L., Llic-Tomic, T., Vasijevic, B., Nikodinovic-Runic, J. 2014. Properties and applications of undecylprodigiosin and other bacterial prodigiosins, *Microbiol Biotechnol*, 98, 3841-3858.
- Stewart, S. A., Weinberg, R. A. 2000 Telomerase and human tumorigenesis. *Elsevier*, 10, 399-406.
- Song, M. J., Bae, J., Lee, D. S., Kim, C. H., Kim, J. S., Kim, S. W., Hong, S.I. 2006. Purification and characterization of prodigiosin produced by integrated bioreactor from *Serratia* sp. KH-95. *Bioscience y Bioengineering*, 101, 157-161.
- Soria, C., Nieto, N., Villacís, J. E., Lainez, S., Cartelle, M. 2016. Outbreak of *Serratia marcescens* in a Neonatal Intensive Care Unit: Guayaquil-Ecuador. *Scielo*. 6, 703-705.
- Sumathi, C. D., Priya, M., Swarnalatha, S., Dinesh, M. G., Sekaran, G. 2014. Production of prodigiosin using tannery fleshing and evaluating its pharmacological effects. *Scientific*. 14, 8-9.
- Suryawanshi, R. K., Patil, C. D., Borase, H. P., Salunke, B. K., Patil S. V. 2014. Studies on Production and Biological Potential of Prodigiosin by *Serratia marcescens*. *Biochem Biotechnol*, 173, 1209–1221.

- Tazón-Varela, M. A., Alonso-Valle, H., Muñoz-Cacho, P., Gallo-Terán, J., Piris-García, X., Pérez-Mier, L. A. 2016. Increased non-common microorganisms in community-acquired pneumonia. Elsevier. 16, 1138-3593.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A., 2015. Global cancer statistics, 2012. CA Cancer for Clinicians, 65, 87-108.
- Vaishnav, P., Demain, A. L. 2010. Unexpected application of secondary metabolites. Elsevier, 29, 223-229.
- Vargas-Córdoba, M. Virología Médica. Colombia Univ. 2002, 462, 412.
- Velázquez, L., Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J. C., Moro, M. A., Portoles, A. 2009. Dermatología Básica y Clínica. Médica Panamericana, 18, 920.
- Venil, C. K., Lakshmanaperumalsamy, P. 2009. An insightful overview on microbial pigment, prodigiosina. Biology, 5, 49–61.
- Williamson, N. R., Simonsen, H. T., Ahmed, R. A. A., Goldet, G., Slater, H., Woodley, L., Leeper, F. J., Salmond, G. P. C. 2005. Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosina, in *Serratia*: identification of a novel 2-methyl-3-n-amylyl-pyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*. Molecular Microbiology, 56, 971-989.
- Wrede, F., Rothhaas, A. 1934. Über das prodigiosin, den rotenfarbstoff des *Bacillus prodigiosus*. Biochemistry, 4, 226, 95.
- Whitley, R. J., Roziman, B. 2001. Herpes simplex virus infections. The Lancet, 357, 1513–1518.
- Yu, V. L. 1979. *Serratia marcescens*: historical perspective and clinical. New England Journal of Medicine, 16, 887-93.
- Zhou, W., Zeng, C., Liu, R. H., Chen, J., Li, R., Wang, X. Y., Bai, W. W., Lui, X. Y., Xiang, T. T., Zhang, L. 2016. Antiviral activity and specific modes of action of bacterial prodigiosin against Bombyxmori nucleopolyhedrovirus in vitro. Microbiol Biotechnol, 9, 3979-88.

APÉNDICES

APÉNDICE A

Congelación y activación celular

Para tener suficientes células se prepararon los stocks de la línea celular Vero para la congelación. Primero, las células se amplificaron en frascos de T-25 (25 mm²) hasta tener un frasco de cultivo T-175 (175 mm²) con células Vero, las células que fueron confluentes se cosecharon con medio y su complementación antes mencionadas. Segundo se re-suspendieron en medio fresco con 5% de DMSO, fueron ajustadas a 2×10^6 cel./ml/criovial. Se etiquetaron y se almacenaron durante 3 h en refrigeración, 8h a -20°C y posteriormente se pasó a -80°C.

Para la activación de células se sacó el criovial congelado en hielo 20 min., después de esto se descongeló en el refrigerador 30 min., se colocó 10 min. a temperatura ambiente. Se centrifugó y se desechó el sobrenadante. Posterior a esto se colocó medio fresco y se centrifugó nuevamente, se desechó el sobrenadante. Finalmente se re-suspendió con medio y se pasó a un frasco T-25 con 3 mL de medio fresco complementado, se incubó a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

APÉNDICE B

Mantenimiento de células

Las células se colocaron en frascos T-25 y a partir de este se realizaron pasajes con una confluencia del 85%. Para el cambio del medio se realizó lavados con PBS 1X a un pH 7.4, se le agrega medio nuevo complementado y con el paso de los días se realizaba lavado cada 2-3 días.

Para realizar el pase de células una vez a la confluencia deseada se realizaba los lavados con PBS, se agregó 0.5 mL de tripsina al 1X para el frasco T-25 esto se incubo a 37°C en agitación por 10 min.

Después se agregó medio con SBF, se recuperó la suspensión celular y fue colocada en un tubo falcón para centrifugar a 1500 rpm durante 10 min. Se desecha el medio y se colocaron la células en un frasco T-25 con 3 mL de medio fresco complementado.

Finalmente incubado a 37 ° C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

APÉNDICE C

Obtención del concentrado viral

Se prepararán los stocks de la línea celular *Vero* para nuestros modelos de infección con el VHS-1, es decir replicación del virus. Primero, las células son amplificadas en frascos de 175 mm² (T-175) a las condiciones antes mencionadas, después se utilizó un stock del virus, se colocó en un contenedor con hielo, se dejará descongelar aproximadamente 30 min. Posterior a esto se colocó en el frasco T-175 observando periódicamente el daño citopático de la célula aproximadamente al 90%, hasta aproximadamente 2 días incubados a 37 ° C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

Segundo, las células ya confluentes fueron cosechadas y se re-suspendió en medio DMEM con 5% de DMSO, fueron ajustadas a 1 ml/criovial. Se etiquetó adecuadamente y se almacenaron a -80°C.