



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
MORELOS**

---

**FACULTAD DE FARMACIA**

**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y  
NEUROCIRUGÍA “MANUEL VELASCO SUÁREZ”**

ANÁLISIS QUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA  
ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE LA  
CIANOBACTERIA DEL GÉNERO *Dolichospermum* EN  
DIVERSAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
FARMACIA

**PRESENTA**

Q.F.B BENJAMÍN ALEJANDRO ROBLES BAÑUELOS

**DIRECTORES DE TESIS**

DRA. LETICIA GONZÁLEZ MAYA

DR. EDGAR RANGEL LÓPEZ



**Cuernavaca, Morelos. Marzo 2022**

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Benjamín Alejandro Robles Bañuelos

**Título de la tesis:** “ANÁLISIS QUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE LA CIANOBACTERIA DEL GÉNERO *Dolichospermum* EN DIVERSAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER”

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):**

---

---

---

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto  
Firma del miembro del jurado

17 marzo del 2022  
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO | Fecha:2022-03-20 13:17:34 | Firmante**

Bc7oRdwy5cRbmo81CKzizJ/stObploTq0JZSf+w1eh6Z85yoMz5vk6oGzYfI0CG7PAuK/vlo9ZfNXcnj7I56Y91rvU2anh4sK1SB9V8B550K/4AxAHAMsMbaBJxXcfbVBV8+qU3MS6qgPQJSVLGZKQv3EWjbnX/Ee0B8Slv3rmHsySk7fBizVJ4wriJwImbd4M1zWsMsqlIC040mUesthKVp5F80hk098nJHEV3hm+xWLe2nHmJ3rCQYF/jm4jPs/GXs1dnVuWCp/DvWVcVopiUtd3ZolbigPI3ARrL7y6jjVAO3lgs7W236t1sYOFrZScEU4TGO8fufcKIWA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



**0P74lnWj1**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/hPWJU6FELMRNqhl2zMDoQ52Nd1CVmlrE>



**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Benjamín Alejandro Robles Bañuelos

**Título de la tesis:** “ANÁLISIS QUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE LA CIANOBACTERIA DEL GÉNERO *Dolichospermum* EN DIVERSAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER”

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Verónica Rodríguez López

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):**

---

---

---

Dra. Verónica Rodríguez López  
Firma del miembro del jurado

17 marzo del 2022  
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**VERONICA RODRIGUEZ LOPEZ | Fecha:2022-03-18 17:19:55 | Firmante**

K9g33lnk+jChw/GelCE2fizgKfF24LpA6CFYWQg0r33exc1nmXjie4pbClS0oDx3Lf4OkfDEWed68F2tH/nsgZ2qfY67xjL4+eUljyiuAauNtvtoDZOa/23W99UI6xQ7cSUufO4R7H0  
aquqwRklAvVMfiJFhlls/thT324F0wUqTsVIGwFJNqfuEXPrbfj6J+ri7WEIQustxon+Ww464QNz5QnqZLkvaBR6g6JCDKW7e+m6u5TtCUByozCUG/SLDB4gy3oqCSJLEbV7J  
POygWykXuGj3UpzjisWgKDFh1uala/vcl9PH0gewJi6Je6gYO49Z4+7AU3S8oEnC1J1qA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



**B2ivUHLS4**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/v6d09dOP9etlfxhDOzmbm5JiyvGyrgyH>



**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Benjamín Alejandro Robles Bañuelos

**Título de la tesis:** “ANÁLISIS QUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE LA CIANOBACTERIA DEL GÉNERO *Dolichospermum* EN DIVERSAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER”

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Lorena María Durán Riveroll

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):**

---

---

---

Dra. Lorena María Durán Riveroll  
Firma del miembro del jurado

17 marzo del 2022  
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**LORENA MARÍA DURÁN RIVEROLL | Fecha:2022-03-22 12:43:21 | Firmante**

SmjT6zQSS4WT5cX86Ex4J9LBB8ztDVZ/dANKfDItZEEjnaEf46EALYIUOk95MIPQijFp/A8ZiO2yT/d+D9yPv5wGVKINemmq90ZsJ5QQbYMPmBLNTVkwRb1f94ro3XDkS+IkllIX+oBrv3uyazA840gra1+pWS+8mL+ymac6GyJXrnR7C0OcFfMx9cVKyc3uLWNB815DHep+/Mu25t6ArVj1Q7BTb5CW1sUq+aaRK170tjQVz2fdNTyLIREcgkBW2PaxjktH  
mmUX2YUeWVIA5kMf4TdI5nlQ21X//lIR+A73SyxlQEfEZxBRnc/xlp3VYs5sNP7Tk3KdF38rULNQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



**1QrWauXhY**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/4hg1jZ1skajzdIE27JfhwWPAuZd4khPr>



**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Benjamín Alejandro Robles Bañuelos

**Título de la tesis:** “ANÁLISIS QUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE LA CIANOBACTERIA DEL GÉNERO *Dolichospermum* EN DIVERSAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER”

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Abel Santamaría Del Ángel

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):**

---

---

---

Dr. Abel Santamaría Del Ángel  
Firma del miembro del jurado

17 marzo del 2022  
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**ABEL SANTAMARIA DEL ANGEL | Fecha:2022-03-22 10:42:46 | Firmante**

QEabtfBi2f/gKD87mbxTQzsa7rWgEQ0gJ97ieyMFcFYyAuuGSs2rHBots7CY2ac6S3smH/NnlXN0lgP7Irv/oUkoCQfKNILOPoUCAqxFHnjTjvggXMg+2RYoyaEUgtuAhy5A6ohsM3Oe8ozQgLV2qO2RKEYfacJXjhbOLe9aVQ0ZeoGawmEhwliH/9UZinJH6mifNlipnxgp20PYMm4CAvDBJlIb4kSKCCVgJiiEmgjlL5lutluq66hVQPtJzwmcF8+vy4m4qDpfWXgbGfT2v5T0OfkxQ7zn7fpLoC3ROXgVZheW87kBYi0qshHuQSlhDQZHuaGkya5mmvFWzudd4Lw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



**Fk5WC06bX**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Soal8WM7AWRFO244PsDc7CWTbTiodlKE>



**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Benjamín Alejandro Robles Bañuelos

**Título de la tesis:** “ANÁLISIS QUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE LA CIANOBACTERIA DEL GÉNERO *Dolichospermum* EN DIVERSAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER”

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Leticia González Maya

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):**

---

---

---

Dra. Leticia González Maya  
Firma del miembro del jurado

17 marzo del 2022  
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**LETICIA GONZALEZ MAYA | Fecha:2022-03-18 10:38:31 | Firmante**

bmkE4fZap5uxPJYBCzq2G+iX2edmABOAUdiO7Sfz4cXHfzhay2Li7RHuCJHobU/6P9vohqUkkuUdHa5H+XfrvEY/YMADXdwTVIV80oxGQ9iNIUHnsyvnjPVIAJiU43c5NP/VldBN883VB3cEEfZmRbqm6ixgOMM9SUWjUjUagXncaVKzPSKZVWO+OeMc+e+dE9WvqU2Tb6xVpLRSa3OZGvdWgo4H1xU6BHWNipuhWY33YT8pCwK2X7N2GZcAHY8Cfos+KFH+C+dKcmSZH6CVIqavIhVdCCMP4dU3N3idq2J6ZPpuh6LW7DMTuaMAON7e7TNG+RgRByVaPro7tQ3qg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



**kP9jgF5Bf**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/PoaoL6NH3aOdP6vY2YMSXuzKszYQpSuC>



*Dedicada a mis padres y hermanas,  
gracias por apoyarme siempre.*

## **Agradecimientos**

A través de estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que me han apoyado e impulsado a lo largo de este proceso, en especial:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización del posgrado.

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía por ser instituciones de excelencia y brindarme la oportunidad de continuar con mi formación académica y profesional.

Muy especialmente a mis tutores y directores de tesis, la Dra. Leticia González Maya y el Dr. Edgar Rangel López por abrirme las puertas de sus laboratorios y permitirme realizar este proyecto de investigación, así como por brindarme orientación y conocimientos que, aunado a su gentileza y paciencia, permitió que esta estancia fuera muy agradable y productiva.

De igual manera, un especial agradecimiento al resto de mi comité tutorial, la Dra. Lorena María Durán Riveroll y la Dra. Laura Patricia Álvarez Berber por asesorarme y apoyarme en las diversas disciplinas científicas en las que ellas son especialistas, lo cual contribuyó significativamente a la correcta realización del proyecto.

A todos los miembros de los laboratorios de Diagnóstico Molecular y Aminoácidos Excitadores, en especial al Dr. Abel Santamaría Del Ángel y la Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza por su inestimable ayuda durante mi formación.

Al Dr. Baldomero Esquivel Rodríguez y a la Dra. Celia Bustos Brito del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México; al Dr. Samuel Enoch Estrada Soto de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos; y a Andrea Margarita García Casillas, por ser partícipes de este proyecto, ya que gracias a su apoyo y colaboración se enriqueció enormemente esta investigación.

A mis profesores, que durante mi estancia en el posgrado transmitieron sus conocimientos y contribuyeron a mi formación académica.

De manera muy especial a mi novia Almendra por ser mi motivación, por alentarme a ser mejor y por apoyarme incondicionalmente durante este trayecto.

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron a que este proyecto se realizará correctamente y que no menciono en estos agradecimientos pero las tengo en mi pensamiento. Gracias por su apoyo y palabras de aliento.

## Índice General

I.	Índice de figuras y tablas .....	1
II.	Resumen .....	3
III.	Abstract .....	4
1.	Introducción .....	5
1.1.	Características distintivas del cáncer.....	5
1.2.	Ciclo celular y cáncer .....	6
1.3.	Cáncer: panorama mundial y en México.....	7
2.	Antecedentes.....	9
2.1.	Cianobacterias.....	9
2.2.	Diversidad química y bioactividad de metabolitos secundarios de cianobacterias .....	10
2.3.	Actividad citotóxica de los metabolitos secundarios de cianobacterias.....	11
2.4.	Taxonomía de las cepas productoras de metabolitos secundarios de cianobacterias .....	13
2.5.	Ecosistemas de cianobacterias .....	13
2.6.	Cianobacterias del género <i>Dolichospermum</i> .....	14
3.	Justificación .....	15
4.	Hipótesis.....	16
5.	Objetivos .....	16
5.1.	General .....	16
5.2.	Específicos .....	16
6.	Materiales y Métodos .....	16
6.1.	Material celular .....	16
6.2.	Obtención de extractos de <i>Dolichospermum</i> sp. ....	17
6.3.	Líneas celulares de cáncer.....	18
6.4.	Cultivos primarios de neuronas y astrocitos.....	18
6.5.	Validación de cultivos primarios neuronales.....	19
6.8.	Evaluación de la muerte celular.....	21
6.9.	Análisis químico de los extractos de diclorometano y metanol de <i>Dolichospermum</i> sp.....	21
6.9.1.	Análisis químico del extracto de diclorometano.....	22
6.10.	Análisis estadístico.....	23

7.	Resultados .....	23
7.1.	Evaluación de la actividad citotóxica de extractos de <i>Dolichospermum</i> sp. sobre líneas celulares cancerosas.....	23
7.2.	Evaluación del número de esferoides.....	29
7.3.	Validación de cultivos primarios neuronales.....	31
7.4.	Evaluación de la actividad citotóxica de extractos de <i>Dolichospermum</i> sp. sobre líneas celulares control .....	32
7.5.	Evaluación del tipo de muerte celular inducida por extractos de <i>Dolichospermum</i> sp. sobre líneas celulares cancerosas .....	33
7.6.	Análisis químico de los extractos de diclorometano y metanol de <i>Dolichospermum</i> sp.....	34
7.6.1.	Análisis químico del extracto de diclorometano.....	38
8.	Discusión.....	45
9.	Conclusiones .....	63
10.	Bibliografía .....	65

## I. Índice de figuras y tablas

Figura 1. Mapa global que presenta la clasificación nacional del cáncer como causa de muerte en edades inferiores a 70 años en 2015 .....	7
Figura 2. Cianobacteria del género <i>Dolichospermum</i> sp. utilizada en el presente estudio .....	17
Figura 3. Efecto antiproliferativo de los extractos de <i>Dolichospermum</i> sp. a 100 µg/mL en células (a) RG2, (b) C6, (c) U87, (d) A549 y (e) U373 después de 48 h de exposición .....	24
Figura 4. Efecto antiproliferativo de los extractos de MeOH y DCM de <i>Dolichospermum</i> sp. a diferentes concentraciones (50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 y 500 µg/mL) en células (a) RG2 y (b) C6 después de 48 h de exposición .....	25
Figura 5. Efecto antiproliferativo del extracto HA de <i>Dolichospermum</i> sp. en diferentes proporciones de MeOH-H <sub>2</sub> O a 100 µg/mL en células (a) RG2 y (b) C6 después de 48 h de exposición .....	26
Figura 6. Cambios morfológicos y efecto citotóxico de los extractos de MeOH y DCM de <i>Dolichospermum</i> sp. a 50, 100, 150, 200 y 250 µg/mL en células RG2 después de 48 h de exposición .....	27
Figura 7. Cambios morfológicos y efecto citotóxico de los extractos de MeOH y DCM de <i>Dolichospermum</i> sp. a 100, 200, 300, 400 y 500 µg/mL en células C6 después de 48 h de exposición .....	28
Figura 8. Número de esferoides originados por la exposición de las células RG2 a los extractos de (a) MeOH y (b) DCM de <i>Dolichospermum</i> sp. a 25, 50, 100, 150, 200 y 250 µg/mL después de 48 h de exposición .....	29
Figura 9. (a) Tinción de esferoides por el método de rojo neutro para estimar esferoides funcionales; (b) Cambios morfológicos de los esferoides de RG2 expuestos al extracto de DCM de <i>Dolichospermum</i> sp. a 50, 100 y 200 µg/mL después de 48 h de exposición .....	30
Figura 10. Inmunofluorescencia de células cerebrales en cultivos primarios de neuronas .....	31

Figura 11. Efecto antiproliferativo de los extractos de <i>Dolichospermum</i> sp. a 100 µg/mL en cultivos primarios de (a) neuronas y (b) astrocitos después de 48 h de exposición .....	32
Figura 12. Efecto antiproliferativo de los extractos de (a) MeOH y (b) DCM de <i>Dolichospermum</i> sp. a 0.1, 1, 10, 100 y 200 µg/mL en cultivos primarios de neuronas después de 48 h de exposición .....	33
Figura 13. Efecto del extracto de MeOH y DCM de <i>Dolichospermum</i> sp. sobre la muerte celular en células RG2 y C6 según su $CI_{50}$ .....	34
Figura 14. Espectro de RMN $^1H$ del extracto CB-DDCM .....	36
Figura 15. Espectro de RMN $^1H$ del extracto CB-DMeOH .....	37
Figura 16. Placas cromatográficas de las primeras ocho fracciones de la primera columna del extracto CB-DDCM .....	38
Figura 17. Espectro de RMN $^1H$ de la fracción CB-DDCM-A .....	40
Figura 18. Espectro de RMN $^1H$ de la fracción CB-DDCM-B .....	41
Figura 19. Espectro de RMN $^1H$ de la fracción CB-DDCM-C .....	42
Figura 20. Espectro de RMN $^1H$ de la fracción CB-DDCM-D .....	43
Figura 21. Espectro de RMN $^1H$ del compuesto CB-DDCM-Bb .....	44
Figura 22. Estructura química de la feofitina A .....	45
Figura 23. Degradación de la clorofila A en la feofitina A .....	46
Tabla 1. Condiciones de la cromatografía en columna abierta .....	22
Tabla 2. Perfil genético comparativo de las características más importantes de las líneas celulares utilizadas en el estudio .....	50
Tabla 3. Actividad citotóxica reportada en la literatura de extractos de cianobacterias del género <i>Dolichospermum</i> contra diversas líneas celulares de cáncer y células control .....	52

## II. Resumen

Desde hace varias décadas, los tumores malignos se han posicionado en los primeros sitios de incidencia y mortalidad a nivel mundial, lo que representa un gran desafío para las economías y los sistemas de salud. Dentro de estas neoplasias, el glioblastoma multiforme (GBM) representa el tumor cerebral primario más letal y agresivo, con una mediana de supervivencia menor a 15 meses. Este tumor presenta respuestas generalmente deficientes a todas las modalidades terapéuticas. En ese sentido, se ha propuesto una amplia gama de enfoques experimentales en los últimos años para abordar los desafíos asociados con su desarrollo y progresión. Desafortunadamente, estos enfoques han resultado en avances marginales, lo que ha impulsado a los científicos a la búsqueda de nuevos compuestos biológicamente activos que representen estrategias innovadoras para el desarrollo de agentes terapéuticos utilizados en el tratamiento de esta enfermedad. Las cianobacterias han sido identificadas como uno de los grupos de organismos más prometedores a partir de los cuales se pueden aislar nuevos productos naturales estructuralmente diversos y biológicamente activos. En este trabajo, evaluamos la actividad citotóxica de extractos de la cianobacteria *Dolichospermum* sp. en células tumorales y cultivos primarios cerebrales, y determinamos su perfil químico. Nuestros resultados muestran que los extractos de diclorometano (DCM) y metanol (MeOH) ejercieron moderada actividad citotóxica en las líneas celulares de glioma RG2 y C6, con valores  $CI_{50}$  que oscilan entre 106.70 y 154.82  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que se encontró una  $CI_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$  en cultivos primarios de neuronas. Además, las células RG2 y C6 expuestas a los extractos de DCM y MeOH exhibieron características morfológicas típicas de células apoptóticas y una disminución en el número de esferoides formados (RG2). Por su parte, el análisis químico reveló que el extracto de DCM está enriquecido con un compuesto que muy probablemente corresponde a la feofitina A. Estos hallazgos sugieren que algunos metabolitos secundarios presentes en estos extractos pueden representar una estrategia para el desarrollo de fármacos quimioterapéuticos utilizados para el tratamiento de GBM debido a su potencial como agentes anticancerígenos y bajos efectos neurotóxicos.

### III. Abstract

For several decades, malignant tumors have positioned themselves in the first places of incidence and mortality worldwide, representing a great challenge for economies and health systems. Within these neoplasms, glioblastoma multiforme (GBM) represents the most lethal and aggressive primary brain tumor with a median survival of fewer than 15 months, presenting generally poor responses to all therapeutic modalities. In that sense, a wide range of experimental approaches have been proposed in recent years to address the challenges associated with its development and progression. Unfortunately, these approaches have resulted in marginal advances, prompting scientists to search for new biologically active compounds that represent innovative strategies for the development of therapeutic agents used in the treatment of this disease. Cyanobacteria have been identified as one of the most promising groups of organisms from which new structurally diverse and biologically active natural products can be isolated. Here, we evaluated the cytotoxic activity of extracts of the cyanobacterium *Dolichospermum* sp. in cancer cells and primary brain cultures. Also, we determined the chemical profile of these extracts. Our results show that dichloromethane (DCM) and methanol (MeOH) extracts exerted moderate cytotoxic activity on RG2 and C6 glioma cell lines with  $IC_{50}$  values ranging 106.70 to 154.82  $\mu\text{g/mL}$ , whereas an  $IC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$  was found for primary cultures of neurons. Furthermore, RG2 and C6 cells exposed to DCM and MeOH extracts exhibited morphological characteristics typical from apoptotic cells and a decrease in the number of spheroids formed under culture conditions (RG2). On the other hand, chemical analysis revealed that the DCM extract is enriched with a compound that most likely corresponds to pheophytin A. These findings suggest that some secondary metabolites present in these extracts may represent a strategy for the development of new chemotherapeutic drugs useful for the treatment of GBM tumors due to their potential activity as anticancer agents and low neurotoxic effects.

## **1. Introducción**

El cáncer se considera un conjunto de enfermedades que resultan de la proliferación descontrolada de células anormales en el cuerpo con capacidad de invadir y dañar otros tejidos, lo cual es causado, entre otros factores, por cambios en genes que controlan mecanismos de proliferación y muerte celular (Hanahan & Weinberg, 2011). En condiciones normales, las células mantienen una homeostasis entre mecanismos de proliferación y muerte celular. Cuando las células normales “envejecen” o presentan algún daño crítico en el ADN, reciben señales que les indican dejar de dividirse o entrar en un proceso conocido como muerte celular programada (apoptosis), el cual es esencial para restablecer la homeostasis celular al deshacerse de las células que no son necesarias, o aquellas cuya integridad se encuentra comprometida. En el cáncer, este proceso ordenado se descontrola, pues a medida que este proceso avanza, las células alteradas se vuelven células viejas o dañadas, pero sobreviven y se forman células nuevas cuando no son necesarias. Estas nuevas células pueden dividirse sin interrupción y pueden formar masas celulares denominadas tumores.

### **1.1. Características distintivas del cáncer**

De acuerdo con varios autores, las células cancerosas difieren de las células normales en muchos aspectos, los cuales les permiten crecer sin control y volverse invasivas. Según Hanahan and Weinberg (2011), las células cancerosas comparten seis características biológicas adquiridas durante el proceso de carcinogénesis que constituyen un principio organizador para racionalizar las complejidades de la enfermedad neoplásica. Estas características distintivas del cáncer incluyen mantener la señalización proliferativa, evadir los supresores del crecimiento, resistir la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis y activar la invasión y la metástasis. Estos procesos son causados por mutaciones en los genes que controlan la forma de crecimiento y división celular, especialmente en proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del ADN (Christmann, Tomicic, Roos, & Kaina, 2003). Esta inestabilidad genómica en las células cancerosas es el resultado de mutaciones aleatorias que pueden ser

heredadas de los padres, como resultado de errores que ocurren en el proceso de replicación celular o por el daño al ADN causado por agentes químicos y físicos por algunas exposiciones al ambiente.

Recientemente, el desarrollo, la progresión y el tratamiento del cáncer se está abordando desde una perspectiva múltiple, dentro de la cual, además de tomar en cuenta la inestabilidad genómica, se abordan los cambios epigenéticos, el microambiente tumoral y el estado inflamatorio de lesiones pre-malignas (F. F. Costa, 2010; Hanahan & Weinberg, 2011). Se ha llegado a sugerir que el silenciamiento epigenético en el cáncer puede ser una causa de inactivación de genes tan frecuente como pueden serlo las mutaciones (Tomasi, Magner, & Khan, 2006). De igual manera, se ha demostrado que los tumores dependen de manera crucial de proteínas específicas del ciclo celular para inhibir los programas supresores de tumores como la senescencia y la apoptosis (Otto & Sicinski, 2017).

## **1.2. Ciclo celular y cáncer**

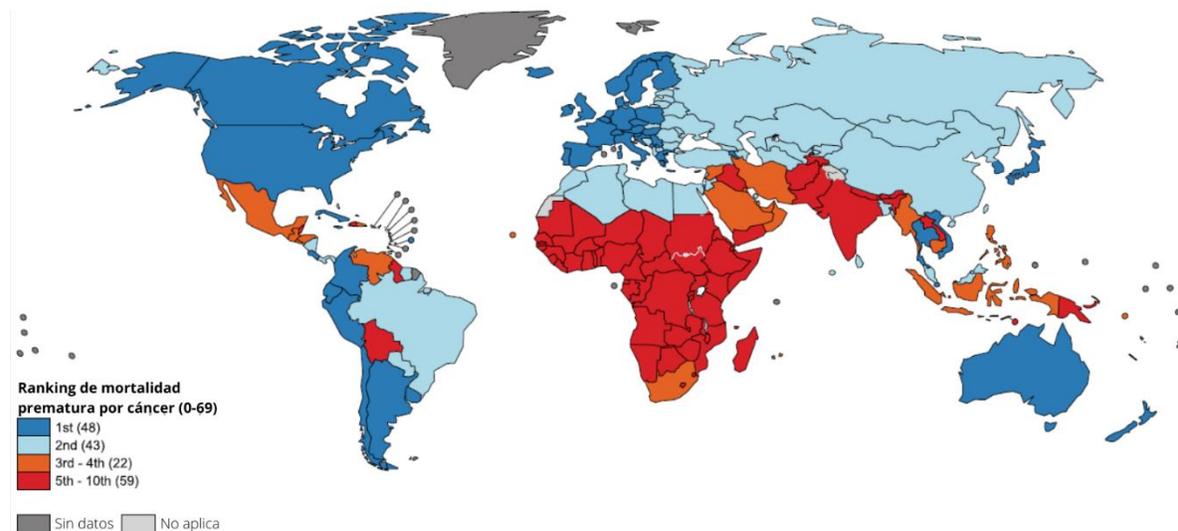
El ciclo celular es un proceso altamente organizado y regulado que asegura la duplicación del material genético y la división celular. Este proceso consiste en la progresión celular a través de cuatro fases distintas (G0/G1, S, G2 y M), que están reguladas por varias quinasas dependientes de ciclina (CDK) y que se activan al unirse con sus respectivas ciclinas. La actividad de las CDK implicadas en la regulación del ciclo celular está estrictamente controlada; es inducida por señales mitogénicas y puede inhibirse mediante la activación de puntos de control del ciclo celular en respuesta al daño del ADN (Otto & Sicinski, 2017).

El cáncer se caracteriza por una actividad aberrante del ciclo celular. Esto ocurre como resultado de mutaciones en las vías de señalización río arriba, o por lesiones genéticas dentro de los genes que codifican las proteínas reguladoras del ciclo celular. Los oncogenes mutados y los supresores tumorales inactivados pueden aumentar la dependencia de las células cancerosas a las CDK de la fase G1, aumentar el estrés de replicación y el daño del ADN durante la fase S, e inactivar

los puntos de control que monitorean la progresión del ciclo celular (Sherr & Bartek, 2017). Estos defectos adquiridos generan una proliferación descontrolada, pero también vulnerabilidades específicas que brindan una ventana de oportunidad para los tratamientos dirigidos.

### 1.3. Cáncer: panorama mundial y en México

Según las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la primera/segunda causa de muerte desde antes de los 70 años en 91 de 172 países, y actualmente ocupa el tercer/cuarto lugar en 22 países adicionales (Figura 1) (Bray et al., 2018). Se estima que esta enfermedad será considerada como la principal causa de muerte y la barrera a vencer más importante para aumentar la esperanza de vida en todos los países del mundo en el siglo XXI.



**Figura 1.** Mapa global que presenta la clasificación nacional del cáncer como causa de muerte en edades inferiores a 70 años en 2015 (Tomado de Bray et al., 2018).

Las estimaciones de GLOBOCAN (2022) de incidencia y mortalidad por cáncer a nivel mundial para ambos sexos indican que en el 2020 ocurrieron 19.2 millones de nuevos casos y 9.9 millones de muertes, siendo el cáncer de mama el más comúnmente diagnosticado (11.7% del total de casos), seguido de cerca por el cáncer de pulmón (11.4%), cáncer colorrectal (10%) y cáncer de próstata (7.3%) en cuanto a incidencia, mientras que la principal causa de muerte por cáncer

corresponde al cáncer de pulmón (18% del total de muertes por cáncer), seguido por el cáncer colorrectal (9.4%), cáncer de hígado (8.3%) y cáncer de estómago (7.7%), respectivamente. Sin embargo, el cáncer diagnosticado con mayor frecuencia y la principal causa de muerte por cáncer varían considerablemente entre países y dentro de cada país, dependiendo del grado de desarrollo económico, los factores sociales y los factores de estilo de vida asociados (Bray et al., 2018). Cabe destacar que, si bien los tumores cerebrales no figuran entre los 5 primeros a nivel de incidencia o mortalidad, el glioblastoma multiforme (GBM) es un tipo de tumor cerebral primario muy agresivo y letal, con 95% de recidiva y con una mediana de supervivencia menor a 15 meses (Alifieris & Trafalis, 2015).

Respecto a México, el número de nuevos casos de cáncer en el 2020 se estimó en 195,499, y el número de defunciones a 90,222, según datos del GLOBOCAN (2022). El cáncer de mama presentó mayor incidencia (15.3% del total de casos), seguido del cáncer de próstata (13.7%), cáncer colorrectal (7.6 %), cáncer de tiroides (5.7%) y cáncer cérvico-uterino (4.8%), respectivamente. Los tipos de cáncer que presentaron la mayor mortalidad estimada en México fueron el cáncer de mama (8.8% del total de muertes por cáncer), seguido del cáncer de próstata (8.3%), cáncer de hígado (8%), cáncer de pulmón (7.9%) y cáncer de estómago (7.5%), respectivamente.

A pesar de las mejoras en el diagnóstico y el tratamiento, la incidencia y la mortalidad por cáncer sigue creciendo rápidamente a nivel mundial, lo que implica uno de los mayores retos de salud pública. Actualmente, el tratamiento convencional de los tumores puede incluir cirugía, radioterapia, inmunoterapia y quimioterapia, o una combinación de estos. Sin embargo, las perspectivas a largo plazo y las tasas de supervivencia de las personas con tales neoplasias siguen siendo pobres. Es por ello que se requiere buscar nuevos tratamientos con enfoques alternativos que puedan ayudar en la erradicación o en el incremento de las tasas de supervivencia de esta enfermedad.

## **2. Antecedentes**

En los últimos años, los productos naturales y sus derivados han sido reconocidos como fuentes importantes de nuevas estructuras químicas con potencial para el desarrollo de agentes terapéuticos (Liang, Luo, & Luesch, 2019; Sithranga Boopathy & Kathiresan, 2010). Actualmente, más del 70% de los medicamentos para uso clínico se derivan de productos naturales, y esto también se extiende a la quimioterapia contra el cáncer, en la que los productos naturales constituyen la mayoría de los medicamentos de quimioterapia actuales (Mondal et al., 2020). Uno de los elementos asociados a la gran diversidad de actividades biológicas encontradas es el amplio espectro de metabolitos secundarios presentes en varios organismos. Estos metabolitos secundarios pueden ser producidos por los diversos organismos como una estrategia de competencia por nutrientes y espacio, además de utilizarlos como un posible mecanismo de protección ante depredadores y condiciones ambientales adversas. Sin embargo, los compuestos bioactivos que son producidos de forma natural por estos organismos también pueden suministrar beneficios en el control y el tratamiento de enfermedades.

### **2.1. Cianobacterias**

Las cianobacterias son un grupo importante de procariotas fotosintéticas de crecimiento lento con más de 5,000 especies (Guiry, M.D. & Guiry, G.M., 2022) distribuidas en una amplia gama de ecosistemas en todo el mundo. Además del reino vegetal, estos organismos son responsables de producir oxígeno atmosférico y desempeñan un papel notable en la generación de un grupo de metabolitos secundarios sorprendentemente novedoso en su estructura. Los primeros estudios sobre estos organismos se centraron en su impacto ecológico y en la salud pública, debido a su capacidad para producir toxinas (cianotoxinas) con efectos nocivos en plantas, invertebrados y vertebrados (Bláha, Babica, & Maršálek, 2009; Buratti et al., 2017; Corbel, Mougín, & Bouaïcha, 2014). Más allá de los notorios efectos nocivos de las cianotoxinas, otros productos naturales de cianobacterias muestran una amplia gama de bioactividades que podrían ser potencialmente útiles para diversas aplicaciones. En la actualidad, varios estudios han demostrado que las

cianobacterias son extraordinariamente ricas en compuestos con propiedades biológicamente activas, tales como antiproliferativas, antimicrobianas, antifúngicas, antituberculosas, inmunosupresoras y antiinflamatorias (Shah et al., 2017; Tan & Phyo, 2020). Muchos de los agentes terapéuticos inspirados o derivados de cianobacterias se encuentran actualmente en investigación clínica (Khalifa et al., 2021; Qamar et al., 2021).

## **2.2. Diversidad química y bioactividad de metabolitos secundarios de cianobacterias**

Actualmente se han aislado más de 1600 moléculas de cianobacterias que han sido agrupadas en 260 familias de metabolitos (Demay, Bernard, Reinhardt, & Marie, 2019). Su amplia diversidad estructural es el resultado de la capacidad del metabolismo de las cianobacterias para integrar sintasas peptídicas no ribosómicas con sintasas de policétidos, así como varias enzimas responsables de otras transformaciones biosintéticas, lo que origina productos naturales químicamente diversos como alcaloides, depsipéptidos, lipopéptidos, macrólidos/lactonas, péptidos, terpenos, polisacáridos, lípidos, policétidos y otros (Dhakal, Chen, Luesch, & Ding, 2021; Jones et al., 2010; Kleigrewe, Gerwick, Sherman, & Gerwick, 2016; Mondal et al., 2020; Shah et al., 2017). De las 260 familias de metabolitos reportadas, 66 pertenecen a la clase de péptidos, y junto con las clases depsipéptidos y lipopéptidos, representan 133 familias de compuestos derivados de péptidos (51% de las familias de metabolitos) (Demay et al., 2019).

Por otro lado, de la gran diversidad de actividades biológicas reportadas en la literatura, la actividad citotóxica contra varias líneas celulares es el tipo de bioactividad que se evalúa con más frecuencia en compuestos derivados de cianobacterias, con hasta 110 familias de metabolitos de las 260 reportadas (42% de las familias), mientras que las bioactividades antioxidante y antiinflamatoria son las menos evaluadas, con 3 y 7 familias de metabolitos (0.8% y 1.9%), respectivamente (Demay et al., 2019).

### 2.3. Actividad citotóxica de los metabolitos secundarios de cianobacterias

Las investigaciones sobre metabolitos secundarios con actividad citotóxica aislados de cianobacterias comenzaron en la década de los setenta cuando Mynderse y colaboradores informaron de las propiedades citotóxicas de la debromoaplisiatoxina (aislada de la cianobacteria *Lyngbya gracilis*) frente a células de leucemia murina P-388 (Mynderse, Moore, Kashiwagi, & Norton, 1977). Más tarde, Carmely y Kashman aislaron el swinholide A de la esponja marina *Theonella swinhoei* (Carmely & Kashman, 1985). Posteriormente, Andriansolo y colaboradores lograron aislar el swinholide A y dos nuevas moléculas relacionadas (ankaraholides A y B) de las cianobacterias *Symploca* sp. y *Geitlerinema* sp., respectivamente (Andrianasolo et al., 2005). El swinholide A fue el primer ejemplo de una familia de metabolitos denominados en la actualidad como swinholides. Esta familia representa una gama de productos naturales tipo macrólido que tienen un anillo de lactona dimérico único de 44 miembros o más grande, y que son potentes citotoxinas que rompen el citoesqueleto de actina (Tao et al., 2018).

A partir de entonces, numerosas investigaciones se han encargado de identificar, agrupar y evaluar las propiedades citotóxicas de los diversos compuestos aislados de cianobacterias. Actualmente, varios estudios han demostrado que algunas de las familias de metabolitos aisladas de cianobacterias presentan actividad citotóxica importante contra diversas líneas celulares de cáncer a concentraciones nanomolares en modelos preclínicos (Qamar et al., 2021). Los mecanismos implicados en la citotoxicidad de los metabolitos aislados de cianobacterias son diversos, pero algunas familias de metabolitos presentan mecanismos de citotoxicidad similares, como el caso de las bisebromoamidas, las hectoclorinas, las lyngbyabellinas, las majusculamidas y los swinholides, que generan alteraciones en el citoesqueleto de actina (Luesch, Yoshida, Moore, Paul, & Mooberry, 2000; Marquez et al., 2002; Simmons et al., 2009; Sumiya et al., 2011; Tao et al., 2018); el Largozol y el Santacruzamato A, que son inhibidores de las histonas desacetilasas (HDAC) (Bowers et al., 2008; Gromek et al., 2016); y las apratoxinas y la coibamida A, que inhiben el translocón trimérico Sec61 (Paatero et

al., 2016; Tranter et al., 2020). Además, algunas familias de metabolitos presentan otros mecanismos interesantes, como las dolastatinas, las cuales generan la despolimerización de los microtúbulos; las carmaficinas, que inhiben el proteosoma 20S; y las patelamidas, que evitan la resistencia a múltiples fármacos (Catassi et al., 2006; Fu, Do, Schmitz, Andrusevich, & Engel, 1998; Pereira et al., 2012). Sin embargo, los mecanismos implicados en la citotoxicidad de la mayoría de los compuestos de cianobacterias en líneas celulares tumorales aún se pasan por alto en gran medida, aunque varios estudios apuntan a una implicación en la apoptosis. Esta asociación se ha relacionado con varios indicadores apoptóticos como la detención del ciclo celular, alteraciones en la cascada de caspasas y alteraciones en los niveles de proteínas específicas (M. Costa et al., 2012; Salvador-Reyes & Luesch, 2015).

Además de los efectos anticancerígenos en modelos preclínicos, varios de los compuestos aislados de cianobacterias han surgido como plantillas para el desarrollo de nuevos medicamentos contra el cáncer. Un claro ejemplo es la molécula dolastatina 10 aislada de la cianobacteria *Caldora penicillata* (Engene, Tronholm, Salvador-Reyes, Luesch, & Paul, 2015), la cual es un potente agente desestabilizador de microtúbulos que sirvió como plantilla para el desarrollo de la monometil auristatina E, que se utiliza en los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) brentuximab vedotin (Adcetris) y polatuzumab vedotin (Polivy) aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA). El brentuximab vedotin se usa en el tratamiento del linfoma de Hodgkin y el linfoma anaplásico de células grandes (Deng, Pan, & O'Connor, 2013; Minich, 2012), mientras que el polatuzumab vedotin se usa en combinación con bendamustina y un producto de rituximab para el tratamiento de casos de recaída o refractarios de linfoma difuso de células B grandes (Assi et al., 2021). En consecuencia, numerosos estudios de investigación se han centrado en el diseño y la utilización de miembros de la familia de las auristatinas dentro de los ADC para el tratamiento de diversas neoplasias. Actualmente, más de 30 ADC, que incorporan auristatinas como cargas útiles, se encuentran en ensayos clínicos o en estado preclínico avanzado para la terapia del

cáncer (Gao, Wang, Hua, Li, & Tang, 2021; Maderna & Leverett, 2015; Newman & Cragg, 2014).

#### **2.4. Taxonomía de las cepas productoras de metabolitos secundarios de cianobacterias**

Según la clasificación de las familias de metabolitos de cianobacterias agrupadas por Demay y colaboradores, las cepas del orden taxonómico de Oscillatoriales producen el mayor número de familias de metabolitos (153 familias, 46.5%), mientras que las cepas pertenecientes al orden de Nostocales producen 98 familias (29.7%), seguido de los órdenes Chroococcales y Synechococcales, que exhiben 34 y 31 familias de metabolitos (10.3% y 9.4%), respectivamente.

A nivel taxonómico de familia, los principales productores de compuestos bioactivos pertenecen al orden Oscillatoriaceae, con 122 familias de metabolitos (30.3%), seguido de Nostocaceae y Microcoleaceae, con 69 y 48 familias de compuestos (17.2% y 10.9%), respectivamente. En cuanto a género, los géneros *Lyngbya* y *Moorea*, anteriormente agrupados en *Lyngbya*, exhiben el mayor número de compuestos aislados (85 familias de metabolitos, 20.6%). Estos géneros están ampliamente extendidos en los ecosistemas marinos y a la fecha son los reportados con el mayor número de compuestos bioactivos producidos por cianobacterias. El género *Nostoc*, productor de 50 familias de compuestos bioactivos (12.1%), es el segundo más prolífico, seguido de *Anabaena*, *Oscillatoria* y *Microcystis* con 32, 31 y 27 familias (7.8%, 7.5% y 6.6%), respectivamente (Demay et al., 2019).

#### **2.5. Ecosistemas de cianobacterias**

Las cianobacterias presentan una gama muy amplia de adaptaciones que permiten su distribución en microambientes muy diversos en todo el mundo. Como consecuencia, las cianobacterias crecen en hábitats variados y a menudo extremos, y luego pueden asentarse en diversos ecosistemas, por ejemplo, marinos, terrestres, de agua dulce, manantiales termales, etc. (Kurmayer, Deng, & Entfellner, 2016). Su exitosa colonización en la naturaleza se atribuye en gran parte a su

diversidad genética, así como a la producción de productos naturales de importancia ecológica (Du et al., 2019).

Considerando los ecosistemas de las cianobacterias reportados en la base de datos elaborada por Demay y colaboradores, de la gran variedad de cianobacterias existentes, la mayoría de los compuestos han sido aislados de cianobacterias de origen marino (148 familias de metabolitos, 53%), en comparación con la cantidad de familias aisladas de cianobacterias de agua dulce (77 familias, 27.6%) y otros ecosistemas. Siguiendo esta premisa, la mayoría de las evaluaciones de actividades terapéuticas se han realizado a partir de compuestos aislados de cianobacterias marinas, en particular del género *Lyngbya/Moorea*, por lo que existe una oportunidad potencial para la evaluación de las bioactividades de compuestos procedentes de cianobacterias de otros ecosistemas y otros géneros no explorados.

## **2.6. Cianobacterias del género *Dolichospermum***

Las propiedades biológicamente activas de los compuestos de las cianobacterias de agua dulce, en particular del género *Dolichospermum*, han sido poco exploradas, y la información sobre su actividad citotóxica es escasa. Las cianobacterias del género *Dolichospermum* se encuentran presentes en cuerpos de agua dulce en todo el mundo. Se ha documentado que varias especies de este género originan florecimientos tóxicos gracias a la presencia de una amplia gama de metabolitos secundarios bioactivos, incluidas algunas toxinas potentes como las microcistinas, las anatoxinas, las saxitoxinas y la cilindrospermopsina (Buratti et al., 2017; Grachev et al., 2018; X. Li, Dreher, & Li, 2016), lo que puede generar posibles consecuencias para la salud humana. Sin embargo, ciertas cianotoxinas también podrían constituir una oportunidad prometedora para el desarrollo de fármacos anticancerígenos.

Si bien la mayoría de las investigaciones sobre este género se han basado en la toxicidad de sus metabolitos, en la actualidad se cuenta con pocos reportes en donde se explore la actividad citotóxica de metabolitos extraídos a partir de estos

organismos en diversas líneas celulares de cáncer. Esto quizá se debe a la escasa información taxonómica y bioactiva de estas especies, por lo que el poco interés de la comunidad científica podría ser atribuido a dicha falta de información. Sin embargo, estas pautas han generado una ventana de oportunidades para la identificación de productos bioactivos con actividad citotóxica que puedan representar una fuente importante de nuevas estructuras químicas con importancia para el desarrollo de agentes antineoplásicos. Por lo tanto, en el presente estudio se realizó el análisis químico y se evaluó la actividad citotóxica de extractos de la cianobacteria *Dolichospermum* sp. en diversas líneas celulares de cáncer, a partir de cultivos de cianobacterias provenientes de la presa Vicente Aguirre, en Hidalgo.

### **3. Justificación**

Desde hace varias décadas, los tumores malignos se han posicionado en los primeros sitios de mortalidad a nivel mundial, lo que representa un gran desafío para las economías y los sistemas de salud. A pesar de las mejoras en el diagnóstico y el tratamiento, las cifras de incidencia y mortalidad siguen en aumento y se estima que el cáncer será considerado como la principal causa de muerte en todos los países del mundo en el siglo XXI. De igual manera, a pesar del amplio arsenal farmacológico contra esta enfermedad, existen varias razones por las cuales la terapia contra el cáncer no es efectiva en un número importante de pacientes, las cuales van desde el diagnóstico tardío, la falta de apego al tratamiento, la resistencia inducida a los antineoplásicos empleados durante el tratamiento mismo, la capacidad recidivante de las células resistentes y/o no extirpadas quirúrgicamente, y la carencia de fármacos más eficaces, específicos y que presenten menores efectos adversos. Todas ellas razones por las cuales es necesaria la búsqueda de nuevas moléculas que puedan representar una fuente importante de nuevas estructuras químicas con importancia para el desarrollo de agentes antineoplásicos a partir de fuentes poco exploradas, como lo son las cianobacterias de aguas dulces.

#### **4. Hipótesis**

Algunos compuestos presentes en extractos de *Dolichospermum* sp. presentarán efecto citotóxico y antiproliferativo en líneas celulares derivadas de diversos tipos tumorales.

#### **5. Objetivos**

##### **5.1. General**

Evaluar la actividad citotóxica y antiproliferativa de extractos de *Dolichospermum* sp. en líneas celulares derivadas de diversos tipos tumorales.

##### **5.2. Específicos**

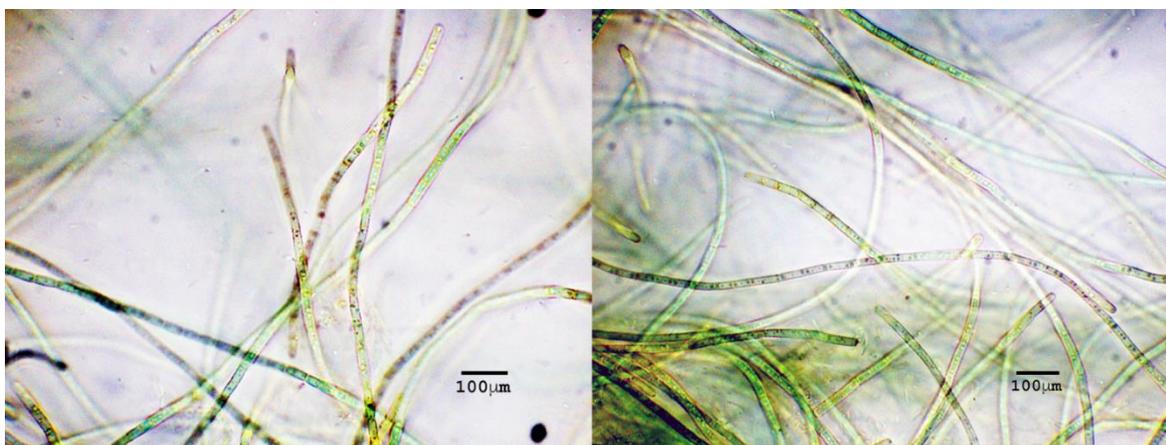
- a. Obtener y evaluar los extractos hidro-alcohólico, de metanol, de diclorometano y de n-hexano de *Dolichospermum* sp. en líneas celulares derivadas de diversos tipos tumorales.
- b. Determinar la actividad citotóxica de los extractos más activos en células no cancerosas.
- c. Evaluar la muerte celular inducida por los extractos más activos en células de cáncer sensibles a ellos.
- d. Realizar el análisis químico de los extractos más activos.

#### **6. Materiales y Métodos**

##### **6.1. Material celular**

El material celular de *Dolichospermum* sp. previamente aislado, identificado morfológicamente hasta género y cultivado por Andrea Margarita García Casillas, está en proceso de identificación molecular y fue proporcionado por la Dra. Lorena María Durán Riveroll del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, el cual fue recolectado en la presa Vicente Aguirre, en el estado de Hidalgo (Figura 2). Durante el desarrollo del presente estudio, el cultivo de *Dolichospermum* sp. para la obtención de biomasa fue realizado a 25 °C con iluminación continua con una luz blanca de 2,000 lx de intensidad en la Facultad de

Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). La biomasa obtenida fue liofilizada para su procesamiento. Se utilizó un total de 12 L de cultivo de *Dolichospermum* sp. para la obtención de 2.84 g de material liofilizado (peso seco).



**Figura 2.** Cianobacteria del género *Dolichospermum* sp. utilizada en el presente estudio. Imágenes representativas observadas bajo microscopía en campo claro con un objetivo de magnificación de 100x (1000x de magnificación). Barra de escala = 100 µm.

## **6.2. Obtención de extractos de *Dolichospermum* sp.**

Para la obtención de los diversos extractos, el material liofilizado de *Dolichospermum* sp. fue sometido a sucesivas extracciones con diferentes disolventes orgánicos en orden creciente de polaridad mediante el método convencional de maceración en frío. Para ello se utilizaron 1.5 g de la biomasa liofilizada, a la cual se le adicionaron 150 mL de n-hexano en un frasco de vidrio, se agitó en vórtex durante 5 min, se sonicó durante 10 min en un sonicador Sonics, y se dejó en maceración durante 48 h. Después del tiempo de maceración se separó el extracto del residuo por medio de filtración, utilizando un filtro de 0.22 µm, posteriormente se concentró por medio de un rota-evaporador Heidolph a 40 °C y presión reducida, y se realizó el secado completo a temperatura ambiente. Este procedimiento se repitió dos veces más sobre el residuo obtenido para la obtención del extracto de n-hexano. Después de las tres maceraciones, se procedió a realizar el mismo procedimiento en el residuo obtenido, utilizando diclorometano y,

posteriormente, metanol. Para la obtención de los extractos hidro-alcohólicos se realizó el mismo procedimiento utilizando 1 g del liofilizado y como disolvente metanol-agua en diferentes proporciones (1:1, 6:4, 7:3, 8:2 y 9:1). Los extractos se almacenaron a -4 °C y se disolvieron en DMSO para ensayos biológicos, según fuera necesario.

### **6.3. Líneas celulares de cáncer**

Las líneas celulares C6 (glioma murino, ATCC® CCL-107™), RG2 (glioma murino, ATCC® CRL-2433™), U87 (glioblastoma humano, ATCC® HTB-14™) y A549 (carcinoma de pulmón, ATCC® CCL-185™) se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC®), mientras que la línea celular U373 (astrocitoma humano, ATCC® CVCL-2219™) fue donada por el Instituto Nacional de Cancerología (México). Las células se cultivaron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (C6, RG2, U87 y U373) o DMEM/F-12 1:1 (A549) con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%, penicilina-estreptomicina al 1%, aminoácidos no esenciales al 1%, y 2 mM de L-glutamina, hasta alcanzar una confluencia de alrededor del 90% en una caja de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>.

### **6.4. Cultivos primarios de neuronas y astrocitos**

Los cultivos primarios se establecieron utilizando embriones de rata Wistar de 17 días de gestación. Brevemente, se disecaron los cerebros completos (incluida la corteza y las regiones subcorticales, excluyendo el cerebelo y los bulbos olfatorios), se homogenizaron mecánicamente, se expusieron durante 2 min a tripsina al 0.25% a 37 °C, y se desactivaron con SFB. Después de centrifugar a 900 xg durante 10 min, las células se recolectaron, se resuspendieron en Minimal Essential Medium (MEM) sin SFB, se pasaron a través de un colador celular (70 µm), se sembraron 1x10<sup>4</sup> células en placas de cultivo pre-tratadas con poli-D-lisina (12.5 mg/mL), y se dejaron en reposo durante 2 h a 37 °C. Posteriormente, el medio fue reemplazado por medio Neurobasal suplementado con glutamina (2 mM) y 2% B-27 10X para cultivo neuronal, o DMEM suplementado con SFB para cultivo de astrocitos, dependiendo del propósito experimental. Las células se incubaron a 37 °C y 5% de

CO<sub>2</sub> y la mitad del medio de cultivo se renovó cada tres días. Los experimentos con células cultivadas se llevaron a cabo en el día 7-10 de cultivo, una vez que los cultivos se establecieron por completo.

### **6.5. Validación de cultivos primarios neuronales**

Para determinar la proliferación e identidad de las células que se obtuvieron de las disecciones de los cerebros de embriones murinos, se realizó un seguimiento del cultivo primario de neuronas a diferentes tiempos (1, 2, 3, 7 y 9 días) de incubación en el medio Neurobasal. Brevemente, a los tiempos determinados, los pozos seleccionados se fijaron durante 1 h con paraformaldehído al 1% en PBS, se lavaron tres veces con PBS, y se bloquearon por 1 h con albúmina al 5% en PBS. Transcurrido este tiempo, los pozos se lavaron en las mismas condiciones y se incubaron durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario Anti-NeuN (específico para neuronas) obtenido en conejo, y el Anti-GFAP (específico para astrocitos) obtenido en ratón, a una dilución en PBS de 1:50 y 1:100, respectivamente. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS y se incubaron por 1 h con un anticuerpo secundario Anti-conejo marcado con CY5 (dilución 1:1,500) para el caso de Anti-NeuN, y Anti-ratón (dilución 1:2,500) para el caso de Anti-GFAP. Finalmente, los pozos se recubrieron con una resina de montaje + DAPI para contrastar los núcleos celulares y se tomaron micrografías con un objetivo de magnificación de 20x (200x de magnificación) en campo claro y fluorescencia en un lector multimodal Cytation 3 marca BioTek, empleando longitudes de onda de 503 (GFAP), 647 (CY5) y 405 nm (DAPI).

### **6.6. Ensayo de viabilidad celular**

La viabilidad celular en las líneas celulares y cultivos primarios se determinó de acuerdo con el protocolo de incorporación del colorante rojo neutro como una medida directa de la viabilidad celular, ya que solo las células vivas incorporan y metabolizan el compuesto rojo neutro (Repetto, Del Peso, & Zurita, 2008). Brevemente, las líneas celulares, así como los cultivos primarios, se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^3$  y  $1 \times 10^4$  células/pozo, respectivamente, en placas de 96

pozos con su medio de crecimiento respectivo durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio, las células se lavaron tres veces con PBS estéril y se expusieron a los extractos de *Dolichospermum* sp. a diferentes concentraciones (0.1, 1, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 y 500 µg/mL) diluidos en el medio respectivo dependiendo el propósito experimental durante 48 h. El paclitaxel (PAC) se utilizó como control positivo de daño celular usando concentraciones empíricas. Después del tiempo de exposición a los tratamientos, los cultivos se lavaron con PBS, se adicionaron 100 µL de rojo neutro (50 µg/mL) a cada pozo, y se incubaron durante 2 h a 37 °C. Posteriormente, se retiró el medio y se lavaron los pocillos con PBS. Finalmente, el rojo neutro se eluyó con 100 µL de etanol-ácido acético-PBS (50%:2%:48%) durante 10 min y se determinó la absorbancia a 540 nm en un lector multimodal Cytation 3. Los controles negativos (solo medio de cultivo) contenían la misma cantidad de DMSO ( $\leq 0.5\%$ , v/v) que los extractos de *Dolichospermum* sp. en todas las condiciones de tratamiento. Los valores de  $CI_{50}$  se determinaron por análisis de regresión usando el software GraphPad Prism.

### **6.7. Ensayo de formación de esferoides**

El número de esferoides en la línea celular RG2 se determinó por microscopía óptica. Este ensayo se basa en la capacidad de la línea celular RG2 para formar esferoides como una de sus propiedades de autorrenovación y diseminación (Lee et al., 2013). Brevemente, las células RG2 se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^3$  células/pozo en placas de 96 pozos en medio DMEM complementado durante 24 h. Posteriormente, las células se lavaron tres veces con PBS estéril y se expusieron a los diferentes extractos de *Dolichospermum* sp. en diferentes concentraciones (50, 100, 150, 200 y 250 µg/mL) durante 48 h. Después del tiempo de exposición a los tratamientos, las células se lavaron con PBS, se adicionaron 100 µL de rojo neutro (50 µg/mL) a cada pozo, y se incubaron durante 2 h a 37 °C. A continuación, se lavaron los pocillos con PBS y se cuantificó el número de esferoides funcionales (esferoides que internalizaron el colorante) formados en cada pozo.

### **6.8. Evaluación de la muerte celular**

El tipo de muerte celular se determinó de acuerdo al protocolo de naranja de acridina (NA) y bromuro de etidio (BE) (Kasibhatla et al., 2006). Brevemente, las líneas celulares C6 y RG2 se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^3$  células/pozo en placas de 96 pozos en medio DMEM + SFB durante 24 h. Posteriormente, se trataron durante 48 h según la  $CI_{50}$  de cada extracto en cada línea celular. Para los controles, las células se expusieron 30 min con  $H_2O_2$  (control positivo de apoptosis), o bien hirviéndolas en agua a 95 °C durante 10 s (control positivo de necrosis). Después de 48 h de tratamiento, las células fueron expuestas a una solución de NA y BE (100  $\mu$ g/mL NA, 100  $\mu$ g/mL BE) y se observaron en un lector multimodal Cytation 3 en modo de fluorescencia para observar la morfología celular y los cambios nucleares. Los colorantes NA/BE son selectivos para los ácidos nucleicos que cuando se unen al ADN originan fluorescencia verde y roja-anaranjada, respectivamente. La NA teñirá tanto las células vivas como las muertas, mientras que el BE teñirá solo las células que hayan perdido la integridad de la membrana. Los criterios de identificación son los siguientes: las células vivas aparecen uniformemente verdes con una estructura intacta, las células apoptóticas tempranas se tiñen de verde y exhiben puntos verdes brillantes en los núcleos como consecuencia de la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear, las células apoptóticas tardías también incorporan BE y, por lo tanto, se tiñen de rojo-anaranjado, pero a diferencia de las células necróticas, las células apoptóticas tardías muestran núcleos condensados y a menudo fragmentados, mientras que las células necróticas se tiñen de rojo-anaranjado, pero tienen una morfología nuclear que se asemeja a la de las células viables, sin cromatina condensada.

### **6.9. Análisis químico de los extractos de diclorometano y metanol de *Dolichospermum* sp.**

El análisis químico de los extractos fue realizado en el Instituto de Química de la UNAM por el Dr. Baldomero Esquivel Rodríguez y la Dra. Celia Bustos Brito. Brevemente, los extractos de diclorometano (52.4 mg) y metanol (41.8 mg) procedentes de la cianobacteria *Dolichospermum* sp. se etiquetaron como CB-

DDCM y CB-DMeOH, respectivamente. Las determinaciones de los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron en los equipos Jeol Eclipse operando a una frecuencia de 300 MHz, y Fourier Bruker AVANCE III operando a 400 MHz para  $^1\text{H}$ . La separación cromatográfica en columna se realizó en gel de sílice de malla 230-400. La cromatografía en capa fina preparativa fue realizada en placas (Merck KGaA) de 0.25 mm de espesor. El seguimiento de la separación cromatográfica se llevó a cabo con cromatografía en capa fina analítica (CCFA), empleando placas de gel de sílice de 0.20 mm de espesor con indicador de fluorescencia de marca (Merck KGaA), y su revelado se realizó con una lámpara de luz UV y sulfato cérico (bisulfato de cesio) en ácido sulfúrico concentrado.

### 6.9.1. Análisis químico del extracto de diclorometano

El extracto de diclorometano se sometió a cromatografía en columna abierta con el objetivo de separar el componente mayoritario. La cromatografía se realizó bajo las siguientes condiciones:

**Tabla 1.** Condiciones de la cromatografía en columna abierta.

Peso de la muestra	42.4 mg
Diámetro de la columna	1.3 cm
Longitud de la columna	18.5 cm
Disolventes de elución	Mezclas de diclorometano-acetona (la proporción de acetona se incrementó gradualmente de 10 a 100%, en pasos de 10%)
Volumen de las fracciones	10 mL
Fracciones colectadas	51

Las fracciones se reunieron de acuerdo con su perfil cromatográfico en capa fina, revelando con luz UV, sulfato cérico y ninhidrina. Posteriormente, se determinó la RMN  $^1\text{H}$  de las principales fracciones.

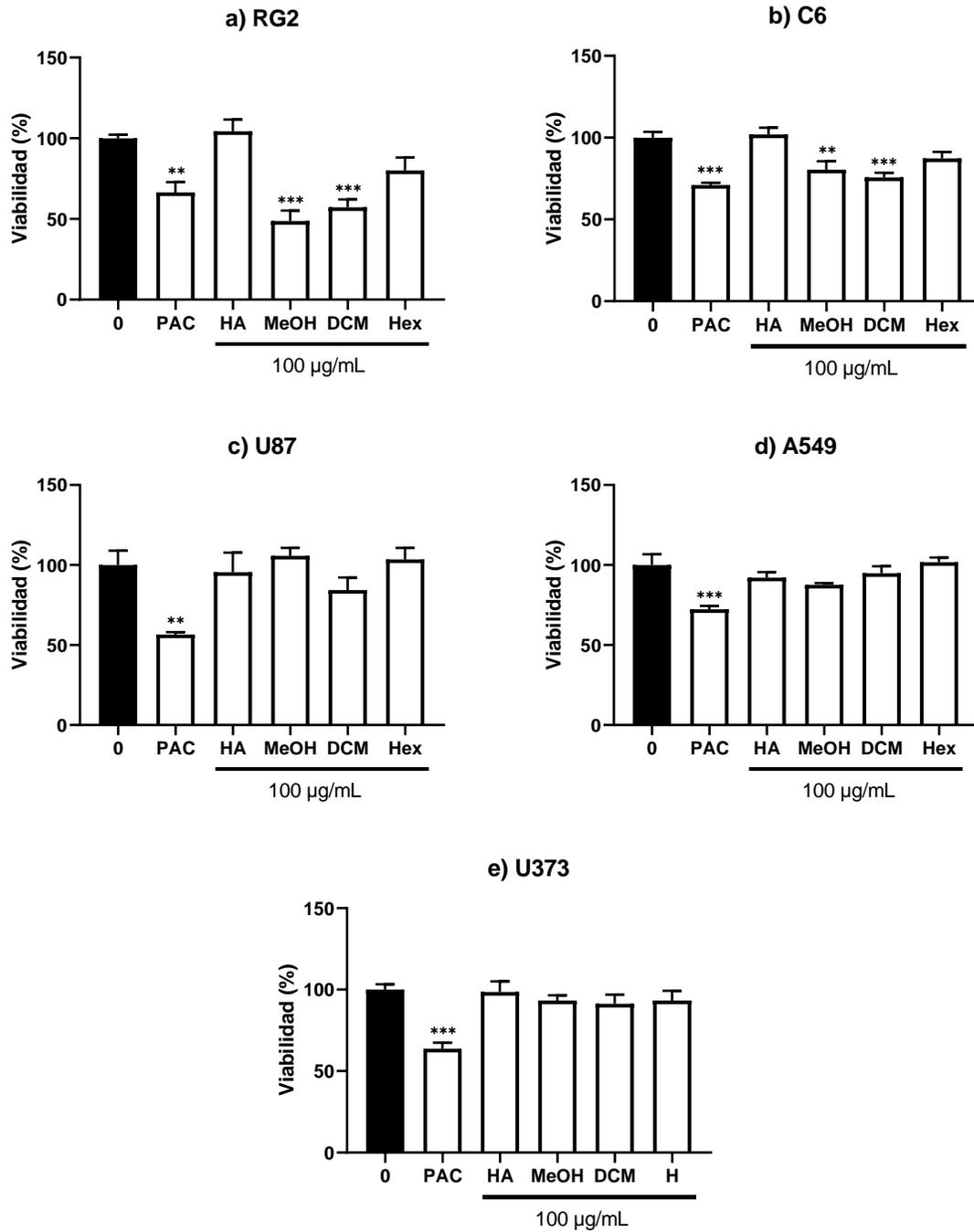
## 6.10. Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Todos los experimentos se llevaron a cabo en por lo menos 3 experimentos independientes por triplicado y los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar (S.D.), o  $\pm$  error estándar de la media (S.E.M.). La significancia estadística se determinó mediante análisis de varianzas (ANOVA) de una vía seguido del análisis *post hoc* de Tukey. Los valores de \*P  $\leq$  0.05, \*\*P  $\leq$  0.01 y \*\*\*P  $\leq$  0.001 se consideraron estadísticamente significativos.

## 7. Resultados

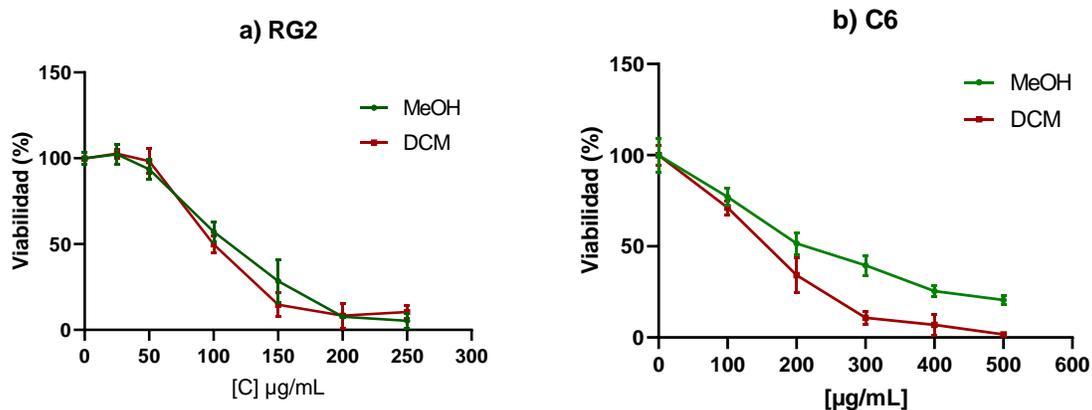
### 7.1. Evaluación de la actividad citotóxica de extractos de *Dolichospermum* sp. sobre líneas celulares cancerosas

La extracción de la muestra de *Dolichospermum* sp. produjo un extracto de n-hexano amarillento (31.5 mg), un extracto de diclorometano verde oscuro (58.5 mg), un extracto de metanol verde muy oscuro (126 mg) y extractos hidro-alcohólicos marrón oscuro (115 mg en total). El efecto citotóxico de los extractos de *Dolichospermum* sp. sobre la proliferación de las diversas líneas celulares de cáncer se determinó mediante el ensayo de incorporación de rojo neutro. La actividad antiproliferativa de los extractos hidro-alcohólico (HA 1:1), de metanol (MeOH), de diclorometano (DCM) y de n-hexano (Hex) se muestra en la Figura 3. Los extractos de MeOH y DCM, a concentraciones de 100  $\mu$ g/mL, disminuyeron la viabilidad celular de manera significativa en la línea celular RG2 de glioma murino en un 51.36% y 42.88%, respectivamente, mientras que en la línea celular C6, se observó una disminución de la viabilidad de manera significativa en un 19.61% y 24.30%, respectivamente (Figura 3a y 3b). Por otro lado, las líneas celulares U87, A549 y U373 no presentaron una disminución significativa de la viabilidad celular.

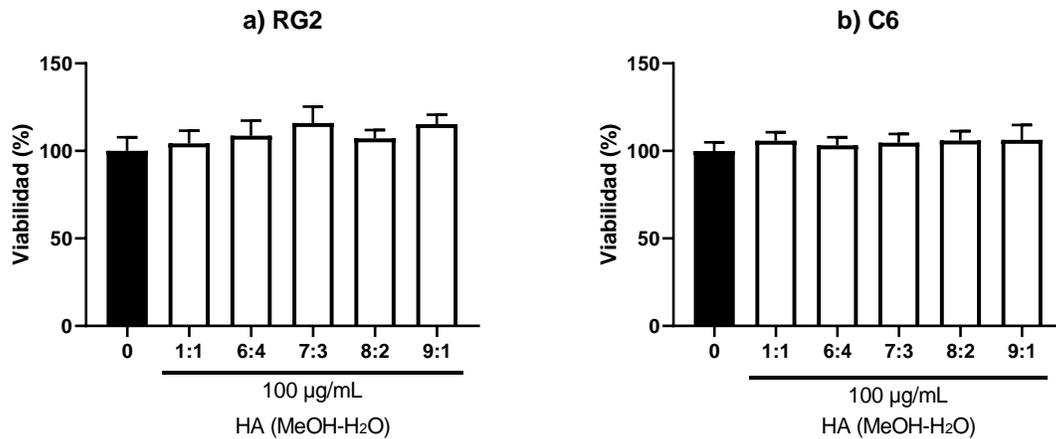


**Figura 3.** Efecto antiproliferativo de los extractos de *Dolichospermum* sp. a 100 µg/mL en células (a) RG2, (b) C6, (c) U87, (d) A549 y (e) U373 después de 48 h de exposición. Se utilizó paclitaxel (PAC) como control positivo de daño celular (2.5 µM, 2 µM, 2 µM, 100 nM y 2 µM de PAC respectivamente para cada línea celular). Los valores representan medias ± S.E.M. (n = 3 experimentos independientes por triplicado por grupo). \*P ≤ 0.05, \*\*P ≤ 0.01 y \*\*\*P ≤ 0.001, diferente del control negativo.

Para determinar la citotoxicidad de los compuestos presentes en los extractos de MeOH y DCM sobre las líneas celulares RG2 y C6, se realizaron curvas de concentración-respuesta. Los resultados representados en la Figura 4 revelan que los extractos evaluados exhibieron una actividad citotóxica de manera dependiente de la concentración, siendo el extracto de DCM el que mostró una mayor actividad citotóxica, con una  $CI_{50}$  de  $106.70 \pm 1.75$  y  $154.82 \pm 6.57$   $\mu\text{g/mL}$  en células RG2 y C6, respectivamente, mientras que el extracto de MeOH presentó un  $CI_{50}$  de  $115.07 \pm 5.66$  y  $219.07 \pm 8.42$   $\mu\text{g/mL}$  en células RG2 y C6, respectivamente. Por otro lado, se decidió evaluar las diferentes proporciones del extracto HA para determinar si las variaciones sobre la cantidad de MeOH-H<sub>2</sub>O influían sobre la viabilidad celular; sin embargo, no hubo cambios significativos a la concentración evaluada (Figura 5).

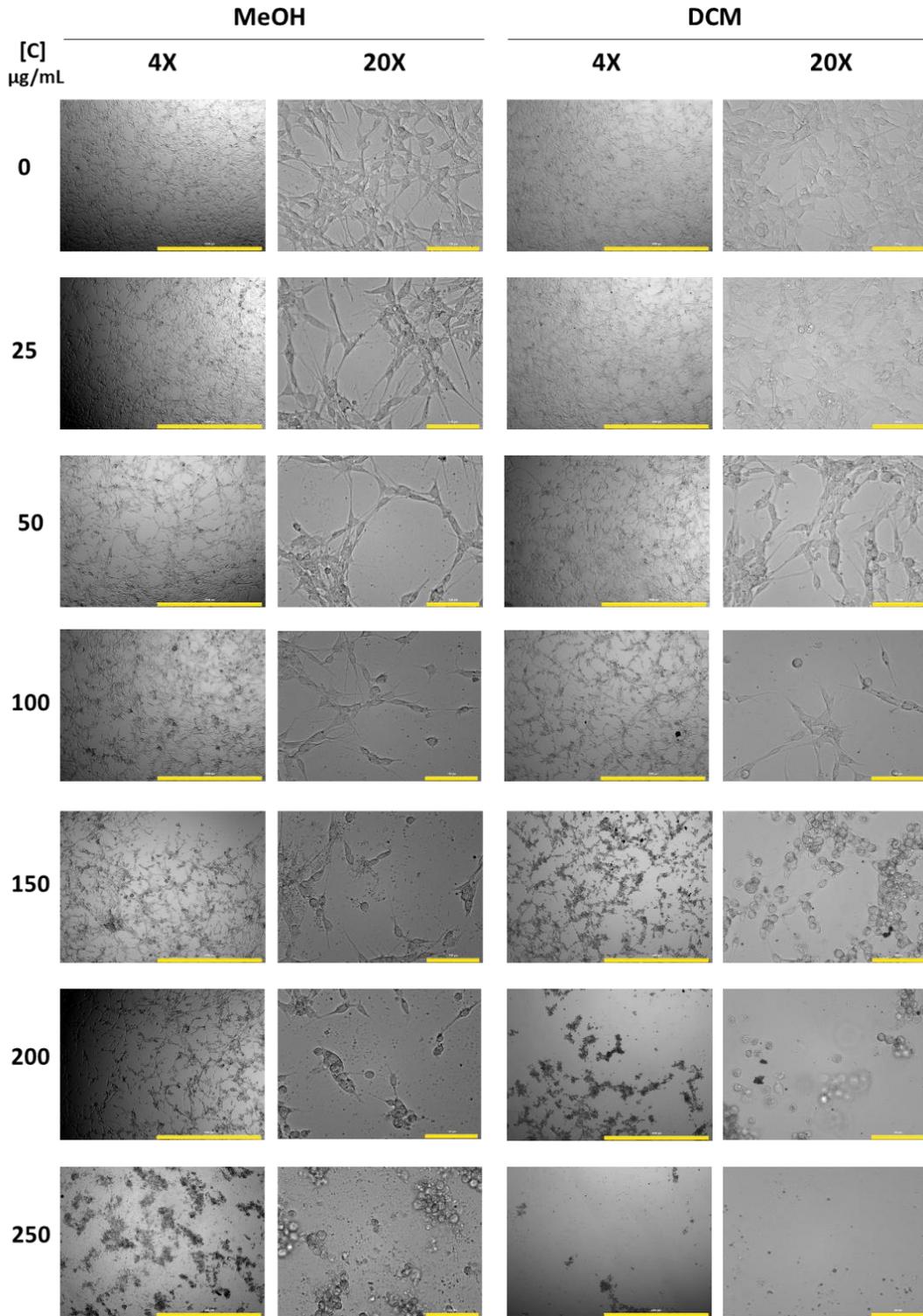


**Figura 4.** Efecto antiproliferativo de los extractos de MeOH y DCM de *Dolichospermum* sp. a diferentes concentraciones (50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 y 500  $\mu\text{g/mL}$ ) en células (a) RG2 y (b) C6 después de 48 h de exposición. Los valores representan medias  $\pm$  S.D. ( $n = 3$  experimentos independientes por triplicado por grupo).

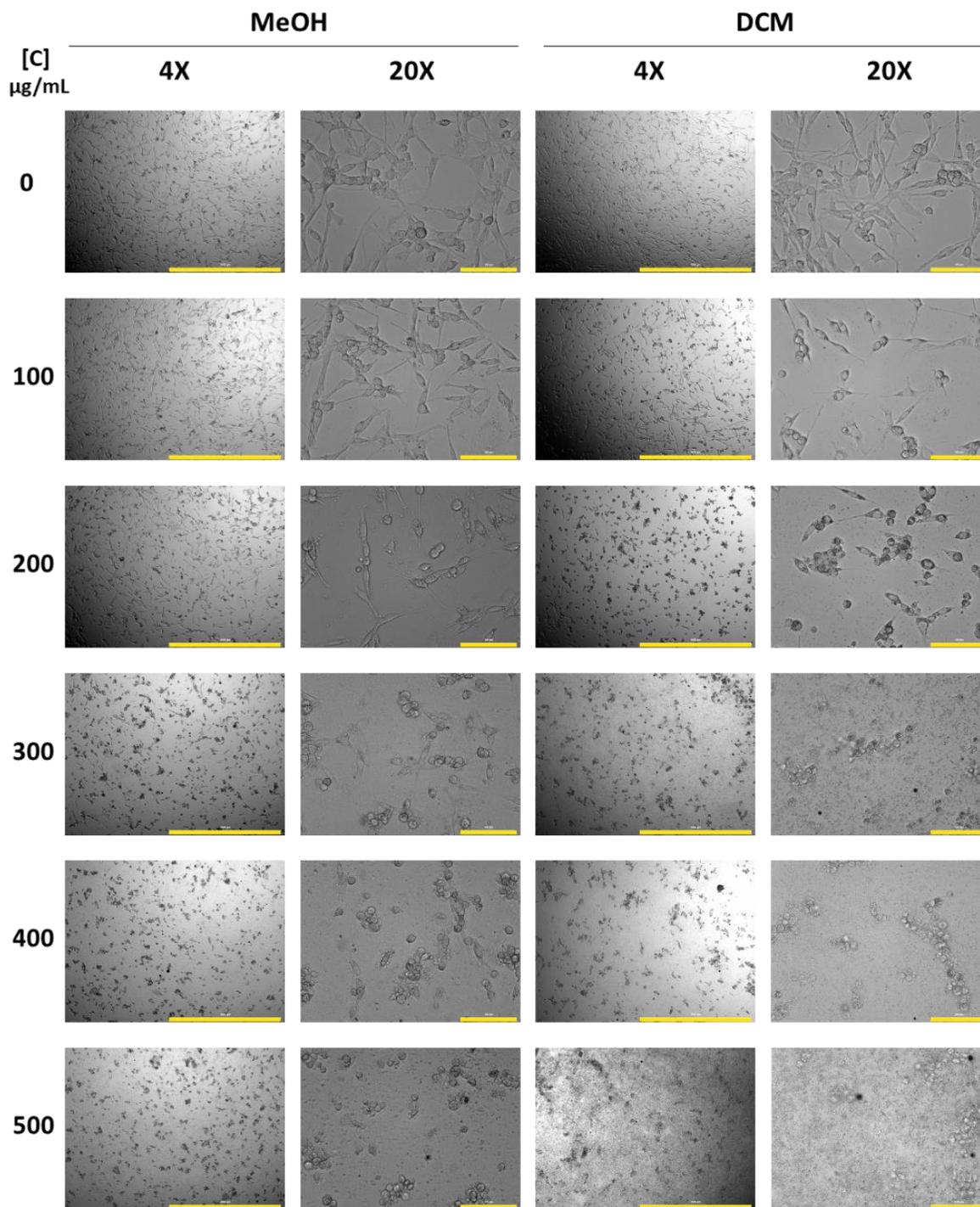


**Figura 5.** Efecto antiproliferativo del extracto HA de *Dolichospermum* sp. en diferentes proporciones de MeOH-H<sub>2</sub>O a 100 µg/mL en células (a) RG2 y (b) C6 después de 48 h de exposición. Los valores representan medias ± S.E.M. (n = 3 experimentos independientes por triplicado por grupo). \*P ≤ 0.05, \*\*P ≤ 0.01 y \*\*\*P ≤ 0.001, diferente del control negativo.

Durante el proceso de citotoxicidad inducido por los diferentes extractos en las líneas celulares RG2 y C6, se observaron severas irregularidades en la morfología típica. Algunos de los cambios más evidentes después de 48 h de tratamiento fueron la reducción de proyecciones plasmáticas, detritos celulares en el medio, cuerpos celulares redondeados, citoplasma multivacuolado y agregación celular. Sin embargo, estas alteraciones morfológicas se observaron en diferentes grados para cada uno de los extractos evaluados de manera proporcional a las dosis evaluadas (Figuras 6 y 7).



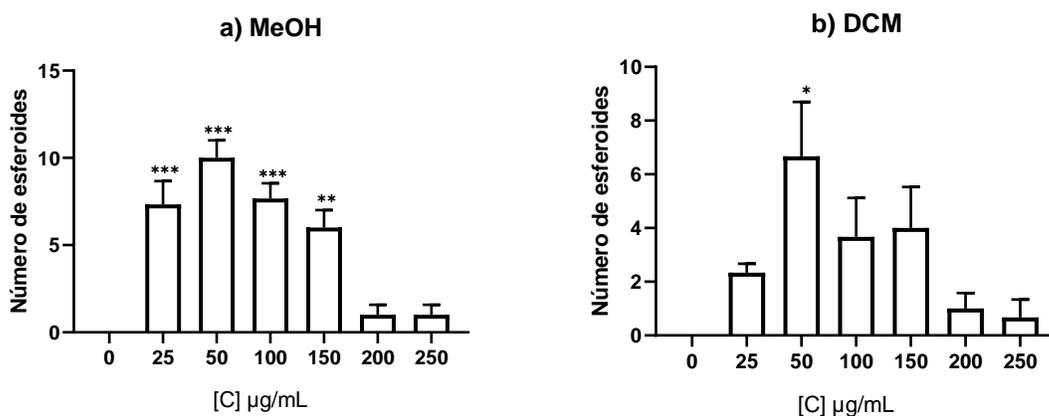
**Figura 6.** Cambios morfológicos y efecto citotóxico de los extractos de MeOH y DCM de *Dolichospermum* sp. a 50, 100, 150, 200 y 250 µg/mL en células RG2 después de 48 h de exposición. Imágenes representativas observadas bajo microscopía en campo claro con un objetivo de magnificación de 4x y 20x (40x y 200x de magnificación, respectivamente). Barra de escala = 1000 y 100 µm, respectivamente.



**Figura 7.** Cambios morfológicos y efecto citotóxico de los extractos de MeOH y DCM de *Dolichospermum* sp. a 100, 200, 300, 400 y 500 µg/mL en células C6 después de 48 h de exposición. Imágenes representativas observadas bajo microscopía en campo claro con un objetivo de magnificación de 4x y 20x (40x y 200x de magnificación, respectivamente). Barra de escala = 1000 y 100 µm, respectivamente.

## 7.2. Evaluación del número de esferoides

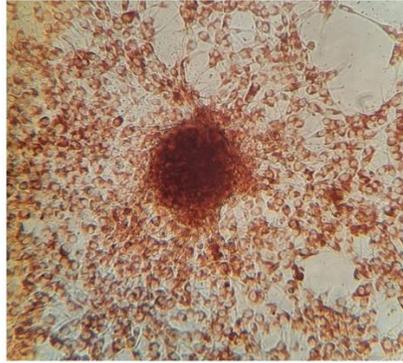
El número de esferoides en la línea celular RG2 se determinó bajo microscopía óptica, utilizando la técnica de incorporación de rojo neutro descrita previamente. Recientemente se ha demostrado que las células RG2 tienen una población similar a las células madre cancerígenas, con la capacidad de formar esferoides como una de sus propiedades de autorrenovación y diseminación (Lee et al., 2013). La Figura 8 muestra que el número de esferoides aumentó de manera dependiente de la concentración al utilizar concentraciones sub-citotóxicas. Sin embargo, en concentraciones citotóxicas (>100  $\mu\text{g/mL}$ ), se observa una tendencia a la disminución de esferoides dependiente de la concentración.



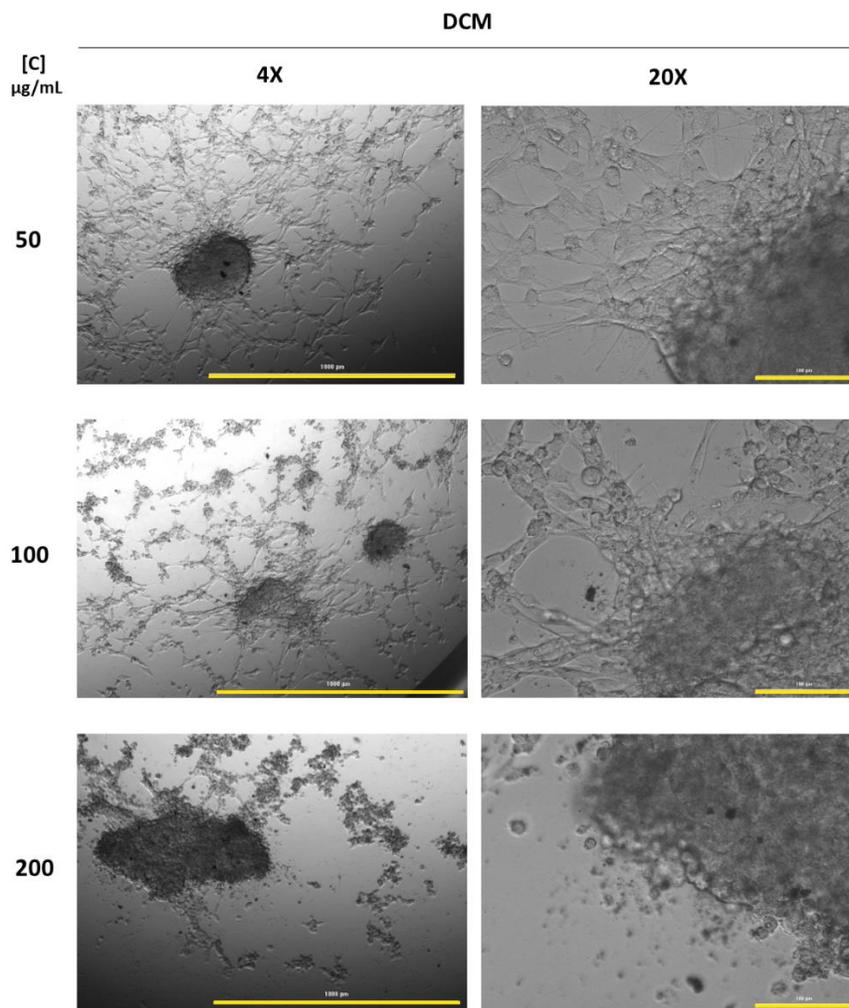
**Figura 8.** Número de esferoides originados por la exposición de las células RG2 a los extractos de (a) MeOH y (b) DCM de *Dolichospermum* sp. a 25, 50, 100, 150, 200 y 250  $\mu\text{g/mL}$  después de 48 h de exposición. Los valores representan medias  $\pm$  S.E.M. (n = 3 experimentos independientes por triplicado). \*P  $\leq$  0.05, \*\*P  $\leq$  0.01 y \*\*\*P  $\leq$  0.001, diferente del control negativo.

Cabe destacar que la formación de esferoides en células RG2 expuestas al extracto de DCM fue menor respecto al número de esferoides formados en respuesta al extracto de MeOH en la mayoría de los grupos de tratamiento, con excepción de las concentraciones de 200 y 250  $\mu\text{g/mL}$ , con las cuales prácticamente existían pocos o nulos esferoides. De igual manera, a concentraciones citotóxicas (100 y 200  $\mu\text{g/mL}$ ) del extracto de DCM se observó pérdida de interconexiones entre células cancerosas, reducción de proyecciones plasmáticas y cuerpos celulares redondeados en la periferia de los esferoides (Figura 9).

a)



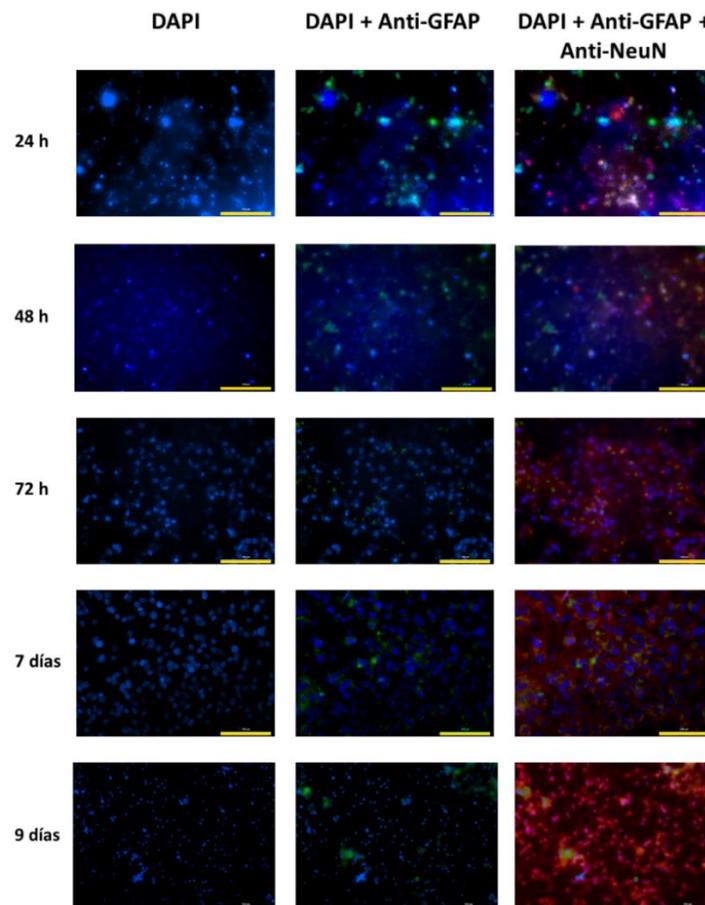
b)



**Figura 9.** (a) Determinación de esferoides funcionales mediante la tinción de células viables por el método de rojo neutro; (b) Cambios morfológicos de los esferoides de RG2 expuestos al extracto de DCM de *Dolichospermum* sp. a 50, 100 y 200 μg/mL después de 48 h de exposición. Imágenes representativas observadas bajo microscopía en campo claro con un objetivo de magnificación de 4x y 20x (40x y 200x de magnificación, respectivamente). Barra de escala = 1000 y 100 μm, respectivamente.

### 7.3. Validación de cultivos primarios neuronales

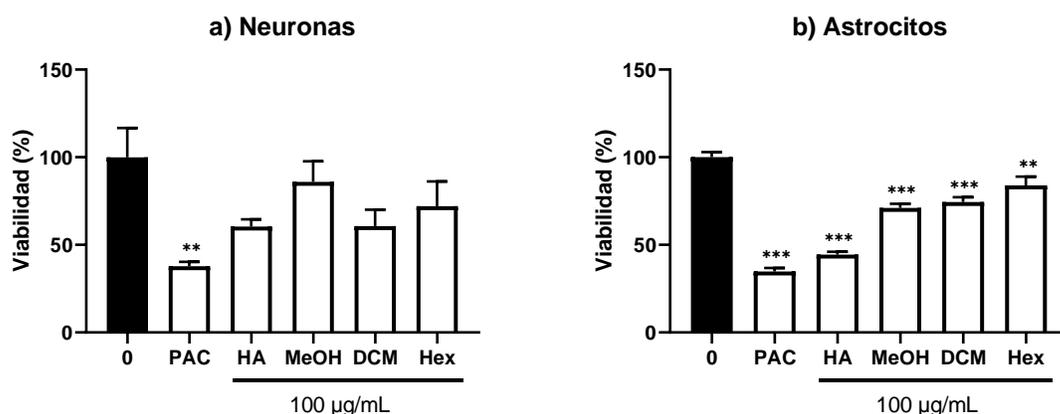
Para determinar la actividad de proliferación e identidad de las células que se obtuvieron de las disecciones de los cerebros de embriones murinos, se realizó el seguimiento del cultivo primario de neuronas a diferentes tiempos de incubación mediante inmunofluorescencia. En la Figura 10 se muestra el reconocimiento de diferentes estirpes de células cerebrales, en las cuales se observa un mayor número de neuronas respecto a los astrocitos conforme avanza el tiempo de incubación; esto debido principalmente a los procesos de proliferación y diferenciación que se generan al exponer a las células al medio de crecimiento adecuado, ya que los componentes específicos del medio de cultivo favorecen estos procesos de manera selectiva.



**Figura 10.** Inmunofluorescencia de células cerebrales en cultivos primarios de neuronas. El panel muestra el reconocimiento de núcleos con DAPI (azul), neuronas con Anti-NeuN (rojo) y astrocitos con Anti-GFAP (verde) a diferentes tiempos de incubación (1, 2, 3, 7 y 9 días). Imágenes representativas observadas bajo microscopía de fluorescencia con un objetivo de magnificación de 4x (40x de magnificación). Barra de escala = 1000  $\mu$ m.

#### 7.4. Evaluación de la actividad citotóxica de extractos de *Dolichospermum* sp. sobre líneas celulares control

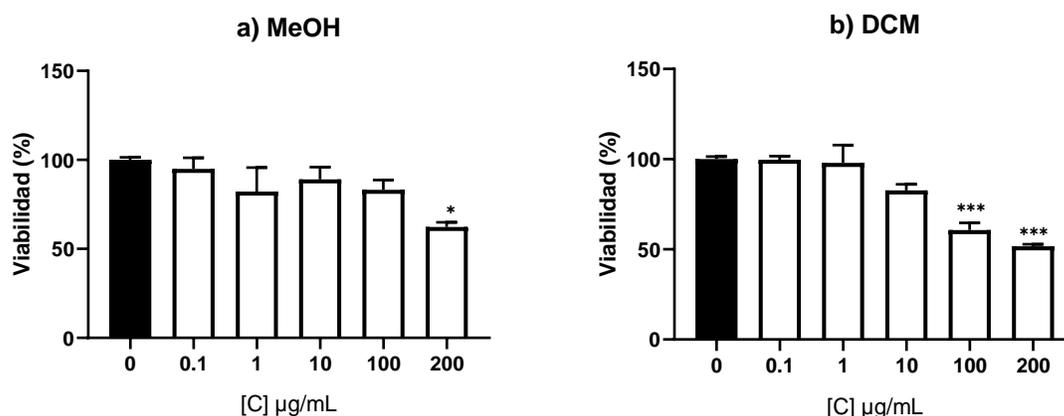
El efecto antiproliferativo de los extractos de *Dolichospermum* sp. sobre cultivos primarios de neuronas y astrocitos se evaluó mediante el ensayo de rojo neutro. Como se muestra en la Figura 11, el extracto HA (1:1) exhibió la mayor actividad citotóxica sobre el crecimiento celular contra ambos cultivos primarios, disminuyendo la viabilidad celular en un 39.62%, y un 55.54% para cultivos de neuronas y astrocitos, respectivamente, a concentraciones de 100 µg/mL. Por otro lado, los extractos de MeOH, DCM y Hex mostraron una actividad antiproliferativa menos notable a la misma concentración, disminuyendo la viabilidad celular en un 14.10%, 39.36% y 27.97%, respectivamente, en cultivos primarios de neuronas, mientras que en cultivos primarios de astrocitos se observa una disminución de la viabilidad de 28.88%, 25.54% y 16.04%, respectivamente.



**Figura 11.** Efecto antiproliferativo de los extractos de *Dolichospermum* sp. a 100 µg/mL en cultivos primarios de (a) neuronas y (b) astrocitos después de 48 h de exposición. Se utilizó PAC como control positivo de daño celular (2 µM). Los valores representan medias ± S.E.M. (n = 3 experimentos independientes por triplicado por grupo). \*P ≤ 0.05, \*\*P ≤ 0.01 y \*\*\*P ≤ 0.001, diferente del control negativo.

Para indagar más sobre la citotoxicidad de los extractos de MeOH y DCM sobre el crecimiento celular de cultivos primarios de neuronas, las células se expusieron a diferentes concentraciones (0.1, 1, 10, 100 y 200 µg/mL). Como se observa en la Figura 12, los extractos de MeOH y DCM a concentraciones de 200 µg/mL disminuyeron la viabilidad celular de manera significativa en un 37.67% y

48.30%, respectivamente, por lo que las  $Cl_{50}$  de tales extractos es  $>200 \mu\text{g/mL}$ , aunque cabe destacar que la  $Cl_{50}$  del extracto de DCM en cultivos primarios de neuronas podría ser aproximada a  $200 \mu\text{g/mL}$ .



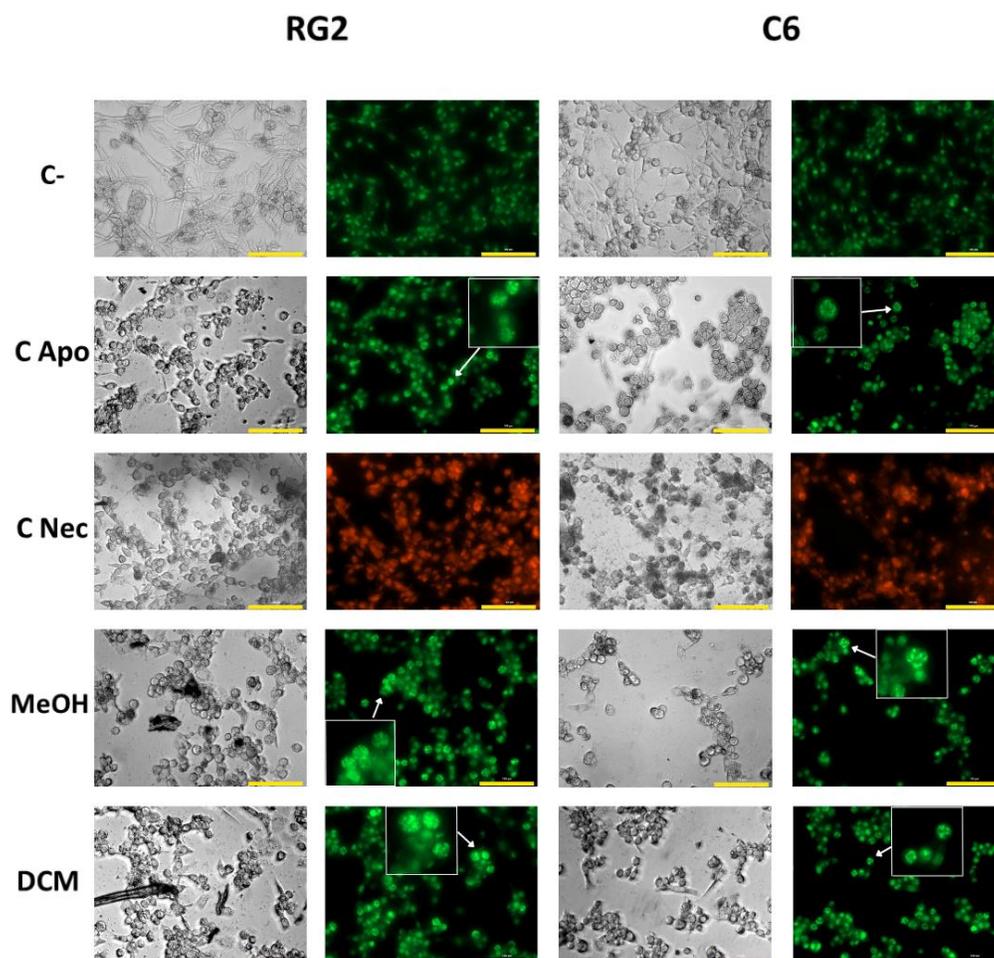
**Figura 12.** Efecto antiproliferativo de los extractos de (a) MeOH y (b) DCM de *Dolichospermum sp.* a 0.1, 1, 10, 100 y 200  $\mu\text{g/mL}$  en cultivos primarios de neuronas después de 48 h de exposición. Los valores representan medias  $\pm$  S.E.M. ( $n = 3$  experimentos independientes por triplicado por grupo). \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$  y \*\*\* $P \leq 0.001$  diferente del control negativo.

Como se muestra en las Figuras 3, 4 y 12, los extractos de MeOH y DCM exhibieron una moderada actividad antiproliferativa en las líneas celulares RG2 y C6, mientras que en cultivos primarios de neuronas los extractos presentan moderada selectividad con valores de  $Cl_{50} >200 \mu\text{g/mL}$ . Por lo tanto, los extractos de DCM y MeOH se estudiaron más a fondo para determinar su perfil químico y los posibles mecanismos responsables de su citotoxicidad.

### 7.5. Evaluación del tipo de muerte celular inducida por extractos de *Dolichospermum sp.* sobre líneas celulares cancerosas

Para explorar el posible mecanismo de muerte celular mediado por los extractos de MeOH y DCM sobre líneas celulares cancerosas, se utilizó el protocolo de naranja de acridina (NA) y bromuro de etidio (BE). Como se muestra en la Figura 13, las células RG2 y C6 tratadas con el equivalente a la  $Cl_{50}$  de cada extracto mostraron características morfológicas similares al control pro-apoptótico tratado con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los cambios más representativos fueron una clara condensación de cromatina y

fragmentación nuclear representada como puntos verdes brillantes en los núcleos, protuberancias en la membrana plasmática y formación de cuerpos apoptóticos. Cabe destacar que no se observó necrosis en ninguna de las células tratadas con los extractos al realizar la comparación con el grupo tratado con agua a 95 °C como control positivo de necrosis.



**Figura 13.** Efecto del extracto de MeOH y DCM de *Dolichospermum* sp. sobre la muerte celular en células RG2 y C6 según su  $CI_{50}$ . Imágenes representativas observadas bajo microscopía de campo claro y fluorescencia con un objetivo de magnificación de 20x (200x de magnificación). Barra de escala = 100  $\mu$ m.

## 7.6. Análisis químico de los extractos de diclorometano y metanol de *Dolichospermum* sp.

Los extractos de diclorometano (CB-DDCM) y metanol (CB-DMeOH) se analizaron por resonancia magnética nuclear de protón (RMN  $^1H$ ) con el fin de determinar el

tipo de componentes presentes en cada uno de ellos. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  del extracto CB-DDCM muestra una señal muy intensa en 1.25 ppm, característica de ácidos grasos con cadena de grandes longitudes. A frecuencias más altas (5.23-5.45 ppm), se observan señales de protones vinílicos, lo que indica que las cadenas correspondientes a los ácidos grasos deben contener insaturaciones en alguna posición de la cadena. Sin embargo, esta técnica no permite determinar la longitud de dicha cadena ni la posición, número o configuración de las insaturaciones. En aproximadamente 2.8 ppm se observa una señal que indica la presencia de metilenos alílicos ubicados entre dos insaturaciones. En  $\delta = 2.3$  se observan las señales de los protones metilénicos en posición  $\alpha$  al grupo carbonilo. Menos desplazadas, en 2.02 ppm se observan los metilenos alílicos. En 1.6 ppm se observan las señales correspondientes a los metilenos en posición beta al carbonilo. Finalmente, aproximadamente en 0.8 ppm se observan las señales atribuidas a los metilos terminales de las cadenas de los ácidos grasos. Adicionalmente, se observan dos grupos de señales simples en el espectro, el primer grupo se observa en la región de los hidrógenos aromáticos (9.53, 9.39, 8.55 y 8.10 ppm) y el segundo grupo se encuentra en la zona de metilos unidos a oxígeno (3.88, 3.69, 3.40 y 3.24 ppm) (Figura 14). Estas señales son características de unos compuestos denominados feofitinas.

Respecto al extracto CB-DMeOH, la RMN  $^1\text{H}$  muestra las señales características ya mencionadas para los ácidos grasos, los cuales constituyen los compuestos mayoritarios en el extracto. Además de estos ácidos, se observan señales muy complejas entre 3.5 ppm que indican la presencia de hidrógenos geminales de oxígeno que podrían corresponder a azúcares, aminoácidos, inositoles o a algún otro componente altamente oxigenado (Figura 15). La presencia de este tipo de compuestos es de esperarse debido a la naturaleza polar del disolvente empleado para preparar el extracto.

CB-DDCM.10.fid  
Instituto de Química, UNAM / C. Bustos  
Clave: CB-DCM  
Disolvente: CDCl<sub>3</sub>  
1H  
Bruker Avance III 400 MHz (H)  
Sonda BBO 400S1 BBF-H-D-05z  
20-agosto-2021  
{PROTON 32sc} CDCl<sub>3</sub> /opt/topspin3.5pl7 SecTec 9

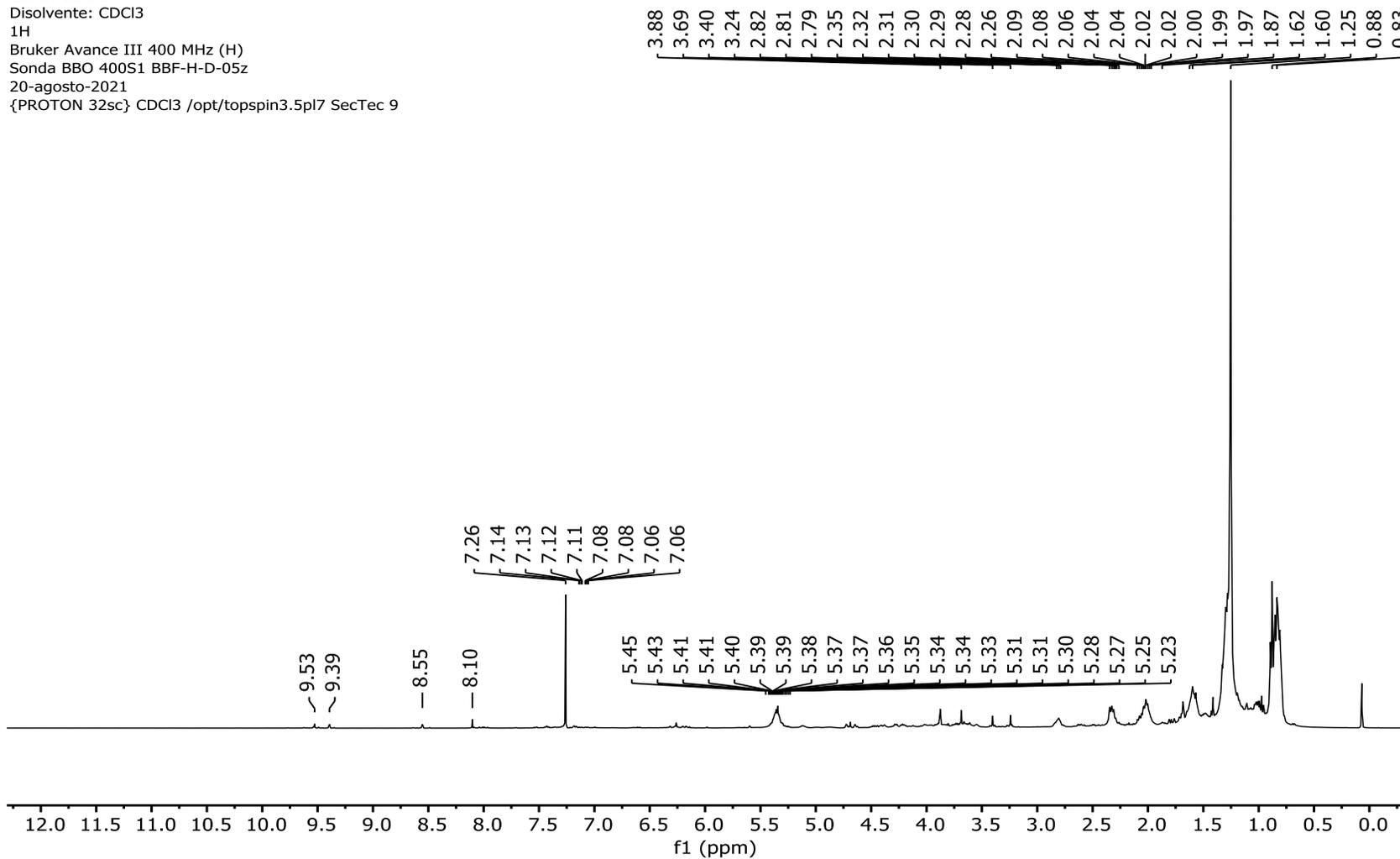


Figura 14. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del extracto CB-DDCM (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

CB-DMeOH.10.fid  
Instituto de Quimica, UNAM / C. Bustos  
Clave: CB-MeOH  
Disolvente: MeOD  
1H  
Bruker Avance III 400 MHz (H)  
Sonda BBO 400S1 BBF-H-D-05z  
20-agosto-2021

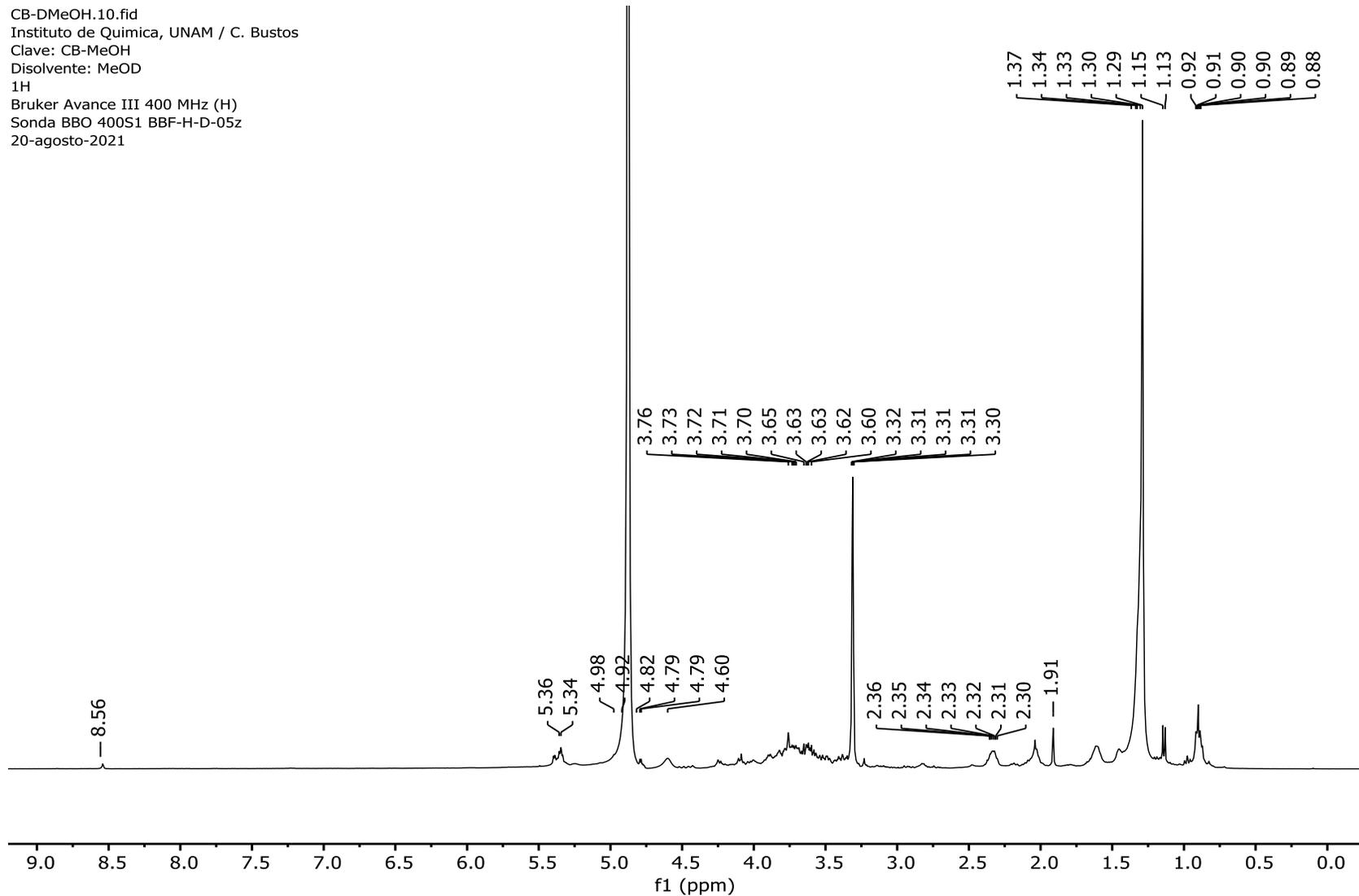
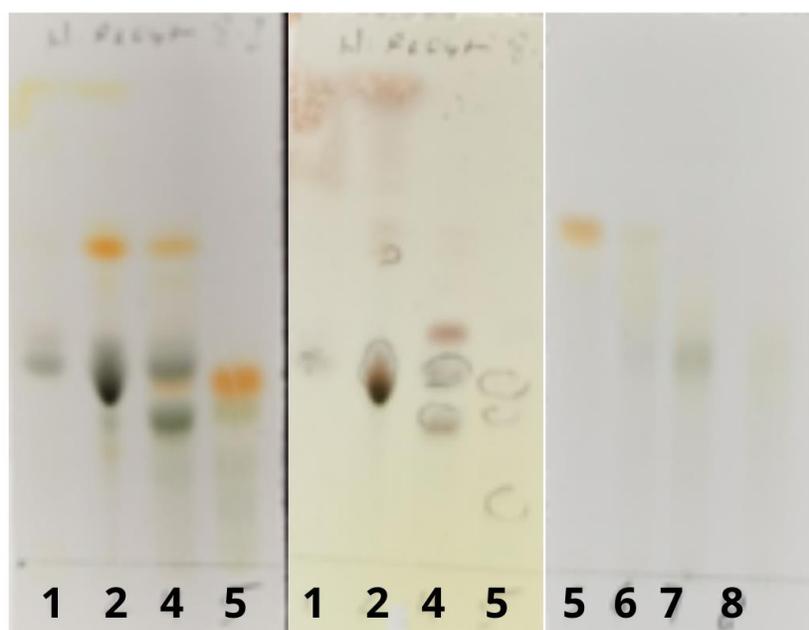


Figura 15. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del extracto CB-DMeOH ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz).

### 7.6.1. Análisis químico del extracto de diclorometano

El extracto CB-DDCM se sometió a cromatografía en columna abierta con el objetivo de separar el componente mayoritario. Las fracciones se reunieron de acuerdo con su perfil cromatográfico en capa fina, revelando con luz UV, sulfato cérico y ninhidrina. Se obtuvieron 17 fracciones primarias (CB-DDCM-A hasta CB-DDCM-P). En la Figura 16 se muestran las placas cromatográficas de algunas de estas fracciones.



**Figura 16.** Placas cromatográficas de las primeras ocho fracciones de la primera columna del extracto CB-DDCM.

Posteriormente, se determinó la RMN  $^1\text{H}$  de las fracciones CB-DDCM-A, CB-DDCM-B, CB-DDCM-C y CB-DDCM-D. Los espectros se muestran en las Figuras 17-20. El espectro de la fracción CB-DDCM-A (11.2 mg, Figura 17) indica que está compuesta principalmente por ácidos grasos, por lo que en etapas posteriores del proyecto se realizará una esterificación de estos ácidos, cuyos esterés metílicos se analizarán por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-EM) para identificar los constituyentes de la mezcla. En el espectro de la fracción CB-DDCM-B (10.6 mg, Figura 18) se observa la presencia de ácidos grasos y las

señales características de una feofitina. En el espectro de la fracción CB-DDCM-C (2.8 mg, Figura 19) se observa la presencia de una señal en 1.25 ppm y señales atribuibles a hidrógenos geminales de oxígeno en la región de 3 a 4 ppm del espectro que podrían corresponder a alcoholes con grandes longitudes de cadena. Se observan también otras señales muy pequeñas en la región de hidrógenos aromáticos. En el espectro de la fracción CB-DDCM-D (1.0 mg, Figura 20) solo se observan las señales en 1.25 y 0.8 ppm que podrían corresponder a alcoholes o ácidos de cadenas largas; sin embargo, la cantidad de muestra fue muy pequeña y no fue posible observar más señales.

Como puede notarse, la suma de la cantidad de muestra obtenida en las fracciones A y B constituye casi la mitad de extracto. Las fracciones A-D constituyen 25.6 mg. El peso del resto de las fracciones está por debajo de 1 mg por lo que no se determinó la RMN; sin embargo, se espera que a más altas frecuencias de RMN (700 MHz) sea posible identificar algún componente.

La Fracción CB-DDCM-B se sometió a cromatografía en capa fina preparativa empleando una mezcla de hexano-acetato de etilo (8:2), y se obtuvieron 7.2 mg (16.9% del extracto total de CB-DDCM) del compuesto CB-DDCM-Bb, cuyo espectro de RMN  $^1\text{H}$  se muestra en la Figura 21. La RMN  $^1\text{H}$  indica que se trata de un compuesto con una pureza del 83% que muy probablemente corresponde a la feofitina A (Figura 22).

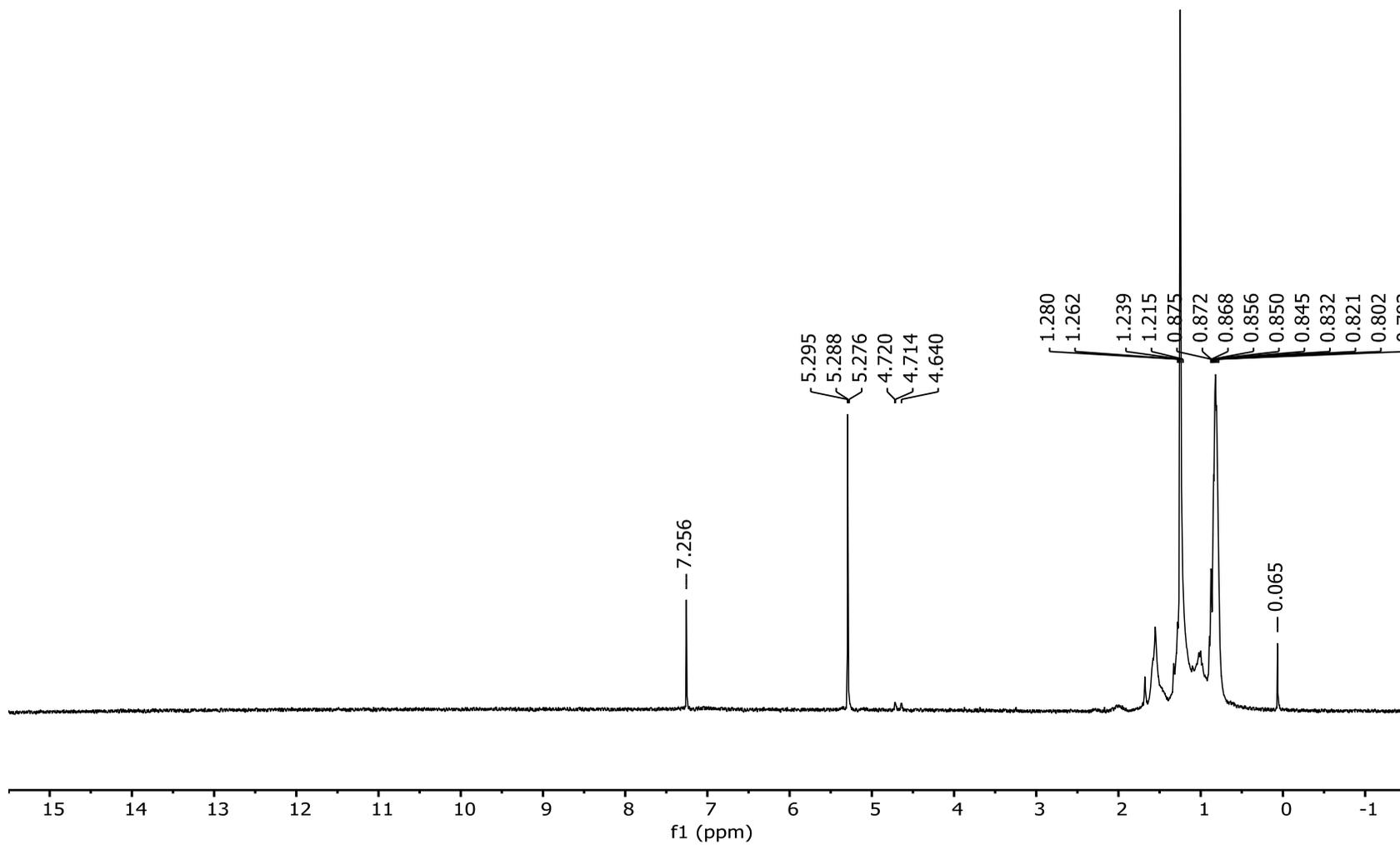


Figura 17. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de la fracción CB-DDCM-A (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz).

1  
1H\_CB-DDCM-B\_CBB

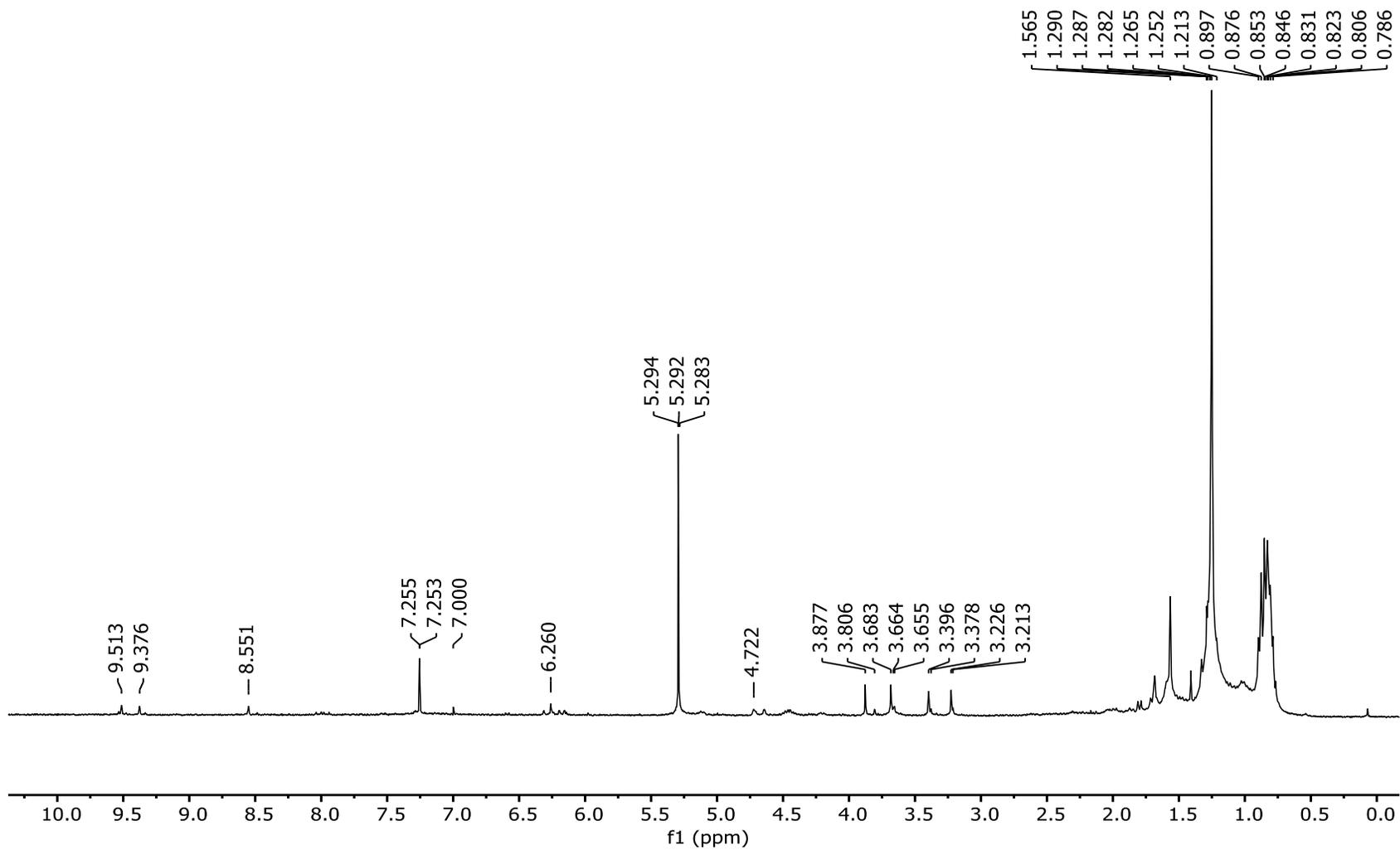


Figura 18. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de la fracción CB-DDCM-B (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz).

1  
1H\_CB-DDCM-C\_CBB

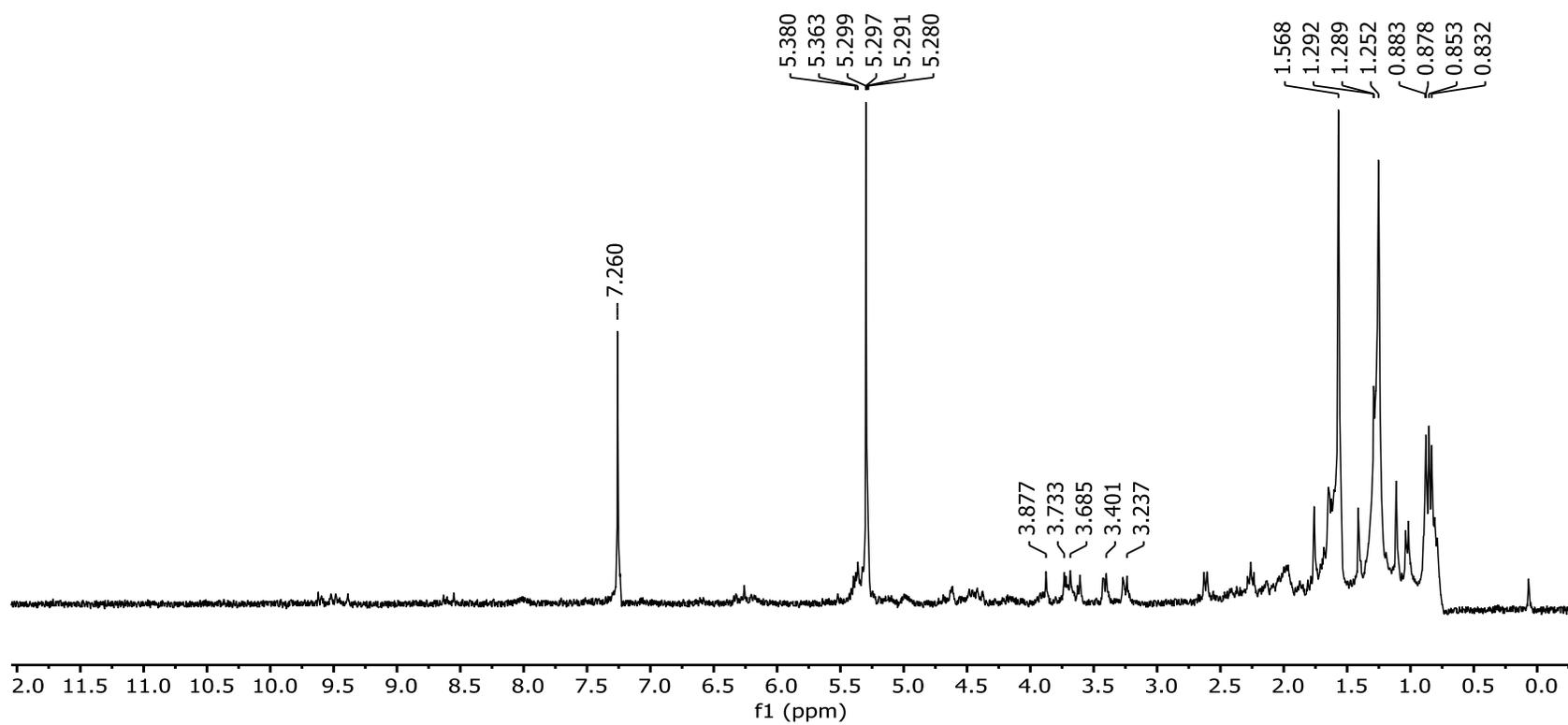


Figura 19. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de la fracción CB-DDCM-C (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz).

1  
1H\_CB-DDCM-D\_CBB

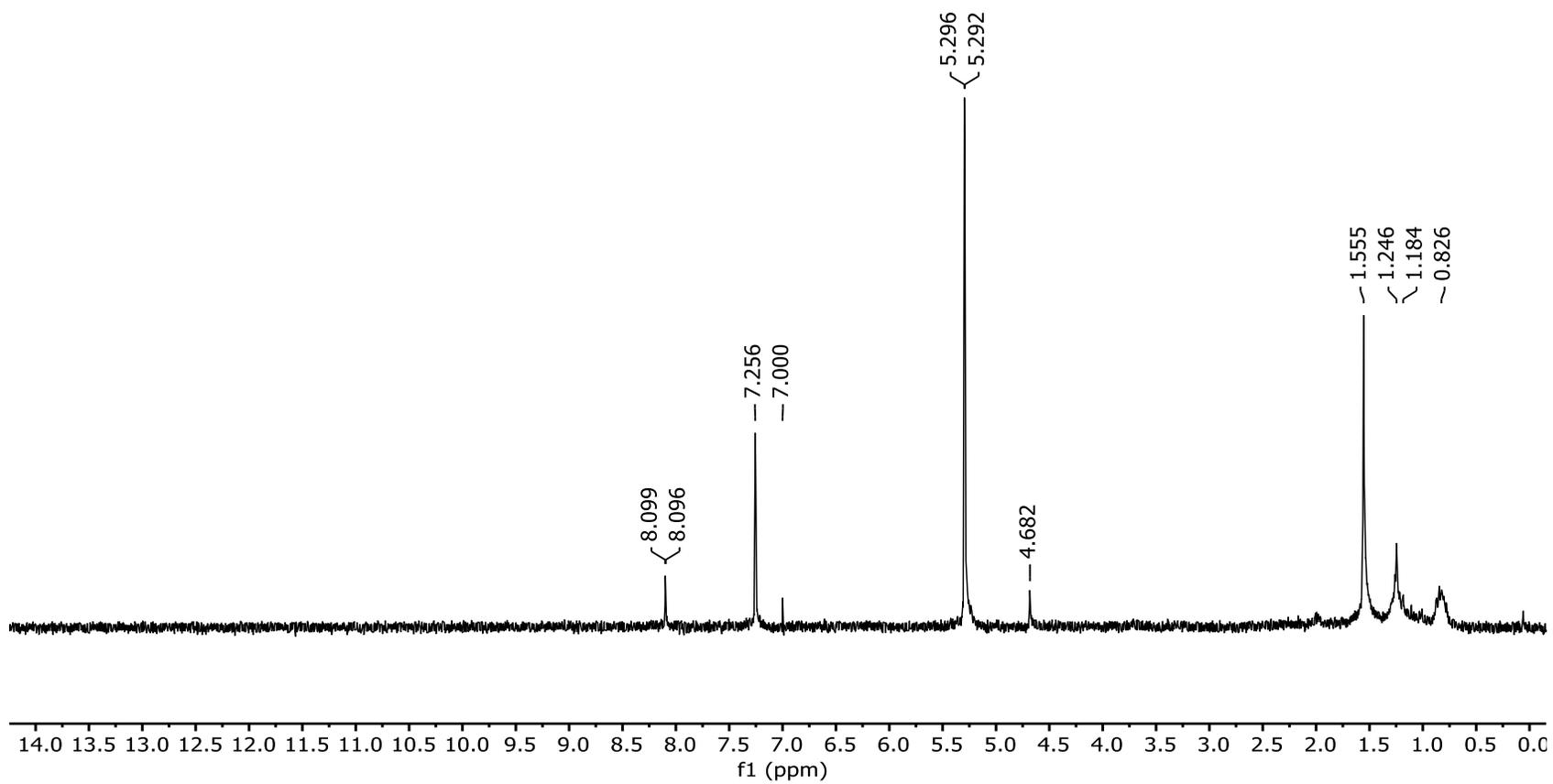
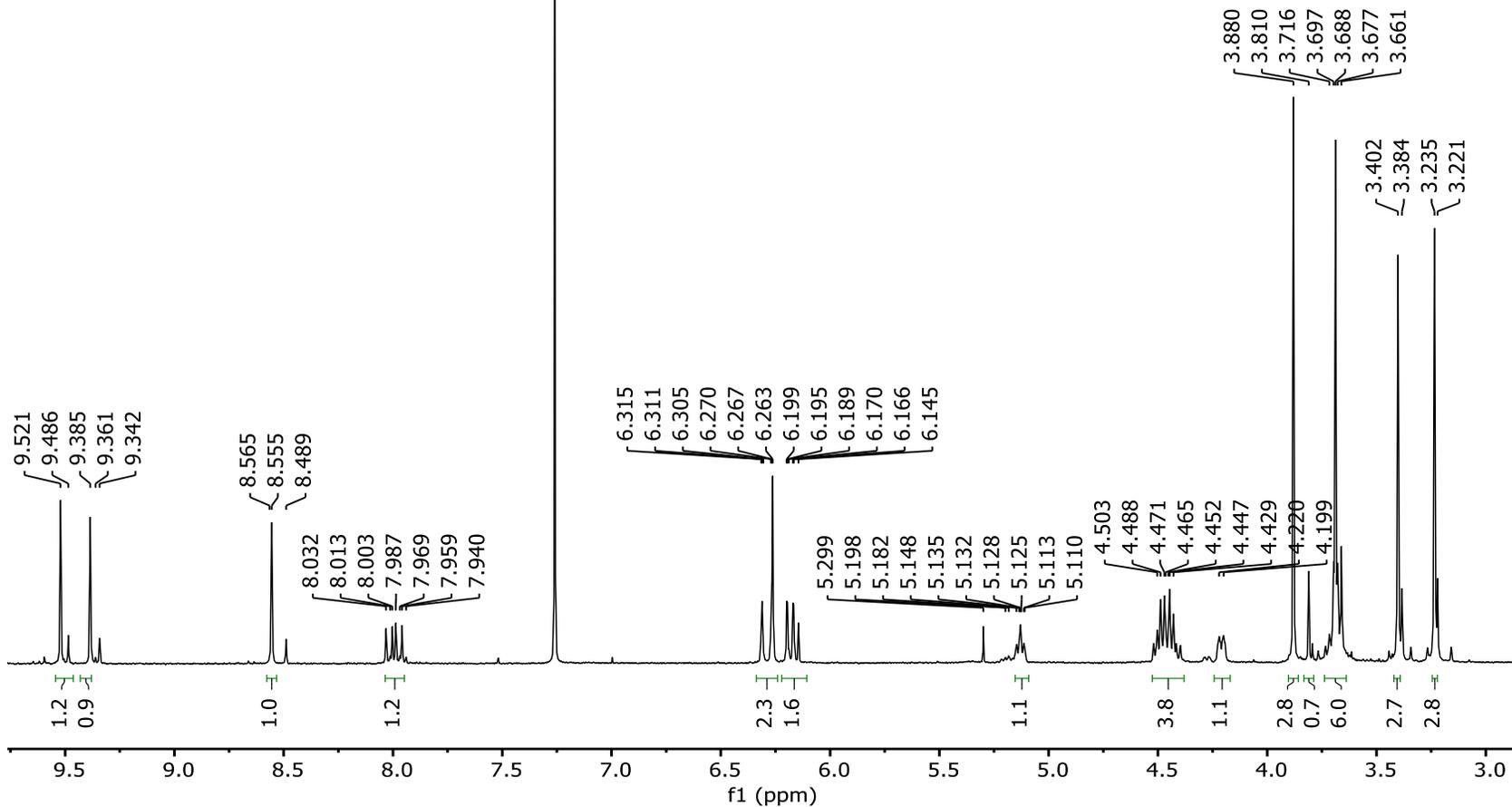
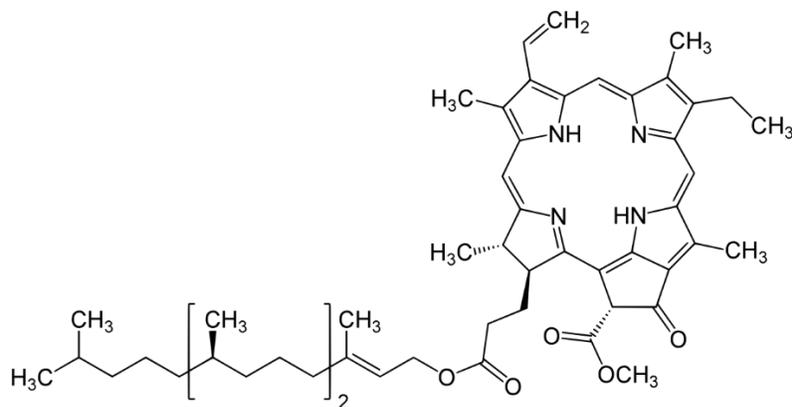


Figura 20. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de la fracción CB-DDCM-D (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz).

CB-DDCM-Bb.10.fid  
 Instituto de Química, UNAM / C. Bustos  
 CB-DDCM-Bb  
 Dr. Baldomero Esquivel/Celia Bustos  
 Disolvente: CDCl<sub>3</sub>  
 Hidrogeno-1  
 Bruker Avance III 400 MHz (H)  
 13-septiembre-2021  
 Sonda: BBO 400S1 BBF-H-D-05Z



**Figura 21.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto CB-DDCM-Bb (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).



**Figura 22.** Estructura química de la feofitina A.

## 8. Discusión

Según la OMS, el cáncer sigue siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo, con casi 10 millones de fallecimientos en el año 2020, lo que genera un importante problema de salud pública a nivel mundial, ya que causa grandes pérdidas de vidas humanas y de recursos económicos (GLOBOCAN, 2022). A pesar de los esfuerzos de investigación realizados durante las últimas décadas, las cifras de incidencia y mortalidad por cáncer siguen en aumento. En ese sentido, se ha propuesto una amplia gama de enfoques experimentales en los últimos años para abordar los desafíos asociados con el desarrollo y progresión del cáncer; sin embargo, en su mayor parte, estos han dado como resultado avances marginales, por lo que se requiere la búsqueda de nuevos compuestos biológicamente activos que representen una estrategia prometedora para el desarrollo de agentes terapéuticos utilizados en el tratamiento contra esta enfermedad.

Las cianobacterias han sido identificadas como uno de los grupos de organismos más prometedores a partir de los cuales se pueden aislar nuevos productos naturales estructuralmente diversos y biológicamente activos, con beneficios potenciales contra el cáncer (Shah et al., 2017; Tan & Phyto, 2020). Algunos de los compuestos de cianobacterias y sus análogos se han utilizado con éxito en los ensayos clínicos contra el cáncer (Khalifa et al., 2021; Qamar et al., 2021). Cabe señalar que el potencial de las cianobacterias marinas como agentes anticancerígenos ha sido el más explorado a nivel experimental en busca de la

generación de patentes en el área de salud y la industria farmacéutica, dejando abierta la posibilidad de descubrir compuestos nuevos mediante la exploración de cepas de cianobacterias de géneros y hábitats inexplorados. Con ello se abre todo un campo innovador que requiere una exhaustiva labor científica e investigación interdisciplinaria para proponer nuevas aproximaciones terapéuticas en el área oncológica.

Alentados por la capacidad casi ilimitada de las cianobacterias para generar compuestos novedosos, y con base en los antecedentes de las capacidades citotóxicas de dichos compuestos, en este estudio se evaluó la citotoxicidad de extractos provenientes de una cianobacteria poco explorada del género *Dolichospermum* con la finalidad de encontrar moléculas con propiedades antiproliferativas importantes para el desarrollo de quimioterapéuticos novedosos, específicos y eficaces.

*Dolichospermum* es un género de cianobacterias que causa florecimientos ubicuos, anteriormente considerado parte del género *Anabaena*. El género *Anabaena* contenía cepas bentónicas y planctónicas que constituían entidades filogenéticamente separadas, razón por la cual, desde hace más de una década, las cepas planctónicas se reclasificaron como un nuevo género al que se le denominó *Dolichospermum* (X. Li et al., 2016; Wacklin, Hoffmann, & Komárek, 2009). Este género comprende más de 40 especies de cianobacterias diazotróficas que se encuentran comúnmente en agua dulce y que contienen vesículas de gas que les permite flotar y migrar verticalmente en el agua (X. Li et al., 2016; Wacklin et al., 2009). Algunas cepas pertenecientes a este género presentan propiedades tóxicas contra diversos organismos debido a la presencia de varios tipos de toxinas (X. Li et al., 2016). Además, se sabe que diversos compuestos presentes en estos organismos tienen propiedades antibacterianas y antioxidantes (Guerreiro, Andrade, Menezes, Vilarinho, & Dias, 2020; Senousy, Abd Ellatif, & Ali, 2020; Yalcin, 2020). Sin embargo, en la actualidad existe un déficit general de la información

citotóxica de compuestos bioactivos aislados de cianobacterias de este género sobre líneas celulares de cáncer.

De acuerdo con los criterios establecidos por el Instituto Nacional del Cáncer (EE. UU.) y el protocolo de Geran, los extractos evaluados durante 48-72 h que presenten una  $CI_{50}$  <20, 21-200 y 201-500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  son considerados alta, moderada y débilmente citotóxicos, respectivamente, mientras que extractos con  $CI_{50}$  >501  $\mu\text{g}/\text{mL}$  son considerados sin citotoxicidad, siendo aquellos extractos con un  $CI_{50}$  <20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  considerados con potencial antineoplásico prometedor (Boik, 2001; Geran, Greenberg, MacDonald, Schumacher, & Abbott, 1972; Grever, Schepartz, & Chabner, 1992). Sin embargo, este umbral deriva de estudios estadísticos predictivos, por lo cual, algunos extractos considerados no prometedores bajo esos criterios podrían contener compuestos extraordinarios en una concentración demasiado baja para ser detectados.

En este estudio se realizó un cribado de actividad fijando la evaluación de los extractos sobre las líneas celulares de cáncer a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 48 h de exposición. Los resultados mostraron que los extractos de MeOH y DCM exhibieron una disminución de la viabilidad celular de manera significativa contra la línea celular RG2 de glioma murino en un 51.36% y 42.88%, respectivamente, mientras que en la línea celular C6 (glioma murino) también se observó una disminución significativa de la viabilidad, pero de manera menos pronunciada. Por otro lado, en cultivos primarios de astrocitos a la misma concentración y tiempos de exposición, los extractos de MeOH y DCM disminuyeron la viabilidad celular de manera aún menos notable en un 28.88% y 25.54%, respectivamente, mientras que en cultivos primarios de neuronas se observaron tendencias de valores de  $CI_{50}$  >200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Motivados por los hallazgos de citotoxicidad inducida por los extractos de MeOH y DCM ante las líneas celulares RG2 y C6 a concentraciones de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se decidió realizar curvas de concentración-respuesta para determinar las  $CI_{50}$  de

los extractos probados, demostrando que la actividad citotóxica y los cambios morfológicos observados eran dependientes de la concentración, siendo los extractos de DCM y MeOH moderadamente citotóxicos en la línea celular RG2 con valores de  $CI_{50}$  de  $106.70 \pm 1.75$  y  $115.07 \pm 5.66$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, mientras que la actividad citotóxica de los extractos de DCM y MeOH se consideró moderada y débilmente citotóxica en la línea celular C6 con valores de  $CI_{50}$  de  $154.82 \pm 6.57$  y  $219.07 \pm 8.42$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Es probable que esta actividad citotóxica pueda incrementarse al realizar, en un próximo estudio, un proceso de purificación de los extractos. Cabe señalar que en este estudio también se utilizaron las líneas celulares U87, U373 y A549 derivadas de glioblastoma, astrocitoma y carcinoma de pulmón humano, respectivamente. Sin embargo, los extractos evaluados no disminuyeron la viabilidad de estas líneas celulares de manera significativa a la concentración evaluada. Estos resultados podrían evidenciar las diferencias genéticas entre las líneas celulares estudiadas.

Se ha reportado que las células RG2 presentan un aumento en la expresión de *PDGF $\beta$* , *IGF-1*, *RAS*, ARNm precursor de *Erb3 / Her3* y *ciclina D2*, además de expresar un *p53* de tipo silvestre y una pérdida concurrente en la expresión del locus del gen *Cdkn2a*, mientras que las células C6 tienen un locus mutado para *Cdkn2a*, inhibiendo la expresión del ARNm de *p16* y *p19<sup>ARF</sup>*, así como un *p53* de tipo silvestre. Además, la línea C6 presenta una mayor expresión de los genes *PDGF $\beta$* , *IGF-1* y *Erb3/Her3*, así como un aumento de la expresión de *Ras* y *Rb* (Barth & Kaur, 2009; Sibenaller et al., 2005). Por su parte, aunque las células U87 y U373 se derivaron de tumores cerebrales primarios, difieren principalmente en el estado de expresión de *p53*, ya que las células U87 tienen un perfil de tipo silvestre, mientras que la expresión de *p53* en células U373 está alterado por la mutación en este gen. Sin embargo, ambas líneas celulares presentan alteraciones en la expresión de *PTEN* y *Cdkn2a*, así como una regulación positiva en varios conjuntos de genes que representan vías de señalización canónicas asociadas a genes oncogénicos, como las relacionadas con *VEGF*, *Wnt*, *PDGF*, *IGF*, *TGF* y *PI3K* (Clark et al., 2010; Ishii et al., 1999; A. Li et al., 2008; Motaln et al., 2015). De manera similar, la línea

celular A549 presenta alteraciones principalmente en *Cdkn2a*, *KRAS*, *STK11* y *SMARCA4* (Blanco et al., 2009). Estos datos sugieren que los mecanismos de citotoxicidad observados podrían ser independientes de las vías de señalización que se encuentran alteradas por la sobreexpresión de genes en común entre las líneas celulares evaluadas, como *PDGF* y *RAS*, así como de alteraciones en genes comunes como *cdkn2a*, mientras que la citotoxicidad de los extractos hacia las células RG2 y C6 podría estar mediada en parte por las características genéticas que comparten ambas líneas celulares y que difieren del resto de las líneas celulares probadas, como un aumento en la expresión de *Erb3/Her3*, y cuyas diferencias en sus niveles de expresión podrían sustentar la resistencia observada hacia los extractos.

Por otro lado, si bien está reportado que la sobreexpresión de *EGFR* es una característica común de las líneas C6 y U373, al igual que la proteína S100, (Giakoumettis, Kritis, & Foroglou, 2018), nuestros resultados mostraron una susceptibilidad diferencial entre estas líneas celulares al ser expuestas a la misma concentración y tiempo de los extractos probados de *Dolichospermum*. Estos datos también podrían sugerir que los mecanismos de citotoxicidad observados podrían ser independientes de las vías de señalización que se encuentran alteradas por la sobreexpresión de genes como *p53* y *EGFR*, los cuales difieren en el perfil de expresión del tipo silvestre y el mutado entre las células afectadas respecto a las no afectadas probadas en este estudio (Tabla 2). Sin embargo, también es importante mencionar la gran diversidad de compuestos presentes en los extractos probados de *Dolichospermum* que podrían afectar diferentes vías de señalización de manera paralela, así como el resto de las variaciones genéticas entre las células que podrían modular el efecto citotóxico final observado. Por tanto, es necesario realizar estudios de investigación adicionales para determinar los mecanismos selectivos detrás de la citotoxicidad observada entre las líneas celulares cancerosas evaluadas.

**Tabla 2.** Perfil genético comparativo de las características más importantes de las líneas celulares utilizadas en el estudio.

Perfil	RG2	C6	U87	U373	A549
EGFR sobreexpresión	-	+	-	+	-
S100 sobreexpresión	-	+	-	+	ND
Vimentina sobreexpresión	+	-	+	+	ND
GFAP sobreexpresión	-	-	-	+	ND
PDGF sobreexpresión	+	+	+	+	ND
IGF sobreexpresión	+	+	+	+	ND
Erb3/Her3 sobreexpresión	+	+	ND	ND	ND
VEGF sobreexpresión	ND	ND	+	+	ND
Wnt sobreexpresión	ND	ND	+	+	ND
TGF sobreexpresión	ND	ND	+	+	ND
PI3K sobreexpresión	ND	ND	+	+	-
p53 mutación o delección	-	-	-	+	-
Cdkn2a mutación o delección	+	+	+	+	+
PTEN mutación o delección	ND	-	+	+	ND
KRAS mutación	+	+	+	+	+

+: presencia; -: ausencia; ND: no disponible. EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; GFAP: proteína ácida fibrilar glial; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; IGF: factor de crecimiento insulínico; Erb3/Her3: receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano; VEGF:

factor de crecimiento endotelial vascular; TGF: factor de crecimiento transformante; PI3K: fosfoinositol 3-quinasa; PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa.

Actualmente, solo existe un informe en la literatura de la actividad anticancerígena de cianobacterias del género *Dolichospermum*, en el cual se evaluó la actividad citotóxica de cuatro cepas contra cuatro líneas celulares de cáncer humano. En este estudio, el extracto total de *Dolichospermum crassum* HSSASE20 mostró el mayor efecto citotóxico contra la línea celular PC3 de cáncer de próstata, Caco-2 de cáncer de colon y MCF-7 de cáncer de mama con valores de  $CI_{50}$  de 44.1, 57.9 y 41.1  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, después de 72 h de incubación, mientras que el extracto total de *Dolichospermum spiroides* HSSASE18 exhibió el mayor efecto citotóxico contra la línea celular HepG-2 de cáncer hepático con valor de  $CI_{50}$  de 48.8  $\mu\text{g/mL}$  (Senousy et al., 2020). Además, en ese mismo informe se estudió la citotoxicidad de los extractos contra células mononucleares de sangre periférica sanas (PNMCs) y se reveló que *Dolichospermum flos-aquae* HSSASE2 era la cepa más segura entre todas las estudiadas (Tabla 3). Se dedujo que la citotoxicidad observada podría atribuirse a la presencia de compuestos fenólicos y enzimas antioxidantes, así como a la presencia de metabolitos secundarios; sin embargo, tales metabolitos no fueron caracterizados.

En la literatura, los compuestos fenólicos son reconocidos por tener la capacidad de secuestrar radicales libres, lo que les atribuye un importante potencial antioxidante, además de un amplio espectro de actividades bioquímica incluyendo la anticancerígena (Jiang et al., 2021; Vakili et al., 2020). Aunque los reportes de compuestos fenólicos aislados a partir de cianobacterias de agua dulce son escasos, resultaría interesante su futura evaluación para determinar su potencial antioxidante y, en consecuencia, su probable uso como compuestos anticancerígenos.

**Tabla 3.** Actividad citotóxica reportada en la literatura de extractos de cianobacterias del género *Dolichospermum* contra diversas líneas celulares de cáncer y células control.

Muestra	Valores CI <sub>50</sub>				
	Caco-2	MCF-7	HepG-2	PC3	PBMCs
<i>Dolichospermum flos-aquae</i> HSSASE2	306	361.1	71.8	198.3	337
<i>Dolichospermum circinale</i> HSSASE14	640.4	137.5	131.2	155	52.8
<i>Dolichospermum spiroides</i> HSSASE18	124.2	94.7	48.8	293.8	277.5
<i>Dolichospermum crassum</i> HSSASE20	57.9	41.1	68.6	44.1	70.6

Evidentemente, las diferencias observadas entre las concentraciones para alcanzar valores de CI<sub>50</sub> entre nuestro estudio respecto al de Senousy y colaboradores se debe principalmente a los compuestos presentes en las cepas de *Dolichospermum* utilizadas y las líneas celulares evaluadas, puesto que cada cepa de cianobacterias podría tener determinados compuestos a una concentración particular, los cuales podrían ejercer mecanismos de acción específicos y actuar de una manera diferencial, dependiendo de las características intrínsecas de cada línea celular. Además, existen otras variables que podrían contribuir con las diferencias observadas, tales como los diferentes tiempos de evaluación y los tipos de extractos evaluados.

Por otro lado, un agente anticancerígeno ideal debería actuar únicamente contra las células tumorales; sin embargo, la gran mayoría de los agentes quimioterapéuticos utilizados actualmente en la terapia contra cáncer tienen impactos negativos significativos sobre células normales. En la investigación preclínica existen varios criterios que nos indican los niveles de seguridad de los compuestos o extractos evaluados, y uno de los más utilizados es el índice de selectividad (IS). El IS indica la capacidad de los extractos para discriminar su efecto frente a líneas celulares normales y cancerosas, y se calcula a partir de la relación de la CI<sub>50</sub> entre células control frente a células cancerosas, donde un IS  $\geq 3$ , 1-3 y  $< 1$  son considerados como alto, moderado y no selectivo, respectivamente (Onyancha, Gikonyo, Wachira, Mwitari, & Gicheru, 2018; Prayong, Barusrux, & Weerapreeyakul, 2008).

En este estudio se puede apreciar que el extracto de DCM presenta un IS >1 sobre las células RG2 y C6 respecto a los cultivos primarios de neuronas (células control), con lo cual es considerado moderadamente selectivo. Cabe destacar que el extracto de MeOH resultó menos citotóxico en cultivos primarios de neuronas respecto al extracto de DCM, y que los extractos de MeOH y DCM resultaron menos citotóxicos en los cultivos primarios de astrocitos respecto a los cultivos primarios de neuronas, por lo que los IS de estos extractos respecto a las líneas celulares control son más altos, lo cual es indicativo de mayor seguridad. Se espera que la selectividad mostrada en este estudio se incremente conforme se avanza en el desarrollo del proyecto con la evaluación de compuestos individuales, puesto que las células cancerosas presentan una mayor expresión de proteínas que podrían actuar como dianas terapéuticas de los compuestos presentes en los extractos, con lo cual se podrían tener efectos citotóxicos más significativos en células cancerosas a menores concentraciones, lo cual a su vez favorecería el desarrollo de evaluaciones posteriores en modelos murinos *in vivo*. De manera similar, los compuestos citotóxicos no selectivos podrían funcionar como andamios para la generación de nuevas moléculas o complejos nano-moleculares con una mayor selectividad y que conserven sus propiedades citotóxicas hacia células cancerosas.

Respecto a los resultados obtenidos por Senousy y colaboradores, podemos observar que el extracto total de *Dolichospermum crassum* HSSASE20, que resultó ser el más citotóxico para tres de las cuatro líneas de cáncer evaluadas, también mostró una selectividad moderada respecto a la línea celular control con valores de IS >1, mientras que el extracto total de *Dolichospermum spiroides* HSSASE18, que resultó ser el más citotóxico contra la línea celular HepG-2, exhibió un IS alto (5.6). Estos resultados podrían sugerirnos que compuestos presentes en las cianobacterias de este género presentan una selectividad moderada o alta, una característica clave para el avance en fases clínicas.

Actualmente, el enfoque experimental en la evaluación de compuestos citotóxicos consiste en aprovechar las vulnerabilidades específicas de las células

cancerosas para identificar compuestos que actúen a través de dianas terapéuticas específicas que brinden la posibilidad de desarrollar terapias dirigidas, lo cual reduciría drásticamente los efectos secundarios presentes en los quimioterapéuticos empleados actualmente. Como se ha reportado ampliamente, uno de los fármacos de primera línea para el tratamiento de las diversas neoplasias es el paclitaxel (Taxol), el cual es un antimetabólico que interfiere con los microtúbulos y es considerado uno de los medicamentos naturales contra el cáncer más exitoso (Zhu & Chen, 2019). Sin embargo, se han reportado actividades tóxicas importantes ocasionadas por este fármaco, tales como la mielosupresión y la neuropatía periférica, lo cual limita la eficacia de los regímenes de tratamiento basados en él (Marupudi et al., 2007).

En la presente investigación, el paclitaxel (PAC) se utilizó como fármaco citotóxico de referencia. La comparación de la actividad citotóxica del PAC mostró una marcada resistencia en las células cancerosas de glioma empleadas, ya que las concentraciones utilizadas para observar disminución de la viabilidad celular oscilaban en el rango de 2-2.5  $\mu\text{M}$ , mientras que en la línea celular A549 de carcinoma de pulmón presentó una disminución de la viabilidad a concentraciones de 100 nM. La actividad citotóxica del PAC fue más evidente en cultivos primarios de neuronas y astrocitos, puesto que presentaron una disminución de la viabilidad celular de 62.25% y 65.21%, respectivamente, a concentraciones de 2  $\mu\text{M}$ , denotando una elevada capacidad tóxica sobre células normales. Nuestros resultados son consistentes con la neurotoxicidad del PAC reportada por Cetin y colaboradores, en la que las células neuronales de rata cultivadas expuestas a concentraciones de 0.1 y 0.01  $\mu\text{M}$  de PAC indujeron pérdida de la viabilidad celular en un 26.6 % y 28.5%, respectivamente (Cetin, Hacimuftuoglu, Tatar, Turkez, & Togar, 2016). De manera similar a nuestros hallazgos, Chen y colaboradores reportaron una disminución de la viabilidad celular y un aumento en la proporción de células apoptóticas en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal expuestas *in vitro* al PAC (C. Chen et al., 2017). De acuerdo con estos resultados, la neurotoxicidad inducida por el PAC es un problema relevante por sus efectos

secundarios adversos asociados con el tratamiento de diversas neoplasias, en especial aquellas derivadas del sistema nervioso como son los gliomas.

Los gliomas son un conjunto de tumores cerebrales primarios que se forman en las células gliales del cerebro y representan el 81% de las neoplasias cerebrales malignas, siendo el glioblastoma multiforme (GBM) el subtipo de glioma más frecuente y letal (Alifieris & Trafalis, 2015; Ostrom et al., 2014). Se ha reportado ampliamente que los GBM representan una causa importante de mortalidad debido a sus características intrínsecas que lo vuelven altamente agresivo, tales como su alta invasividad, su alta capacidad angiogénica, su recurrencia frecuente, su heterogeneidad intratumoral y la presencia de células madre de glioblastoma (GSC) altamente resistentes, lo que provoca un pronóstico desfavorable con una mediana de supervivencia de 12 a 15 meses y una tasa de supervivencia media de solo 3.3% a 2 años y 1.2% a 3 años (Alifieris & Trafalis, 2015; Furnari et al., 2007). A pesar de los continuos avances quirúrgicos y quimioterapéuticos en la medicina moderna, los GBM siguen presentando respuestas generalmente deficientes a todas las modalidades terapéuticas. Actualmente, la resección quirúrgica combinada con radioterapia y el fármaco temozolamida (TMZ) constituye la terapia estándar para los pacientes con estas neoplasias. Sin embargo, este tratamiento solo prolonga la supervivencia del paciente en cortos períodos de tiempo, presentándose frecuentemente efectos secundarios adversos de importancia para el paciente y su calidad de vida (Alifieris & Trafalis, 2015). Por lo tanto, el desarrollo de terapias para el tratamiento eficaz del GBM sigue siendo uno de los desafíos más urgentes en la terapia contra el cáncer.

Los reportes de moléculas aisladas a partir de cianobacterias que actúen contra líneas celulares de GBM son escasos. Hau y colaboradores evaluaron la molécula coibamida A contra células U87-MG y SF-295, observando una citotoxicidad dependiente de la concentración y el tiempo, con una concentración media máxima efectiva (CE<sub>50</sub>) de 28.8 y 96.2 nM, respectivamente (Hau et al., 2013). Por otro lado, la dolastatin 16 y el largazol exhibieron actividades citotóxicas

contra la línea celular SF-295 con valores de  $CI_{50}$  de 5.2 ng/mL y 68 nM, respectivamente, mientras que el largazol también exhibió actividad citotóxica contra la línea celular SF-268 con un valor de  $CI_{50}$  de 62 nM (Al-Awadhi et al., 2020; Pettit et al., 1997).

En este trabajo, hemos demostrado la actividad citotóxica y antiproliferativa de los extractos de MeOH y DCM de *Dolichospermum* sp. sobre dos líneas celulares de glioma. A pesar de que ambas líneas celulares son derivadas de gliomas murinos, presentan la expresión de genes afectados y estrategias de evasión inmunitarias similares a las del GBM humano (Barth & Kaur, 2009; Giakoumettis et al., 2018; Sibenaller et al., 2005). Además, la línea celular C6 es un modelo que en general puede simular la alta tasa de crecimiento, la alta vascularización y el carácter altamente infiltrativo del GBM en modelos *in vivo*, mientras que la línea celular RG2 se considera un modelo más agresivo e invasivo para el estudio del GBM (Giakoumettis et al., 2018). Por lo tanto, ambas líneas celulares proporcionan un modelo de GBM eficaz, reproducible y extrapolable.

Recientemente se ha demostrado que las células RG2 tienen una alta capacidad para formar esferoides, además de elevar la expresión de marcadores asociados con las células madre como ALDH, ABCG2, CXCR4, Nestin y Msi, lo que sugiere que las células RG2 tienen una población parecida a las GSC (Lee et al., 2013). En este estudio hemos demostrado que la exposición de las células RG2 a los extractos de MeOH y DCM de *Dolichospermum* sp. a las diferentes concentraciones sub-citotóxicas evaluadas originan la formación de esferoides, posiblemente como una respuesta de adaptación al estrés inducido por los compuestos presentes en los extractos sobre las células cancerosas. Sin embargo, a concentraciones citotóxicas se observó una disminución en el número de esferoides formados, así como pérdida de funcionalidad de los mismos indicada por una marcada disminución de interconexiones entre las mismas células cancerosas, presencia de cuerpos celulares redondeados en la periferia de los esferoides, reducción de proyecciones plasmáticas celulares y pérdida de incorporación del

colorante rojo neutro. Estos hallazgos son significativos, puesto que los compuestos presentes en los extractos de DCM y MeOH podrían representar una estrategia prometedora para el tratamiento de GBM, ya que diversos estudios han sugerido que dirigirse a las GSC puede reducir la recurrencia del tumor y mejorar sustancialmente el tratamiento de GBM (Alifieris & Trafalis, 2015). Sin embargo, es necesario identificar y evaluar los compuestos purificados para definir su potencial como agentes antineoplásicos para el tratamiento de este padecimiento.

Por otro lado, el tipo de muerte celular inducida por los compuestos citotóxicos es crucial en la terapia contra el cáncer, siendo la apoptosis relevante en comparación con la necrosis, ya que ocurre como un proceso coordinado que no implica inflamación, mientras que la necrosis está asociada a la generación de una respuesta inflamatoria que podría promover por sí misma el proceso de carcinogénesis (Goldar, Khaniani, Derakhshan, & Baradaran, 2015; Hanahan & Weinberg, 2011; Letai, 2017). Por su parte, la autofagia podría presentar un efecto paradójico, ya que mantener la supervivencia de células neoplásicas puede promover el crecimiento de tumores establecidos (Rybczyńska & Lisiak, 2014; Swiderek & Strządała, 2013).

Las células apoptóticas desarrollan alteraciones morfológicas típicas que permiten su identificación, tales como presentar un tamaño menor al normal y un citoplasma denso con orgánulos más delgados, así como alteraciones nucleares visibles, como fragmentación nuclear y condensación de cromatina. Además de las alteraciones morfológicas, se pueden identificar algunas otras alteraciones moleculares asociadas a la apoptosis como la alteración en la expresión de proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas (Goldar et al., 2015; Letai, 2017). En el presente estudio, el efecto de los extractos de MeOH y DCM sobre la muerte celular se caracterizó por cambios morfológicos observados por microscopía de fluorescencia utilizando la tinción NA/BE. Los resultados mostraron que las células RG2 y C6 expuestas a los extractos de MeOH y DCM exhibieron características morfológicas particulares de células apoptóticas como condensación de cromatina

y fragmentación nuclear, así como la formación de cuerpos apoptóticos y protuberancias en la membrana plasmática. Estos hallazgos sugieren que los extractos probados de *Dolichospermum* sp. probablemente indujeron la muerte celular de tipo apoptosis en estas líneas celulares de glioma, lo cual podría estar relacionado con la detención del ciclo celular mediada por p53, las disfunciones mitocondriales y daño oxidativo, y/o las alteraciones en la cascada de caspasas. Sin embargo, es necesario realizar estudios moleculares para corroborar la inducción de este tipo de muerte celular y sus mecanismos asociados.

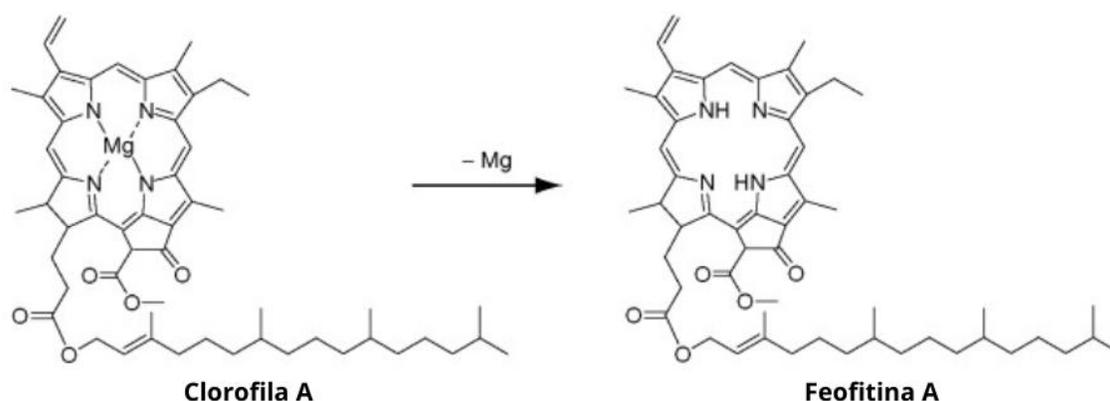
Recientemente se han publicado numerosos datos referentes a diversos aspectos de los metabolitos de las cianobacterias, especialmente de aquellos compuestos biológicamente activos aislados de cianobacterias marinas. Sin embargo, en cianobacterias terrestres y de agua dulce también se han reportado moléculas con actividades farmacológicas importantes; por ejemplo, las criptoficinas, las escitoficinas, las ciclamidas y las calotrixinas (Chlipala, Mo, & Orjala, 2011). También se ha demostrado recientemente que algunas cepas del género *Dolichospermum* presentan agrupaciones de genes biosintéticos que pueden originar metabolitos secundarios como las anabaenopeptinas, las anabaenopeptilidas, las hasalidinas, las aeruginosinas, las anaciclámidas, las geosmina, las microviridinas y las pseudoespumiginas, así como toxinas, tales como las microcistinas, las anatoxinas, las saxitoxinas y la cilindrospermopsina (Akcaalan et al., 2014; X. Li et al., 2016; Österholm, Popin, Fewer, & Sivonen, 2020; Spoo, Błaszczuk, Meriluoto, Cegłowska, & Mazur-Marzec, 2016). Cabe mencionar que en el presente estudio no se han identificado tales metabolitos.

El análisis químico reveló que el extracto de CB-DDCM está compuesto por ácidos grasos con cadenas de grandes longitudes e insaturaciones. Además, se observó la presencia de dos grupos de señales simples en el espectro característicos de compuestos denominados feofitinas. Respecto al extracto de CB-DMeOH, la RMN <sup>1</sup>H mostró las señales características para los ácidos grasos, los cuales constituyen los compuestos mayoritarios en el extracto, además de señales

que podrían corresponder a azúcares, aminoácidos, inositoles o a algún otro componente altamente oxigenado. Adicionalmente, el espectro de la fracción CB-DDCM-A indicó que está compuesto principalmente por ácidos grasos, mientras que en el espectro de la fracción CB-DDCM-B se observó la presencia de ácidos grasos y las señales características de una feofitina. Particularmente, el espectro de la fracción CB-DDCM-C reveló la presencia de señales que podrían corresponder a alcoholes con grandes longitudes de cadena, mientras que en el espectro de la fracción CB-DDCM-D solo se observaron señales que podrían corresponder a alcoholes o ácidos de cadenas largas. Cabe destacar que, actualmente, el análisis de la CG-EM para la identificación de los ácidos grasos se encuentra en proceso y que se intentará separar el extracto de CB-DMeOH por columna abierta en gel de sílice modificada con grupos amino con el fin de identificar los componentes y posteriormente realizar una separación por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Asimismo, el espectro de la subfracción CB-DDCM-Bb mostró que se trata de un compuesto con una pureza de 83% que muy probablemente corresponde a la feofitina A. Este compuesto identificado por medio de RMN  $^1\text{H}$  debe ser corroborado mediante experimentos adicionales de RMN  $^1\text{H}$  mono y heteronucleares, así como mono y bidimensionales, o en su defecto RMN  $^{13}\text{C}$  para tener un comparativo de desplazamientos de carbono que valide nuestros datos. De igual manera, la purificación de este compuesto es necesaria para su futura evaluación citotóxica contra las líneas celulares de cáncer que resultaron sensibles al extracto para determinar si la actividad citotóxica observada en el presente estudio puede ser atribuida a este metabolito o si es el resultado conjunto de otros compuestos presentes en el extracto. Además, considerando que a partir de 42.4 mg del extracto de DCM de *Dolichospermum* sp. se obtuvieron alrededor de 7.2 mg del compuesto que posiblemente es feofitina A (con un cierto grado de pureza), resultaría importante estimar los rendimientos que se podrían obtener de este recurso para fomentar futuras investigaciones y el manejo adecuado del mismo.

Las clorofilas son una familia de pigmentos esenciales para la fotosíntesis y son ubicuas entre los organismos fotoautótrofos, incluidas las cianobacterias. Estos compuestos comprenden un anillo de porfirina, también denominado tetrapirrol, y una cadena hidrófoba de fitol. La clorofila A, la clorofila más ampliamente distribuida en la naturaleza, pasa por una serie de alteraciones estructurales de manera natural que conducen a la formación de feofórbidos y feofitinas libres de magnesio, así como derivados de metaloclorofila (Figura 23) (Freitas et al., 2019). A lo largo de los años, la clorofila A ha sido la molécula más estudiada respecto a la feofitina A, sin embargo, se ha demostrado que la feofitina A presenta propiedades antibacterianas, antivirales, antiinflamatorias, antioxidantes y antimutagénicas, así como la capacidad de estimular la neurodiferenciación (Chan et al., 2018; Ferruzzi, Böhm, Courtney, & Schwartz, 2002; Ina, Hayashi, Nozaki, & Kamei, 2007; Kapewangolo, Kandawa-Schulz, & Meyer, 2017; Sathyanathan et al., 2016; Wang et al., 2009).



**Figura 23.** Degradación de la clorofila A en la feofitina A.

Desafortunadamente, existen muy pocos datos publicados en la literatura que describan los efectos anticancerígenos de la feofitina A. Higashi-Okai y colaboradores sugirieron que la feofitina A de la fracción no polifenólica del té verde posee potentes actividades supresoras contra la promoción de tumores en la piel de ratón (Higashi-Okai, Otani, & Okai, 1998), mientras que Vanková y colaboradores demostraron la citotoxicidad marginal de la feofitina A contra la línea celular PaTu-8902 de cáncer de páncreas (Vaňková et al., 2018). En ese mismo estudio, la

feofitina A disminuyó la producción mitocondrial de superóxido en las células de cáncer de páncreas tratadas a concentraciones de 10  $\mu\text{M}$ . Además, se observaron proporciones aumentadas de glutatión reducido en las células de cáncer de páncreas, lo que sugiere una producción atenuada de oxidantes intracelulares. Recientemente, Shailaja y colaboradores demostraron que la feofitina A exhibió actividad citotóxica con valores de  $\text{CI}_{50}$  de  $22.9 \pm 5.8 \mu\text{M}$  contra la línea celular A549 de carcinoma de pulmón, mientras que presentó alta selectividad contra las células Vero no cancerosas ( $\text{CI}_{50}$   $183.6 \pm 1.92 \mu\text{M}$ ). Además, las células A549 expuestas a la feofitina A mostraron una inhibición de la migración celular, un arresto en la fase S del ciclo celular, un ADN fragmentado y un potencial de membrana mitocondrial reducido. En ese mismo estudio, la feofitina A indujo la expresión de ARNm de genes relacionados con la apoptosis (BAX y BAD), mientras que redujo los niveles de ARNm de genes metastásicos (MMP-2 y VEGF). Las herramientas *in silico* indicaron que el compuesto se une a la proteína translocadora mitocondrial humana (TSPO) con alta eficacia, lo que conduce al colapso del potencial de membrana mitocondrial y la promoción de la apoptosis (Shailaja et al., 2019).

Adicionalmente, Yaacob y colaboradores demostraron que una fracción de *Strobilanthes crispus* que contenía feofitina A y otros compuestos exhibió citotoxicidad contra las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 de cáncer de mama, además de generar una acción antitumoral en un modelo de tumor mamario de rata inducido por N-metil nitrosourea (NMU). Sin embargo, en comparación con la fracción activa, la evaluación de feofitina A de forma individual mostró una citotoxicidad mucho más débil en la línea celular MCF-7, lo que indica que este compuesto puede no contribuir directamente al efecto de muerte celular de la fracción activa (Yaacob, Yankuzo, Devaraj, Wong, & Lai, 2015). De manera similar, Fang y colaboradores evaluaron la citotoxicidad de la feofitina A aislada del alga parda *Homoeostrichus formosana* contra la línea celular de cáncer hepático HepG2, demostrando que la feofitina A era inactiva con valores  $\text{CI}_{50} > 50 \mu\text{M}$  (Fang et al., 2015).

En el presente estudio, el extracto de DCM, probablemente enriquecido con la feofitina A, mostró actividad citotóxica contra las células RG2 y C6, mientras que no presentó actividad contra las células A549, U87 y U373. Estos hallazgos, junto con los reportados en la literatura, sugieren que el efecto citotóxico mediado por la feofitina A podría ser específico hacia diversas células cancerosas. Así mismo, las diferencias observadas entre la citotoxicidad del extracto de DCM probablemente enriquecido con la feofitina A presentada en este estudio respecto a los resultados de citotoxicidad de Shailaja y colaboradores sobre la línea celular A549 podrían estar relacionados con la cantidad de feofitina A utilizada para las evaluaciones, así como las diversas actividades antagónicas del resto de los compuestos presentes en el extracto de DCM probado. De igual manera, Shailaja y colaboradores demostraron la alta selectividad de la feofitina A, por lo que la moderada selectividad del extracto de DCM hacía cultivos primarios en nuestro estudio podría estar mediada por otros compuestos presentes en el extracto.

Por otro lado, es bien sabido que la respuesta inflamatoria puede contribuir al proceso de carcinogénesis al suministrar moléculas bioactivas al microambiente tumoral, incluidos factores de crecimiento, factores de supervivencia, factores pro-angiogénicos y enzimas modificadoras de la matriz extracelular, así como sustancias químicas, en particular especies reactivas de oxígeno, que son altamente mutagénicas para las células cancerosas cercanas, ya que aceleran su evolución genética hacia estados de malignidad más agresivos (Hanahan & Weinberg, 2011). En ese sentido, se ha demostrado que la feofitina A presenta propiedades antiinflamatorias importantes, tales como la supresión de la activación de NF- $\kappa$ B, a través del bloqueo de su translocación nuclear y la disminución de la expresión de p65, en la microglía; la supresión de la vía de señalización del IFN tipo I, a través de la inhibición de mediadores de señalización como STAT-1 e IRF-1, en la microglía; la supresión de la producción de NO, PGE2 e IL-1 $\beta$ , a través de la inhibición de la vía ERK1/2-STAT-1 y la inhibición de la expresión de la proteína iNOS y COX-2, en macrófagos; y la supresión de la liberación de elastasa por los neutrófilos; entre otras (Chan et al., 2018; Islam et al., 2013; Lin et al., 2014; Park et

al., 2014). Además de sus propiedades antiinflamatorias, la feofitina A también presenta propiedades antioxidantes importantes, por lo que se le ha considerado un agente abundantemente disponible y prometedor para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la inflamación y las enfermedades relacionadas (Brun et al., 2021; Hsu, Chao, Hu, & Yang, 2013; Lanfer-Marquez, Barros, & Sinnecker, 2005; Radman et al., 2021).

Por tanto, las propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y citotóxicas de la feofitina A reportadas en la literatura la postulan como un compuesto prometedor para la prevención y el tratamiento del cáncer. De confirmarse la actividad citotóxica de la feofitina A en su forma pura contra las células cancerosas utilizadas en este estudio y dada su naturaleza no tóxica, así como su amplia distribución, su fácil extracción y la buena absorción por vía oral de las clorofilas y sus derivados (K. Chen & Roca, 2018; Fernandes et al., 2021; Shailaja et al., 2019; Viera et al., 2018), se podría pensar en avanzar en el desarrollo de este estudio al evaluar la actividad anticancerígena del compuesto en modelos murinos, y determinar la expresión de TSPO en las células evaluadas para definir si la modulación en su expresión está relacionada con la selectividad del compuesto. De manera similar, la identificación del resto de compuestos presentes en los extractos evaluados, y la determinación de sus propiedades citotóxicas, podría contribuir al descubrimiento de nuevas moléculas de importancia para el desarrollo de agentes antineoplásicos, además de contribuir a la ecología química de las cianobacterias de agua dulce, organismos que a la fecha han sido escasamente explorados y explotados como fuente natural de compuestos de importancia médica y farmacéutica.

## **9. Conclusiones**

Debido a la gran diversidad química y sus propiedades bioactivas, los metabolitos secundarios producidos a partir de cianobacterias pueden constituir una fuente eficaz de nuevas estructuras químicas para el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos. En el presente estudio demostramos que los extractos de DCM y MeOH de *Dolichospermum* sp. presentan una moderada actividad citotóxica y

antiproliferativa en las líneas celulares de glioma RG2 y C6 de manera dependiente de la concentración, mientras que en cultivos primarios de neuronas y astrocitos presentan moderada selectividad. Estos hallazgos sugieren que algunos metabolitos secundarios presentes en estos extractos pueden representar una estrategia para el desarrollo de fármacos quimioterapéuticos utilizados para el tratamiento de GBM debido a su potencial como agentes anticancerígenos y bajos efectos neurotóxicos. Sin embargo, se requieren más estudios sobre los componentes activos y sus mecanismos de acción para una evaluación adecuada de sus propiedades quimioterapéuticas. De igual manera, las conclusiones e implicaciones generadas en este estudio hacen referencia a modelos *in vitro*. Por consiguiente, es recomendable iniciar investigaciones en modelos animales para validar y escalar nuestros resultados y con ello determinar su potencial empleo como fármacos anticancerígenos novedosos y prometedores.

Este estudio representa el primer informe, por parte de investigaciones mexicanas y el segundo a nivel mundial, de las propiedades citotóxicas de compuestos presentes en cianobacterias del género *Dolichospermum*. Por lo tanto, la nueva información generada y su uso como premisa en futuras investigaciones podría favorecer el desarrollo de mayor investigación en esta área poco explorada, que permita identificar y evaluar metabolitos secundarios aislados a partir de estos organismos y que sean relevantes para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos, además de sentar un precedente para el aprovechamiento de este recurso acuático, con el propósito de fomentar su explotación y minimizar el impacto negativo con el que se le ha categorizado por su capacidad para crear florecimientos algales nocivos en diversos ecosistemas.

## 10. Bibliografía

- Akcaalan, R., Köker, L., Oğuz, A., Spoofo, L., Meriluoto, J., & Albay, M. (2014). First report of cylindrospermopsin production by two cyanobacteria (*Dolichospermum mendotae* and *Chrysochlorium ovalisporum*) in Lake Iznik, Turkey. *Toxins*, 6(11), 3173-3186.
- Al-Awadhi, F. H., Salvador-Reyes, L. A., Elsadek, L. A., Ratnayake, R., Chen, Q.-Y., & Luesch, H. (2020). Largazole is a brain-penetrant class I HDAC inhibitor with extended applicability to glioblastoma and CNS Diseases. *ACS Chem. Neurosci.*, 11(13), 1937-1943.
- Alifieris, C., & Trafalis, D. T. (2015). Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol. Ther.*, 152, 63-82.
- Andrianasolo, E. H., Gross, H., Goeger, D., Musafija-Girt, M., McPhail, K., Leal, R. M., . . . Gerwick, W. H. (2005). Isolation of swinholide A and related glycosylated derivatives from two field collections of marine cyanobacteria. *Org. Lett.*, 7(7), 1375-1378.
- Assi, R., Masri, N., Abou Dalle, I., El-Cheikh, J., Ghanem, H., & Bazarbachi, A. (2021). Polatuzumab vedotin: Current role and future applications in the treatment of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Clin. Hematol. Int.*, 3(1), 21-26.
- Barth, R. F., & Kaur, B. (2009). Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: The C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. *J. Neuro-Oncol.*, 94(3), 299-312.
- Bláha, L., Babica, P., & Maršálek, B. (2009). Toxins produced in cyanobacterial water blooms—toxicity and risks. *Interdiscip. Toxicol.*, 2(2), 36.
- Blanco, R., Iwakawa, R., Tang, M., Kohno, T., Angulo, B., Pio, R., . . . Sanchez-Céspedes, M. (2009). A gene-alteration profile of human lung cancer cell lines. *Hum. Mutat.*, 30(8), 1199-1206.
- Boik, J. (2001). *Natural compounds in cancer therapy* (Vol. 851): Oregon Medical Press Princeton, MN.
- Bowers, A., West, N., Taunton, J., Schreiber, S. L., Bradner, J. E., & Williams, R. M. (2008). Total synthesis and biological mode of action of largazole: A potent

- class I histone deacetylase inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* , 130(33), 11219-11222.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: Cancer J. Clin.*, 68(6), 394-424.
- Brun, P., Piovan, A., Caniato, R., Dalla Costa, V., Pauletto, A., & Filippini, R. (2021). Anti-inflammatory activities of *Euglena gracilis* extracts. *Microorganisms*, 9(10), 2058.
- Buratti, F. M., Manganelli, M., Vichi, S., Stefanelli, M., Scardala, S., Testai, E., & Funari, E. (2017). Cyanotoxins: Producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Arch. Toxicol.*, 91(3), 1049-1130.
- Carmely, S., & Kashman, Y. (1985). Structure of swinholide-A, a new macrolide from the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Tetrahedron lett.*, 26(4), 511-514.
- Catassi, A., Cesario, A., Arzani, D., Menichini, P., Alama, A., Bruzzo, C., . . . Russo, P. (2006). Characterization of apoptosis induced by marine natural products in non small cell lung cancer A549 cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63(19), 2377-2386.
- Cetin, D., Hacimuftuoglu, A., Tatar, A., Turkez, H., & Togar, B. (2016). The in vitro protective effect of salicylic acid against paclitaxel and cisplatin-induced neurotoxicity. *Cytotechnology*, 68(4), 1361-1367.
- Chan, Y.-Y., Wang, C.-Y., Hwang, T.-L., Juang, S.-H., Hung, H.-Y., Kuo, P.-C., . . . Wu, T.-S. (2018). The constituents of the stems of *Cissus assamica* and their bioactivities. *Molecules*, 23(11), 2799.
- Chen, C., Bai, X., Bi, Y., Liu, G., Li, H., Liu, Z., & Liu, H. (2017). Insulin-like growth factor-1 attenuates apoptosis and protects neurochemical phenotypes of dorsal root ganglion neurons with paclitaxel-induced neurotoxicity in vitro. *Nutr. Neurosci.*, 20(2), 89-102.
- Chen, K., & Roca, M. (2018). *In vitro* bioavailability of chlorophyll pigments from edible seaweeds. *J. Funct. Foods*, 41, 25-33.

- Chlipala, G. E., Mo, S., & Orjala, J. (2011). Chemodiversity in freshwater and terrestrial cyanobacteria-a source for drug discovery. *Curr. Drug Targets*, 12(11), 1654-1673.
- Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P., & Kaina, B. (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, 193(1-2), 3-34.
- Clark, M. J., Homer, N., O'Connor, B. D., Chen, Z., Eskin, A., Lee, H., . . . Nelson, S. F. (2010). U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. *PLoS Genet.*, 6(1), e1000832.
- Corbel, S., Mougín, C., & Bouaïcha, N. (2014). Cyanobacterial toxins: modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere*, 96, 1-15.
- Costa, F. F. (2010). Epigenomics in cancer management. *Cancer Manag. Res.*, 2, 255-265.
- Costa, M., Costa-Rodrigues, J., Fernandes, M. H., Barros, P., Vasconcelos, V., & Martins, R. (2012). Marine cyanobacteria compounds with anticancer properties: A review on the implication of apoptosis. *Mar. Drugs*, 10(10), 2181-2207.
- Demay, J., Bernard, C., Reinhardt, A., & Marie, B. (2019). Natural products from cyanobacteria: Focus on beneficial activities. *Mar. Drugs*, 17(6), 320.
- Deng, C., Pan, B., & O'Connor, O. A. (2013). Brentuximab vedotin. *Clin. Cancer Res.*, 19(1), 22-27.
- Dhakal, D., Chen, M., Luesch, H., & Ding, Y. (2021). Heterologous production of cyanobacterial compounds. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 48(3-4), kuab003.
- Du, X., Liu, H., Yuan, L., Wang, Y., Ma, Y., Wang, R., . . . Zhang, H. (2019). The diversity of cyanobacterial toxins on structural characterization, distribution and identification: A systematic review. *Toxins*, 11(9), 530.
- Engene, N., Tronholm, A., Salvador-Reyes, L. A., Luesch, H., & Paul, V. J. (2015). *Caldora penicillata* gen. nov., comb. nov.(Cyanobacteria), a pantropical marine species with biomedical relevance. *J. Phycol.*, 51(4), 670-681.

- Fang, H.-Y., Chokkalingam, U., Chiou, S.-F., Hwang, T.-L., Chen, S.-L., Wang, W.-L., & Sheu, J.-H. (2015). Bioactive chemical constituents from the brown alga *Homoeostrichus formosana*. *Int. J. Mol. Sci.* , 16(1), 736-746.
- Fernandes, A. S., Nascimento, T. C., Pinheiro, P. N., de Rosso, V. V., de Menezes, C. R., Jacob-Lopes, E., & Zepka, L. Q. (2021). Insights on the intestinal absorption of chlorophyll series from microalgae. *Food Res. Int.* , 140, 110031.
- Ferruzzi, M., Böhm, V., Courtney, P., & Schwartz, S. (2002). Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. *J. Food Sci.*, 67(7), 2589-2595.
- Freitas, S., Silva, N. G., Sousa, M. L., Ribeiro, T., Rosa, F., Leão, P. N., . . . Urbatzka, R. (2019). Chlorophyll derivatives from marine cyanobacteria with lipid-reducing activities. *Mar. Drugs*, 17(4), 229.
- Fu, X., Do, T., Schmitz, F. J., Andrusevich, V., & Engel, M. H. (1998). New cyclic peptides from the ascidian *Lissoclinum patella*. *J. Nat. Prod.*, 61(12), 1547-1551.
- Furnari, F. B., Fenton, T., Bachoo, R. M., Mukasa, A., Stommel, J. M., Stegh, A., . . . Cavenee, W. K. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.*, 21(21), 2683-2710.
- Gao, G., Wang, Y., Hua, H., Li, D., & Tang, C. (2021). Marine antitumor peptide dolastatin 10: Biological activity, structural modification and synthetic chemistry. *Mar. Drugs*, 19(7), 363.
- Geran, R., Greenberg, N., MacDonald, M., Schumacher, A., & Abbott, B. (1972). Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems.
- Giakoumettis, D., Kritis, A., & Foroglou, N. (2018). C6 cell line: the gold standard in glioma research. *Hippokratia*, 22(3), 105.
- GLOBOCAN. (2022). Cancer today. Retrieved from <https://gco.iarc.fr/today/home>

- Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M., & Baradaran, B. (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, *16*(6), 2129-2144.
- Grachev, M., Zubkov, I., Tikhonova, I., Ivacheva, M., Kuzmin, A., Sukhanova, E., . . . Belykh, O. (2018). Extensive contamination of water with saxitoxin near the dam of the Irkutsk hydropower station reservoir (East Siberia, Russia). *Toxins*, *10*(10), 402.
- Grever, M. R., Schepartz, S. A., & Chabner, B. A. (1992). *The National Cancer Institute: cancer drug discovery and development program*. Paper presented at the Seminars in oncology.
- Gromek, S. M., deMayo, J. A., Maxwell, A. T., West, A. M., Pavlik, C. M., Zhao, Z., . . . Balunas, M. J. (2016). Synthesis and biological evaluation of santacruzamate A analogues for anti-proliferative and immunomodulatory activity. *Bioorg. Med. Chem.*, *24*(21), 5183-5196.
- Guerreiro, A., Andrade, M. A., Menezes, C., Vilarinho, F., & Dias, E. (2020). Antioxidant and cytoprotective properties of cyanobacteria: Potential for biotechnological applications. *Toxins*, *12*(9), 548.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2022. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>; searched on 10 de febrero de 2022.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, *144*(5), 646-674.
- Hau, A. M., Greenwood, J. A., Löhr, C. V., Serrill, J. D., Proteau, P. J., Ganley, I. G., . . . Ishmael, J. E. (2013). Coibamide A induces mTOR-independent autophagy and cell death in human glioblastoma cells. *PLoS One*, *8*(6), e65250.
- Higashi-Okai, K., Otani, S., & Okai, Y. (1998). Potent suppressive activity of pheophytin a and b from the non-polyphenolic fraction of green tea (*Camellia sinensis*) against tumor promotion in mouse skin. *Cancer Lett.*, *129*(2), 223-228.

- Hsu, C.-Y., Chao, P.-Y., Hu, S.-P., & Yang, C.-M. (2013). The antioxidant and free radical scavenging activities of chlorophylls and pheophytins. *Food. Nutr. Sci.*, 4(8), 1-8.
- Ina, A., Hayashi, K.-I., Nozaki, H., & Kamei, Y. (2007). Pheophytin a, a low molecular weight compound found in the marine brown alga *Sargassum fulvellum*, promotes the differentiation of PC12 cells. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 25(1), 63-68.
- Ishii, N., Maier, D., Merlo, A., Tada, M., Sawamura, Y., Diserens, A. C., & Van Meir, E. G. (1999). Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol.*, 9(3), 469-479.
- Islam, M. N., Ishita, I. J., Jin, S. E., Choi, R. J., Lee, C. M., Kim, Y. S., . . . Choi, J. S. (2013). Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Saccharina japonica* and its constituents pheophorbide a and pheophytin a in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells. *Food Chem. Toxicol.*, 55, 541-548.
- Jiang, Y., Pei, J., Zheng, Y., Miao, Y.-j., Duan, B.-z., & Huang, L.-f. (2021). Gallic acid: A potential anti-cancer agent. *Chin. J. Integr. Med.*, 1-11.
- Jones, A. C., Monroe, E. A., Eisman, E. B., Gerwick, L., Sherman, D. H., & Gerwick, W. H. (2010). The unique mechanistic transformations involved in the biosynthesis of modular natural products from marine cyanobacteria. *Nat. Prod. Rep.*, 27(7), 1048-1065.
- Kapewangolo, P., Kandawa-Schulz, M., & Meyer, D. (2017). Anti-HIV activity of *Ocimum labiatum* extract and isolated pheophytin-a. *Molecules*, 22(11), 1763.
- Kasibhatla, S., Amarante-Mendes, G. P., Finucane, D., Brunner, T., Bossy-Wetzel, E., & Green, D. R. (2006). Acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining to detect apoptosis. *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2006(3), pdb. prot4493.
- Khalifa, S. A., Shedid, E. S., Saied, E. M., Jassbi, A. R., Jamebozorgi, F. H., Rateb, M., . . . El-Seedi, H. R. (2021). Cyanobacteria—From the oceans to the potential biotechnological and biomedical applications. *Mar. Drugs*, 19(5), 241.

- Kleigrewe, K., Gerwick, L., Sherman, D. H., & Gerwick, W. H. (2016). Unique marine derived cyanobacterial biosynthetic genes for chemical diversity. *Nat. Prod. Rep.*, 33(2), 348-364.
- Kurmayer, R., Deng, L., & Entfellner, E. (2016). Role of toxic and bioactive secondary metabolites in colonization and bloom formation by filamentous cyanobacteria *Planktothrix*. *Harmful algae*, 54, 69-86.
- Lanfer-Marquez, U. M., Barros, R. M., & Sinnecker, P. (2005). Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Res. Int.*, 38(8-9), 885-891.
- Lee, C.-C., Lai, J.-H., Hueng, D.-Y., Ma, H.-I., Chung, Y.-C., Sun, Y.-y., . . . Chen, C.-L. (2013). Disrupting the CXCL12/CXCR4 axis disturbs the characteristics of glioblastoma stem-like cells of rat RG2 glioblastoma. *Cancer Cell Int.*, 13(1), 1-11.
- Letai, A. (2017). Apoptosis and cancer. *Annu. Rev. Cancer Biol.*, 1, 275-294.
- Li, A., Walling, J., Kotliarov, Y., Center, A., Steed, M. E., Ahn, S. J., . . . Fine, H. A. (2008). Genomic changes and gene expression profiles reveal that established glioma cell lines are poorly representative of primary human gliomas. *Mol. Cancer Res.*, 6(1), 21-30.
- Li, X., Dreher, T. W., & Li, R. (2016). An overview of diversity, occurrence, genetics and toxin production of bloom-forming *Dolichospermum* (*Anabaena*) species. *Harmful algae*, 54, 54-68.
- Liang, X., Luo, D., & Luesch, H. (2019). Advances in exploring the therapeutic potential of marine natural products. *Pharmacol. Res.*, 147, 104373.
- Lin, C.-Y., Lee, C.-H., Chang, Y.-W., Wang, H.-M., Chen, C.-Y., & Chen, Y.-H. (2014). Pheophytin a inhibits inflammation via suppression of LPS-induced nitric oxide synthase-2, prostaglandin E2, and interleukin-1 $\beta$  of macrophages. *Int. J. Mol. Sci.*, 15(12), 22819-22834.
- Luesch, H., Yoshida, W. Y., Moore, R. E., Paul, V. J., & Mooberry, S. L. (2000). Isolation, structure determination, and biological activity of lyngbyabellin A from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *J. Nat. Prod.*, 63(5), 611-615.

- Maderna, A., & Leverett, C. A. (2015). Recent advances in the development of new auristatins: structural modifications and application in antibody drug conjugates. *Mol. Pharm.*, 12(6), 1798-1812.
- Marquez, B. L., Watts, K. S., Yokochi, A., Roberts, M. A., Verdier-Pinard, P., Jimenez, J. I., . . . Gerwick, W. H. (2002). Structure and absolute stereochemistry of hectochlorin, a potent stimulator of actin assembly. *J. Nat. Prod.*, 65(6), 866-871.
- Marupudi, N. I., Han, J. E., Li, K. W., Renard, V. M., Tyler, B. M., & Brem, H. (2007). Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies. *Expert Opin. Drug Saf.*, 6(5), 609-621.
- Minich, S. S. (2012). Brentuximab vedotin: a new age in the treatment of Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma. *Ann. Pharmacother.*, 46(3), 377-383.
- Mondal, A., Bose, S., Banerjee, S., Patra, J. K., Malik, J., Mandal, S. K., . . . Bishayee, A. (2020). Marine cyanobacteria and microalgae metabolites—A rich source of potential anticancer drugs. *Mar. Drugs*, 18(9), 476.
- Motaln, H., Koren, A., Gruden, K., Ramšak, Ž., Schichor, C., & Lah, T. T. (2015). Heterogeneous glioblastoma cell cross-talk promotes phenotype alterations and enhanced drug resistance. *Oncotarget*, 6(38), 40998.
- Mynderse, J. S., Moore, R. E., Kashiwagi, M., & Norton, T. R. (1977). Antileukemia activity in the Oscillatoriaceae: isolation of debromoaplysiatoxin from *Lyngbya*. *Science*, 196(4289), 538-540.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2014). Marine-sourced anti-cancer and cancer pain control agents in clinical and late preclinical development. *Mar. Drugs*, 12(1), 255-278.
- Onyancha, J. M., Gikonyo, N. K., Wachira, S. W., Mwitari, P. G., & Gicheru, M. M. (2018). Anticancer activities and safety evaluation of selected Kenyan plant extracts against breast cancer cell lines. *J. Pharmacognosy Phytother.*, 10(2), 21-26.

- Österholm, J., Popin, R. V., Fewer, D. P., & Sivonen, K. (2020). Phylogenomic analysis of secondary metabolism in the toxic cyanobacterial genera *Anabaena*, *Dolichospermum* and *Aphanizomenon*. *Toxins*, *12*(4), 248.
- Ostrom, Q. T., Bauchet, L., Davis, F. G., Deltour, I., Fisher, J. L., Langer, C. E., . . . Bamholtz-Sloan, J. S. (2014). The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro-Oncol.*, *16*(7), 896-913.
- Otto, T., & Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, *17*(2), 93-115.
- Paatero, A. O., Kellosalo, J., Duniak, B. M., Almaliti, J., Gestwicki, J. E., Gerwick, W. H., . . . Paavilainen, V. O. (2016). Apratoxin kills cells by direct blockade of the Sec61 protein translocation channel. *Cell Chem. Biol.*, *23*(5), 561-566.
- Park, S., Choi, J. J., Park, B.-K., Yoon, S. J., Choi, J. E., & Jin, M. (2014). Pheophytin a and chlorophyll a suppress neuroinflammatory responses in lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$ -stimulated BV2 microglia. *Life Sci.*, *103*(2), 59-67.
- Pereira, A. R., Kale, A. J., Fenley, A. T., Byrum, T., Debonisi, H. M., Gilson, M. K., . . . Gerwick, W. H. (2012). The Carmaphycins, new proteasome inhibitors exhibiting an  $\alpha$ ,  $\beta$ -epoxyketone warhead from a marine cyanobacterium. *ChemBioChem*, *13*(6), 810-817.
- Pettit, G. R., Xu, J.-p., Hogan, F., Williams, M. D., Doubek, D. L., Schmidt, J. M., . . . Boyd, M. R. (1997). Isolation and structure of the human cancer cell growth inhibitory cyclodepsipeptide dolastatin 16. *J. Nat. Prod.*, *60*(8), 752-754.
- Prayong, P., Barusrux, S., & Weerapreeyakul, N. (2008). Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. *Fitoterapia*, *79*(7-8), 598-601.
- Qamar, H., Hussain, K., Soni, A., Khan, A., Hussain, T., & Chénais, B. (2021). Cyanobacteria as natural therapeutics and pharmaceutical potential: Role in antitumor activity and as nanovectors. *Molecules*, *26*(1), 247.
- Radman, S., Cikoš, A.-M., Flanjak, I., Babić, S., Čižmek, L., Šubarić, D., . . . Jerković, I. (2021). Less polar compounds and targeted antioxidant potential (*in vitro* and *in vivo*) of *Codium adhaerens* C. Agardh 1822. *Pharmaceuticals*, *14*(9), 944.

- Repetto, G., Del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.*, 3(7), 1125-1131.
- Rybczyńska, M., & Lisiak, N. (2014). Autophagy, new perspectives in anticancer therapy. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 68, 925-935.
- Salvador-Reyes, L. A., & Luesch, H. (2015). Biological targets and mechanisms of action of natural products from marine cyanobacteria. *Nat. Prod. Rep.*, 32(3), 478-503.
- Sathyanathan, C., Jyothirmayi, B., Sundaram, L., Abhinand, P., Eswaramoorthy, R., & Gnanambal, K. (2016). Pheophytin a isolated from the seagrass *Syringodium isoetifolium* plausibly blocks *umuC* proteins of select bacterial pathogens, *in silico*. *J. Appl. Microbiol.*, 121(6), 1592-1602.
- Senousy, H. H., Abd Ellatif, S., & Ali, S. (2020). Assessment of the antioxidant and anticancer potential of different isolated strains of cyanobacteria and microalgae from soil and agriculture drain water. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 27(15).
- Shah, S. A. A., Akhter, N., Auckloo, B. N., Khan, I., Lu, Y., Wang, K., . . . Guo, Y.-W. (2017). Structural diversity, biological properties and applications of natural products from cyanobacteria. A review. *Mar. Drugs*, 15(11), 354.
- Shailaja, V., Christina, V., Mohanapriya, C., Sneha, P., Sundaram, R. L., Magesh, R., . . . Gnanambal, K. M. E. (2019). A natural anticancer pigment, pheophytin a, from a seagrass acts as a high affinity human mitochondrial translocator protein (TSPO) ligand, *in silico*, to reduce mitochondrial membrane potential ( $\Delta \psi_{mit}$ ) in adenocarcinomic A549 cells. *Phytomedicine*, 61, 152858.
- Sherr, C. J., & Bartek, J. (2017). Cell cycle-targeted cancer therapies. *Annu. Rev. Cancer Biol.*, 1, 41-57.
- Sibenaller, Z. A., Etame, A. B., Ali, M. M., Barua, M., Braun, T. A., Casavant, T. L., & Ryken, T. C. (2005). Genetic characterization of commonly used glioma cell lines in the rat animal model system. *Neurosurg. Focus*, 19(4), 1-9.
- Simmons, T. L., Nogle, L. M., Media, J., Valeriote, F. A., Mooberry, S. L., & Gerwick, W. H. (2009). Desmethoxymajusculamide C, a cyanobacterial depsipeptide

- with potent cytotoxicity in both cyclic and ring-opened forms. *J. Nat. Prod.*, 72(6), 1011-1016.
- Sithranga Boopathy, N., & Kathiresan, K. (2010). Anticancer drugs from marine flora: an overview. *J. Oncol.*, 2010.
- Spoof, L., Błaszczyk, A., Meriluoto, J., Cegłowska, M., & Mazur-Marzec, H. (2016). Structures and activity of new anabaenopeptins produced by Baltic Sea cyanobacteria. *Mar. Drugs*, 14(1), 8.
- Sumiya, E., Shimogawa, H., Sasaki, H., Tsutsumi, M., Yoshita, K. i., Ojika, M., . . . Uesugi, M. (2011). Cell-morphology profiling of a natural product library identifies bisbromoamide and miuraenamides A as actin filament stabilizers. *ACS Chem. Biol.*, 6(5), 425-431.
- Swiderek, E., & Strządała, L. (2013). Autophagy and BNIP3 protein in tumorigenesis. *Postępy Hig. Med. Dosw.*, 67, 363-370.
- Tan, L. T., & Phyto, M. Y. (2020). Marine cyanobacteria: A source of lead compounds and their clinically-relevant molecular targets. *Molecules*, 25(9), 2197.
- Tao, Y., Li, P., Zhang, D., Glukhov, E., Gerwick, L., Zhang, C., . . . Gerwick, W. H. (2018). Samholides, swinholide-related metabolites from a marine cyanobacterium cf. *Phormidium* sp. *J. Org. Chem.*, 83(6), 3034-3046.
- Tomasi, T. B., Magner, W. J., & Khan, A. N. H. (2006). Epigenetic regulation of immune escape genes in cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, 55(10), 1159-1184.
- Tranter, D., Paatero, A. O., Kawaguchi, S., Kazemi, S., Serrill, J. D., Kellosalo, J., . . . Paavilainen, V. O. (2020). Coibamide A targets Sec61 to prevent biogenesis of secretory and membrane proteins. *ACS Chem. Biol.*, 15(8), 2125-2136.
- Vakili, S. A., George, A., Ayatollahi, S. A., Martorell, M., Ostrander, E. A., Salehi, B., . . . Sharifi-Rad, J. (2020). Phenolic compounds, saponins and alkaloids on cancer progression: Emphasis on p53 expression and telomere length. *Cell. Mol. Biol.*, 66(4), 110-119.
- Vaňková, K., Marková, I., Jašprová, J., Dvořák, A., Subhanová, I., Zelenka, J., . . . Vítek, L. (2018). Chlorophyll-mediated changes in the redox status of

- pancreatic cancer cells are associated with its anticancer effects. *Oxid. Med. Cell. Longev.* , 2018.
- Viera, I., Chen, K., Ríos, J. J., Benito, I., Pérez-Gálvez, A., & Roca, M. (2018). First-pass metabolism of chlorophylls in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* , 62(17), 1800562.
- Wacklin, P., Hoffmann, L., & Komárek, J. (2009). Nomenclatural validation of the genetically revised cyanobacterial genus *Dolichospermum* (Ralfs ex Bornet et Flahault) comb. nova. *Fottea*, 9(1), 59-64.
- Wang, S.-Y., Tseng, C.-P., Tsai, K.-C., Lin, C.-F., Wen, C.-Y., Tsay, H.-S., . . . Cheng, J.-C. (2009). Bioactivity-guided screening identifies pheophytin a as a potent anti-hepatitis C virus compound from *Lonicera hypoglauca* Miq. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 385(2), 230-235.
- Yaacob, N. S., Yankuzo, H. M., Devaraj, S., Wong, J. K. M., & Lai, C.-S. (2015). Anti-tumor action, clinical biochemistry profile and phytochemical constituents of a pharmacologically active fraction of *S. crispus* in NMU-induced rat mammary tumour model. *PLoS One*, 10(5), e0126426.
- Yalcin, D. (2020). Antibacterial activity of cyanobacteria *Dolichospermum affine* isolated from freshwater. *Aquat. Sci. Eng.*, 35(3), 83-88.
- Zhu, L., & Chen, L. (2019). Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 24(1), 1-11.