



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA Y
MATERIALES

Búsqueda de enzimas anticancerígenas obtenidas de bacterias halófilas y halotolerantes del Desierto de Atacama

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA
MENCION INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

Giannina Andrea Maya Hun

Profesora Guía:

Barbara Andrews Farrow

Profesor Co-Guía:

Juan Asenjo De Leuze De Lancizolle

Miembros de la comisión:

Pablo Caviedes Fernández

Benito Gómez Silva

Oriana Salazar Aguirre

Proyecto financiado por doctorado becas ANID 2018-21181035/

CeBiB- FB0001

SANTIAGO DE CHILE

2023

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Se prevé que para el año 2030 esta enfermedad ocupe el primer lugar como causa de muerte y aumente en más de un 33% de incidencia a nivel global, donde los países con mayor pobreza y bajo desarrollo sean los más afectados. A pesar de terapias convencionales disponibles, la necesidad de tratamientos más efectivos y dirigidos sigue siendo apremiante.

La terapia enzimática, emerge como una estrategia prometedora ya que se enfoca en el agotamiento de aminoácidos esenciales para el crecimiento de células malignas. La L-asparaginasa utilizada hoy en día como terapia enzimática al interrumpir el suministro de asparagina a las células tumorales, induciendo su apoptosis. Sin embargo, existe una creciente demanda de nuevas enzimas con mejores características para abordar diferentes tipos de cáncer.

Este estudio se centra en la exploración del Desierto de Atacama en búsqueda de microorganismos halófilos y halotolerantes. El Desierto de Atacama es un ambiente único y poliextremo, como fuente única de microorganismos halófilos y halotolerantes, potencialmente sintetizadores de nuevas enzimas anticancerígenas. Se aislaron 48 microorganismos, principalmente de los géneros bacterianos, *Salibacterium*, *Calidifontibacillus* y *Bacillus*, conocidos por habitar ambientes extremos.

Se evaluó la capacidad de estos microorganismos para producir enzimas anticancerígenas como L-asparaginasa, L-metioninasa, L-glutaminasa, serina desaminasa, glicina oxidasa y arginina deiminasa. La mayoría de las cepas productoras eran halófilas y algunas de ellas sintetizaron múltiples enzimas. Cinco enzimas se producían extracelularmente, facilitando su purificación mediante cromatografía de filtración en gel.

Las enzimas purificadas mostraron incremento significativo en su actividad enzimática y se evaluó su efecto en tres líneas celulares de cáncer: melanoma RQ y DFB y cáncer de mama MCF-7. Se observó disminución significativa en la viabilidad en comparación con el control, con variación en las concentraciones efectivas medias (EC_{50}) según la enzima y la línea celular. La proliferación celular se evaluó mediante el marcador Ki67, revelando una disminución en la proliferación en todas las líneas celulares tratadas con las enzimas.

Se detectaron comportamientos canónicos y no canónicos de las enzimas, sugiriendo complejidad en sus efectos. Se destaca la necesidad de investigaciones adicionales, incluyendo análisis moleculares y pruebas en diferentes líneas celulares, para comprender mejor los efectos de estas enzimas.

Finalmente, este estudio resalta el potencial de los microorganismos del Desierto de Atacama como fuentes de enzimas anticancerígenas, con efectos prometedores en líneas celulares tumorales. Subraya la relevancia de los aminoácidos en el crecimiento tumoral y la privación de estos como estrategia terapéutica, contribuyendo al avance en la terapia enzimática anticancerígena.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death worldwide. It is projected that by 2030, this disease will become the primary cause of death, with an increase of over 33% in global incidence, particularly affecting countries with higher poverty and lower development. Despite available conventional therapies, the need for more effective and targeted treatments remains urgent.

Enzymatic therapy emerges as a promising strategy, focusing on depleting essential amino acids for the growth of malignant cells. L-asparaginase, currently used in enzymatic therapy, disrupts the supply of asparagine to tumor cells, inducing their apoptosis. However, there is a growing demand for new enzymes with improved characteristics to address different types of cancer.

This study focuses on exploring the Atacama Desert in search of halophilic and halotolerant microorganisms. The Atacama Desert, a unique and polyextreme environment, serves as a singular source of these microorganisms, potentially synthesizing new anticancer enzymes. Forty-eight microorganisms were isolated, primarily from bacterial genera *Salibacterium*, *Calidifontibacillus*, and *Bacillus*, known to inhabit extreme environments.

The capability of these microorganisms to produce anticancer enzymes, including L-asparaginase, L-methioninase, L-glutaminase, serine deaminase, glycine oxidase, and arginine deiminase, was evaluated. Most producing strains were halophilic, with some synthesizing multiple enzymes. Five enzymes were extracellularly produced, facilitating purification through gel filtration chromatography.

Purified enzymes showed a significant increase in enzymatic activity, and their effects were assessed on three cancer cell lines: melanoma RQ and DFB, and breast cancer MCF-7. A significant decrease in viability compared to the control was observed, with variations in the half-maximal effective concentrations (EC₅₀) depending on the enzyme and cell line. Cell proliferation was evaluated using the Ki67 marker, revealing a decrease in proliferation in all cell lines treated with the enzymes.

Canonical and non-canonical behaviors of the enzymes were detected, suggesting complexity in their effects. The need for additional research, including molecular analyses and tests on different cell lines, is emphasized to better understand the effects of these enzymes.

In conclusion, this study highlights the potential of Atacama Desert microorganisms as sources of anticancer enzymes, showing promising effects on tumor cell lines. It underscores the relevance of amino acids in tumor growth and their deprivation as a therapeutic strategy, contributing to advancements in enzymatic anticancer therapy.

"Dedico esta tesis con profundo amor y gratitud a mi querido hijo, Oscar Soto Maya. Su presencia y su apoyo han iluminado mi camino durante este arduo trayecto académico".

Agradecimientos

Agradezco sinceramente a mis estimados tutores, la Dra. Barbara Andrews, el Dr. Juan Asenjo y el Dr. Pablo Caviedes, por apoyarme desde el inicio en esta área de estudio y por su guía asertiva a lo largo de este extenso pero enriquecedor proceso. Su dedicación y orientación han dejado una huella imborrable en mi desarrollo académico y profesional. Espero contribuir de manera significativa a la comunidad académica y científica, llevando conmigo las valiosas lecciones que me han brindado.

A mis queridos amigos, Silvi, Karent, Francisco, Rodrigo, Karla y Anita, les expreso mi profundo agradecimiento por su constante presencia en mi vida. Gracias por darme ánimos, creer en mí y compartir conmigo risas, llantos, anécdotas, triunfos, caídas y metas. Estoy agradecida por tenerlos a mi lado y ser parte de la familia que elegí.

A mi querido EMMA lab, mi familia científica, sinceramente en este largo camino que es la carrera científica, quiero agradecerles. Cada experimento, descubrimiento y desafío han sido compartidos con pasión y dedicación por todos nosotros. Su colaboración, apoyo y compañerismo para crecer juntos han hecho de esta travesía científica una experiencia enriquecedora. Gracias, colegas y amigos.

A mis amados padres, Ivonne y Manuel, gracias por su apoyo y amor incondicional. Todo lo que soy se los debo a ustedes; siempre han creído en mí. Gracias por ser la base sólida de mi vida y por inspirarme a ser la mejor versión de mí misma.

A mis queridos hermanos Melissa, Valentina y Manuel, con su amor incondicional, respaldo constante y presencia, me impulsan para salir adelante. Cada logro que alcanzo también es suyo.

A mi amado hijo Oscarito, gracias por ser tan partner y paciente en mis largas jornadas de experimentos, estoy orgullosa de la fuerza que irradian, sin duda de ti aprendí a mirar la vida más simple y con amor.

A Oscar, por amarme tal cual soy y por regalarme la mayor bendición de esta vida, nuestro hijo Oscarito. Gracias por estar a mi lado.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ABREVIACIONES	VIII
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 El Cáncer: Una creciente enfermedad de crisis mundial	1
1.2 Metabolismo de aminoácidos en células cancerosas	2
1.3 Privación de aminoácidos inducida, estrategia útil para la terapia del cáncer.....	4
1.4 Adicciones a aminoácidos	5
1.5 Desierto de Atacama, ambiente extremo con una amplia diversidad de microorganismos halófilos y halotolerantes	6
1.6 Versatilidad enzimática frente a condiciones adversas.....	9
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
2.1 Hipótesis	11
2.2 Objetivo general.....	11
2.3 Objetivos específicos	11
3 MATERIALES Y METODOS	12
3.1 Sitio de muestreo y recolección de muestras	12
3.2 Aislamiento e identificación de cepas bacterianas halotolerantes y halófilas.	12
3.2.1 Aislamiento.....	12
3.2.2 Extracción ADN	13
3.2.3 Amplificación	13
3.2.4 Análisis filogenético basado en el gen 16S rRNA	14
3.3 Detección de la producción de las enzimas de interés por los aislados halófilos y halotolerantes.	14
3.4 Ensayo cuantitativo de la actividad de las enzimas obtenidas.....	16
3.5 Efecto del pH, concentración de NaCl y de la temperatura en la producción y actividad de enzimas de interés:	17
3.6 Producción de enzimas de interés	17
3.7 Determinación de concentración de proteínas	18
3.8 Purificación de las enzimas de interés	18
3.9 Líneas celulares.....	18
3.10 Ensayo de citotoxicidad por medición de viabilidad celular	19
3.11 Ensayo de proliferación celular con marcador Ki67.....	20
3.12 Análisis estadístico	21

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1 Aislamiento e identificación bacterias halófilas y halotolerantes de muestras pertenecientes del Desierto de Atacama	22
4.2 Producción y purificación de enzimas anticancerígenas por bacterias halófilas y halotolerantes.	26
4.2.1 Producción	26
4.2.2 Efectos de pH, temperatura y NaCl en la producción de enzimas de interés y la actividad enzimática	29
4.2.3 Purificación.....	31
4.3 Medición de la toxicidad de las enzimas de interés en líneas celulares.....	33
4.4 Evaluación de la respuesta anticancerígena de las enzimas purificadas en líneas celulares, mediante el marcador de proliferación celular Ki67.	38
4.4.1 Posibles efectos canónicos y no canónicos de las enzimas purificadas en las tres líneas celulares.....	43
5 CONCLUSIONES	55
6 PROYECCIONES	57
7 BIBLIOGRAFÍA	58
ANEXOS	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo de los aminoácidos.....	3
Figura 2. Curva de calibración de sulfato de amonio.....	17
Figura 3. Árbol filogenético ARN 16S	24
Figura 4. Método de ensayo rápido en placa.....	27
Figura 5. Perfil cromatográfico de enzimas purificadas por filtración en gel.....	32
Figura 6. Citotoxicidad mediante ensayo MTT.....	34
Figura 7. Análisis de citometría de flujo de la proliferación celular mediante el índice Ki67.	40
Figura 8. Análisis estadístico ANOVA y la prueba Tukey HSD de comparación de índice Ki67 (%) entre diferentes tratamientos.....	43
Figura 9. Efectos y comparación sobre la viabilidad y proliferación celular.....	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Adicciones tumorales a los aminoácidos (Maggi & Scotti, 2019)	6
Tabla 2. Detalle de la obtención de las muestras extraídas de varios sitios del Desierto de Atacama.	12
Tabla 3. Cepas halotolerantes y halófilas aisladas de dos sitios de estudio y diferentes condiciones de cultivo (pH y NaCl).	22
Tabla 4. Producción de enzimas de cada aislado, evaluado en ensayo rápido en placa.	27
Tabla 5. Cepas seleccionadas con mayor actividad de sus enzimas.....	29
Tabla 6. Cepas seleccionadas con mayor actividad de sus enzimas.....	30
Tabla 7. Actividad enzimática de las enzimas no purificadas y actividad enzimática máxima de la fracción de las enzimas purificadas.	32
Tabla 8. Ensayo de viabilidad celular EC_{50} expresado en la actividad enzimática (IU/ml) nominal.	35
Tabla 9. Viabilidad celular EC_{50} en % nominal de la enzima de interés	35

ABREVIACIONES

Acetil-CoA: Acetil-Coenzima A

ADI: Arginina deiminasa

ADN: Acido desoxirribonucleico

α -KG: Ácido alfa-cetoglutárico

Akt: Proteína quinasa B

ALL: Leucemia linfoblástica aguda

ANOVA: Análisis de varianza

ARG: Arginina

ARN: Ácido ribonucleico

ASN: Asparagina

ASNasa: Asparaginasa

ASNS: Asparagina sintetasa

ASP: Aspartato

ASS1 ó AS: Arginina succinato sintetasa

BCAA: Aminoácidos de cadena ramificada [Valina, Leucina e Isoleucina]

BCAT2: Aminoácido de cadena ramificada transaminasa

BCKA: Cetoácido de cadena ramificada

BSA: Albúmina de suero bovino

CF: Citometría de flujo

Ciclo Met: Ciclo de la Metionina

CIS: Cisteína

Cit: Citrato

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO: Densidad óptica

EAA: Aminoácidos esenciales

EMT: Transición Epitelio-Mesénquima

ERK: Proteína Quinasa Regulada por Señal Extracelular

FBS: Suero fetal bovino

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FPLC: Cromatografía líquida de proteínas rápidas

GCN2: Control General No-Dereprimible 2

GL: Glutaminasa bacteriana

GLI: Glicina

GLN: Glutamina

GLS: Glutaminasa

GLU: Glutamato

GLUT: Transportador de glucosa

GO: Glicina oxidasa

GOT1: Aspartato transaminasa

GPT: Guanosina trifosfatasa

GS: Glutamina sintetasa

GSH: Glutati6n

HEPES: cido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacil-(1)] etanosulf6nico

Ig: Inmunoglobulina

kDa: Kilodalton

Ki67: Marcador de proliferaci6n celular

LAT1: Transportador de aminoácidos neutros grandes 1

LB: Luria Broth

Ma-ADI: *Mycoplasma arginini*

MCF-7: Cáncer de mama

MET: Metionina

MGL: Metioninasa o Metionina gamma-liasa

MMP: Metilmercaptopiruvato

mTOR: Mammalian Target of Rapamycin

MTT: Metiltiazol tetrazolio

NaCl: Cloruro de sodio

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NEAA; Aminoácidos no esenciales

OAA: Ácido oxaloacético

OCT: Ornitina transcarbamil transferasa

OFAT: Método de un factor a la vez

P5C: Pirrolina-5-carboxilato

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PHGDH: Fosfoglicerato deshidrogenasa

PRO: Prolina

PRODH: Pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa

PRPP: Fosforribosilo Pirofosfato

PYCR: Pirrolina-5-carboxilato reductasa

Rac 1: Proteína GPTasa

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

rRNA: Ácido Ribonucleico Ribosomal

SDH: Serina desaminasa o Serina deshidratasa

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SEM: Error estándar medido

SER: Serina

SHMT1: Serina hidroximetiltransferasa

SNAIL: Proteína SNAIL

SSP: Vía de síntesis de serina

TCA: ciclo del ácido tricarbóxico o ciclo del ácido cítrico

UI: Unidades internacionales

1 INTRODUCCIÓN

1.1 El Cáncer: Una creciente enfermedad de crisis mundial

El cáncer es una de las principales enfermedades que causan la muerte a nivel mundial, donde estimaciones de la Organización Mundial de la Salud mostraron que casi 10 millones de defunciones fueron atribuidas a ella en el año 2020. Su importancia radica debido a que, dentro de todas las enfermedades a nivel mundial, una de cada seis personas muere a causa del cáncer (Ferlay et al., 2010). Asimismo, se proyecta que para el año 2040, el número de casos de cáncer aumente a valores en el rango de 29 a 37 millones, siendo los más afectados los países de ingresos medios y bajos (WHO, 2020). Es evidente que existe una inequidad en el acceso a tratamientos eficaces, reflejada en tasas de mortalidad mucho más altas en países con un índice de desarrollo humano más bajo (El HDI es una medida compuesta que evalúa el desarrollo humano en los países, tomando en cuenta factores como la esperanza de vida al nacer, la educación y el ingreso per cápita) (WHO, 2020), lo que resulta en diagnósticos tardíos y en etapas avanzadas, lo que reduce las opciones de tratamiento. A lo largo del tiempo, los países de ingresos altos han logrado un progreso significativo en la reducción de la probabilidad de muerte prematura por cáncer, con una disminución del 20% entre 2000 y 2015. Por el contrario, los países de bajos ingresos solo han logrado una reducción del 5% en el mismo período, lo que refleja una creciente desigualdad a nivel global (WHO, 2020).

El manejo del cáncer es generalmente más complejo respecto de otras enfermedades, ya que el tratamiento puede abarcar diversas opciones, como cirugía, terapia sistémica (por ejemplo, quimioterapia, inmunoterapia, terapia endocrina) y radioterapia. La elección del tratamiento va a depender del impacto, costo y viabilidad específicos para cada tipo de cáncer en particular. Sin embargo, algunas intervenciones comúnmente utilizadas, como la quimioterapia y la radioterapia, que además de ser costosas, pueden llegar a provocar efectos secundarios graves, tales como mucositis, cardiotoxicidad, disfunción reproductiva, neumonitis, neuropatía y problemas cutáneos (Naidu et al., 2004). Estos efectos secundarios resultan principalmente de la alta toxicidad sistémica y la falta de especificidad de estas estrategias de tratamiento, que afecta no solo a las células malignas, sino también a las células sanas circundantes. Es por esto que la investigación se ha enfocado en el desarrollo de nuevas estrategias biológicas dirigidas.

Asimismo, el avance tecnológico ha permitido obtener un conocimiento más profundo sobre el metabolismo de las células cancerosas y sus diferencias con las células normales. Estas diferencias no solo se aprovechan para el diagnóstico, sino también como objetivos para el desarrollo de terapias específicas contra el cáncer. Estas terapias dirigidas resultan más eficientes al superar las limitaciones previas de toxicidad sistémica, sensibilidad y concentración del fármaco, además de solo concentrarse en el tratamiento de células malignas (Dhankhar et al., 2020).

1.2 Metabolismo de aminoácidos en células cancerosas

Las células cancerosas se caracterizan por tener un metabolismo reprogramado para satisfacer las altas demandas de componentes básicos y energía, siendo esta una característica distintiva del cáncer (Warburg et al., 1927). Estudios previos se han centrado principalmente en el metabolismo central del carbono, incluida la glucólisis y el ciclo del ácido tricarboxílico (ciclo del ácido cítrico, ciclo TCA) como principales contribuyentes en la tumorigénesis. Sin embargo, estudios recientes han evidenciado la relevancia del metabolismo sin carbono en la viabilidad y crecimiento de las células cancerosas (Lieu et al., 2020). Los aminoácidos, nutrientes esenciales para todas las células, experimentan una reprogramación metabólica en el cáncer. Los 20 aminoácidos proteinogénicos estándar desempeñan un papel crucial en diversos procesos fundamentales para la proliferación celular, incluyendo la biosíntesis de proteínas, nucleótidos, lípidos, glutatión, glucosamina y poliaminas, así como la reposición (anaplerosis) del carbono del ciclo TCA. El metabolismo celular de aminoácidos es altamente flexible y varía significativamente según el tejido de origen, el subtipo de cáncer, el microambiente y las mutaciones oncogénicas impulsoras. Sin embargo, estudios del metabolismo en células cancerosas han identificado una serie de características comunes: (i) una mayor demanda de nitrógeno para impulsar reacciones biosintéticas; (ii) un elevado consumo de aminoácidos y una regulación positiva de los transportadores correspondientes; (iii) una demanda de aminoácidos no esenciales que supera el suministro intracelular, llevando a una dependencia de fuentes exógenas; y (iv) niveles alterados de enzimas que catalizan la síntesis de aminoácidos (Lukey et al., 2017)

Como se observa en la Figura 1, tanto los aminoácidos esenciales como los no esenciales (EAA y NEAA, respectivamente) subyacen al metabolismo alterado, actuando como fuentes de energía. Por ejemplo, la glutamina es en gran parte una fuente anaplerótica que aporta grupos amino al ciclo TCA (Hensley et al., 2013), mientras que los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA:

valina, leucina e isoleucina) son fuentes alternativas de moléculas orgánicas que alimentan el ciclo TCA (Green et al., 2016), sosteniendo así la síntesis de energía.

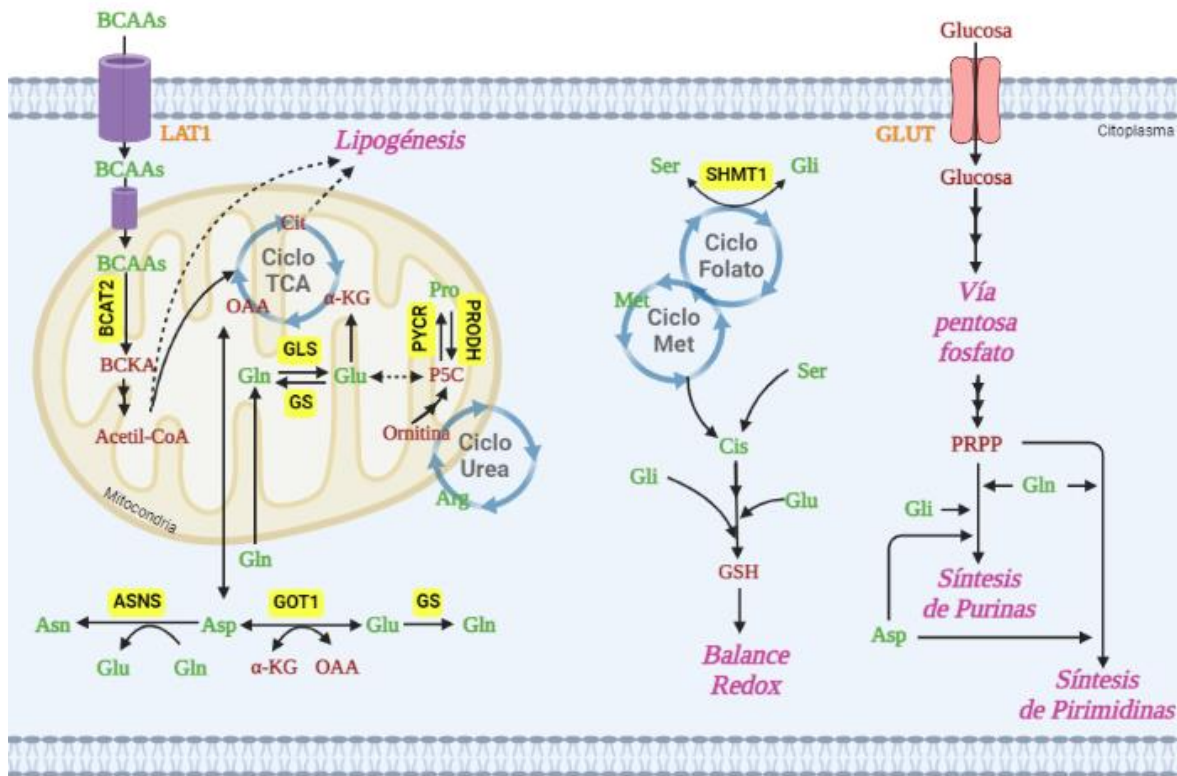


Figura 1. Metabolismo de los aminoácidos.

Los aminoácidos están verdes (**Gli**: Glicina, **Ser**: Serina, **Met**: Metionina, **Gln**: Glutamina, **Cis**: Cisteína, **Glu**: Glutamato, **Asp**: Aspartato, **Pro**: Prolina, **Asn**: Asparagina, **Arg**: Arginina, **BCAA**: Aminoácidos de cadena ramificada [Valina, Leucina e Isoleucina]). Otros metabolitos en rojo (**BCKA**: Cetoácido de cadena ramificada, **Acetil-CoA**: Acetil-Coenzima A, **OAA**: Ácido oxaloacético, **Cit**: Citrato, **α-KG**: Ácido alfa-cetoglutarico, **P5C**: Pirrolina-5-carboxilato, **PRPP**: Fosforribosilo Pirofosfato, **GSH**: Glutatión). En naranja están representados los transportadores (**LAT1**: Transportador de aminoácidos neutros grandes 1, **GLUT**: Transportador de glucosa). Los recuadros amarillos son las enzimas (**BCAT2**: Aminoácido de cadena ramificada transaminasa [mitocondrial], **GLS**: Glutaminasa, **GS**: glutamina sintetasa [citoplasmática y mitocondrial], **ASNS**: Asparagina sintetasa, **GOT1**: Aspartato transaminasa [citoplasmática], **PYCR**: Pirrolina-5-carboxilato reductasa, **PRODH**: Pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa, **SHMT1**: Serina hidroximetiltransferasa [citoplasmática]). **Ciclo Met**: Ciclo de la Metionina, **Ciclo TCA**: Ciclo del ácido tricarbóxico o Ciclo del ácido cítrico. Modificado de Lieu et al., 2020.

Además, los aminoácidos proporcionan los componentes básicos necesarios para la síntesis de nucleótidos y la lipogénesis, procesos fundamentales para el crecimiento y desarrollo celular. La lipogénesis se puede lograr mediante la síntesis de acetil-CoA a través del catabolismo de los BCAA (Green et al., 2016), mientras que la síntesis de nucleótidos, que puede dividirse en biosíntesis de purinas y pirimidinas, también depende de aminoácidos, como glicina, glutamina y aspartato, que proporcionan unidades de carbono y nitrógeno (Moffatt & Ashihara, 2002; Zhang

et al., 2008). Además, glicina, serina y metionina son fuentes adicionales de carbono para las nucleobases, como forma de formiato, a través del ciclo metionina-folato.

La proliferación de células cancerosas resulta en la acumulación de especies reactivas de oxígeno, que pueden dañar macromoléculas y provocar la muerte celular. Para evitar los efectos del estrés oxidativo, los aminoácidos pueden regular el equilibrio redox mediante la producción de glutatión a partir de glutamato, glicina y cisteína (Chung et al., 2005; Lo et al., 2008; Vaughn & Deshmukh, 2008). Además, se ha establecido que el ciclo del folato produce una cantidad significativa de NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), que se impulsa principalmente mediante unidades de carbono derivadas de la serina (Fan et al., 2014).

El catabolismo de EAA también contribuye a la generación de NEAA a través de reacciones químicas, incluyendo aquellas mediadas por transaminasas, que son una clase importante de enzimas en el cáncer. Al facilitar la interconversión de aminoácidos, las transaminasas permiten la explotación de las diversas funciones de los aminoácidos de fuentes irregulares. La alta demanda de EAA conduce a la regulación positiva de los transportadores de EAA para satisfacer estos requerimientos, una característica común en muchos tipos de cáncer (Gupta et al., 2005; Gupta et al., 2006; Karunakaran et al., 2008).

1.3 Privación de aminoácidos inducida, estrategia útil para la terapia del cáncer

Estudios recientes han puesto de manifiesto que el metabolismo de los aminoácidos representa una prometedora oportunidad clínica, aún poco explorada, para el tratamiento de diversos tipos de cáncer (Geck & Toker, 2016; Lieu et al., 2020). Debido al aumento en la tasa metabólica y proliferación, los tejidos cancerosos tienen una demanda mucho mayor de nutrientes en comparación con los tejidos normales (Ward & Thompson, 2012). Esta alta demanda de sustratos específicos se convierte en un objetivo relevante para nuevas terapias, como la terapia de inanición metabólica, ya que la eliminación de un sustrato esencial puede conducir a la detención selectiva del ciclo celular o incluso a la muerte celular, dejando intactas las células normales, lo que podría ser menos tóxico para los pacientes en comparación con la quimioterapia o la radiación (Changou et al., 2014).

La terapia enzimática se enfoca en las células cancerosas al utilizar enzimas que agotan aminoácidos específicos necesarios para el crecimiento maligno. Estos aminoácidos no son esenciales para la supervivencia de las células sanas, lo que significa que las células normales

pueden funcionar adecuadamente incluso cuando estos aminoácidos son reducidos por la terapia enzimática (Gonzalez, 1969; Wheatley, 2004; Cantor et al., 2012; UmaMaheswari et al., 2016). Durante los últimos 50 años, las terapias enzimáticas han demostrado ser bastante eficaces para este propósito. Estos tratamientos involucran el uso de enzimas heterólogas (provenientes de otros organismos, como bacterias), enzimas recombinantes o enzimas humanas modificadas para disminuir la concentración de un aminoácido específico en el torrente sanguíneo, el cual es esencial para el desarrollo de un tumor (Pokrovsky et al., 2019).

En la actualidad, los únicos agentes anticancerígenos que se dirigen directamente al metabolismo de los aminoácidos son las L-asparaginasa bacterianas (de *Escherichia coli* y *Erwinia chrysanthemi*) aprobadas por la FDA para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda (ALL) en pacientes pediátricos y en adultos (Abuchowski et al., 1984; Wetzler et al., 2007; Lukey et al., 2017). Además, se ha demostrado que otras enzimas que degradan aminoácidos, como la arginasa o l-glutaminasa, ejercen efectos antitumorales en entornos preclínicos (Greenberg et al., 1964; Savoca et al., 1984; Leu et al., 1992; Lukey et al., 2017). Estos antecedentes indican el potencial terapéutico de la búsqueda de enzimas que conduzcan a la autofagia de algunos aminoácidos específicos, lo que podría ser prometedor para futuros tratamientos contra distintos tipos de cáncer.

1.4 Adicciones a aminoácidos

Estudios han revelado que algunos tipos de cáncer son auxótrofos, lo que significa que dependen de fuentes externas para obtener NEAA. Esta dependencia a menudo se atribuye a la pérdida de expresión de enzimas cruciales en la síntesis de estos aminoácidos debido a mutaciones directas o silenciamiento (Sugimura et al., 1992; Lomelino et al., 2017). Tres ejemplos ilustrativos de esta situación son la dependencia de arginina, asparagina y glutamina, ya que la arginina succinato sintetasa (ASS1), la asparagina sintetasa (ASNS) y la glutamina sintetasa (GS), respectivamente, no se expresan en varios tipos de cáncer. Esta falta de expresión conlleva a una dependencia específica del cáncer en estos aminoácidos, ofreciendo una oportunidad para inhibir selectivamente el crecimiento de células tumorales mediante la eliminación de aminoácidos específicos utilizando enzimas en la terapia metabólica.

Además, se están identificando nuevas dependencias a aminoácidos: como serina, glicina, metionina, prolina y tirosina, que son esenciales para varios tipos de tumores, especialmente los sólidos (Tabla 1):

Tabla 1. Adicciones tumorales a los aminoácidos (Maggi & Scotti, 2019)

Tipo de tumor	Aminoácido requerido	Rol funcional en el cáncer	Actividad enzimática para terapia	Referencias
Tumores derivados del sistema nervioso (Neuroblastoma, glioblastoma, meduloblastoma)	Metionina	Biosíntesis de poliaminas, glutatión, espermina. Metilación del ADN	L-metioninasa	Cavuoto & Fenech, 2012; Fernandes et al., 2017.
ALL Carcinomas de ovario Linfoma de Hon-Hodgkin	Asparagina	Síntesis de proteínas Progresión Del ciclo celular	L-asparaginasa	Chan et al., 2014; Fernandes et al., 2017.
Cáncer de ovarios ALL Hepatoma	Glutamina	Síntesis de proteínas Transportador de nitrógeno amino	Glutaminasa	Chen & Cui, 2015; Cluntun et al., 2017.
Melanoma Carcinoma hepatocelular Carcinoma de pulmón de células pequeñas Carcinoma pancreáticos	Arginina	Sin síntesis	L-arginina deiminasa	Das et al., 2004; Fernandes et al., 2017.
Cáncer de mama	Glicina	Síntesis de purina	Glicina oxidasa	Douce et al., 2001.
Cáncer de mama	Serina	Síntesis de glutamina	Serina desaminasa o Serina deshidrogenasa (SDH)	Dufour et al., 2012.
Cáncer de próstata Linfoma de Burkitt	Prolina	Síntesis de glutamina	Prolina deshidrogenasa	Elia et al., 2017.
Melanoma Cáncer de próstata	Tirosina Fenilalanina	Síntesis de melanina y hormonas	Tirosina transaminasa	Ferlay et al., 2010

Esta dependencia específica de aminoácidos puede ofrecer una selectividad terapéutica y proporcionar una ventana terapéutica favorable. De hecho, como se mencionó anteriormente, en el campo de las adicciones a aminoácidos, la investigación preclínica y clínica ha demostrado que las enzimas pueden utilizarse con éxito para eliminar los aminoácidos a los cuales las células son adictas, y llevar a las células cancerosas a la apoptosis (Cantor et al., 2012).

1.5 Desierto de Atacama, ambiente extremo con una amplia diversidad de microorganismos halófilos y halotolerantes

La búsqueda de nuevas enzimas con características mejoradas para el tratamiento de diversos tipos de cáncer es un objetivo en constante desarrollo. Para este propósito, algunos investigadores han centrado su atención en la exploración de microorganismos provenientes de ambientes extremos y poliextremos.

Los microorganismos poliextremos son capaces de sobrevivir y prosperar en una amplia variedad de condiciones ambientales extremas y han desarrollado estrategias de supervivencia extraordinarias, incluyendo la producción de metabolitos secundarios como enzimas para enfrentar estos desafíos (Bowers et al., 2009; Seckbach et al., 2013). La exploración de estos extremófilos

poliextremos cobra especial relevancia en la búsqueda de nuevas moléculas con aplicaciones potenciales en biomedicina, particularmente en el tratamiento del cáncer y la resistencia a los antibióticos.

En este contexto, los microorganismos halófilos son de especial interés. Estos organismos, incluyendo arqueas, bacterias y eucariotas, se caracterizan por su adaptación a ambientes de alta salinidad, lo que les ha permitido prosperar en ambientes hipersalinos como lagos salinos, océanos y suelos salinos, ampliamente distribuidos en diversas áreas geográficas de la Tierra (Oren, 2008). Estos microorganismos se han adaptado para proliferar a altas concentraciones exógenas/extracelulares de sodio. Por lo tanto, según el requisito óptimo de NaCl, los halófilos se clasifican en tres categorías diferentes: leves (1-3%); moderados (3-15%); y extremos (15-30%) (Kushner, 1978; Kushner & Kamekura, 1988). En contraste, los microorganismos no halófilos crecen de manera óptima a concentraciones de NaCl al 1%. Además, existen microorganismos halotolerantes, los cuales pueden crecer en presencia y ausencia de altas concentraciones de sal (Singh et al., 2019). Los parámetros de tolerancia y los requisitos de sal dependen de la temperatura, el pH y el medio de crecimiento. De esta manera, los halófilos están adaptados y limitados por factores ambientales específicos.

Estos microorganismos halófilos y halotolerantes han desarrollado una gran versatilidad metabólica y mecanismos genéticos de adaptación a condiciones adversas como inanición de nutrientes, desecación, alta radiación solar y alta fuerza iónica, lo que los convierte en candidatos prometedores para el descubrimiento de nuevos compuestos con propiedades anticancerígenas (Charlesworth & Burns, 2015).

El Desierto de Atacama, considerado uno de los ambientes más extremos de la Tierra debido a su ubicación geográfica y condiciones climáticas, ofrece un sitio de estudio ideal para aislar microorganismos halófilos de interés (Bull et al., 2018). Con escasas precipitaciones (2 mm al año en promedio) (Azua-Bustos et al., 2012), variaciones de salinidad, que incluyen extensas áreas salinas como el Salar de Atacama y lagunas con composiciones variables de salmueras, el desierto presenta un ambiente propicio para el desarrollo de microorganismos extremófilos. Además, su exposición a niveles más altos de irradiación UV superficial, amplias variaciones de temperaturas y bajos niveles de carbono orgánico total lo hacen aún más desafiante para el crecimiento de estos microorganismos (Mckay et al., 2003; Navarro-González et al., 2003; Bull & Asenjo, 2013; Azua-Bustos et al., 2017; Cordero et al., 2018).

Estudios previos con microorganismos del Desierto de Atacama han demostrado el potencial de sintetizar nuevos compuestos prometedores, como las atacamicinas y chaxalactinas, obtenidas de cepas de *Streptomyces* sp., C38 y C58, aisladas del suelo hiperárido de la Laguna de Chaxa del Salar de Atacama, mostrando actividad antitumoral (Nachtigall et al., 2011; Elsayed et al., 2015). Además, investigaciones realizadas por Gonçalves et al., (2016) en hongos asociados con rocas del desierto de Atacama, indicaron diversas actividades bioactivas, incluyendo anticancerígenas, en veinte extractos que demostraron actividad contra el cáncer de mama humano. Estos estudios muestran solo una parte del alto potencial que posee esta región para la búsqueda de microorganismos sintetizadores de nuevos compuestos bioactivos.

Los halófilos producen enzimas como una estrategia de defensa en ambientes salinos extremos, lo que ha captado la atención de la comunidad científica por su potencial aplicación en la lucha contra el cáncer. Estas enzimas producidas por los halófilos han demostrado tener efectos citotóxicos selectivos contra las células cancerosas, lo que significa que pueden eliminar específicamente las células cancerosas sin dañar las células normales. Además, los productos terapéuticos derivados de bacterias halófilas muestran a menudo una mayor actividad biológica y tolerancia a la osmolaridad de la sangre (Van Trimpont et al., 2022).

Estudios de cepas halófilas del lago Urmia en Irán mostraron que algunas de ellas producen enzimas como la l-asparaginasa y l-glutaminasa con actividad anticancerígena. Estas enzimas se obtuvieron principalmente de cepas de los géneros *Bacillus* y *Salicola* (Shirazian et al., 2016). Otro estudio reveló que varias cepas halófilas de diferentes entornos salinos de Irán producen enzimas anticancerígenas, incluyendo l-asparaginasa, l-glutaminasa y l-arginasa, pertenecientes a diversos géneros bacterianos (Zolfaghar et al., 2019). Una nueva enzima l-asparaginasa recombinante producida por la cepa *Halomonas elongata* mostró actividad anticancerígena contra líneas celulares de leucemia mieloide linfoblástica Jurkat y humana U937, con una selectividad que no afectó a las células normales HUVEC (Ghasemi et al., 2017).

En resumen, el Desierto de Atacama se presenta como un ambiente propicio para la búsqueda y aislamiento de microorganismos halófilos y halotolerantes con potencial para producir enzimas anticancerígenas, lo que podría ofrecer nuevas y prometedoras alternativas para el tratamiento del cáncer.

1.6 Versatilidad enzimática frente a condiciones adversas

La versatilidad enzimática de los microorganismos extremófilos se ha convertido en un tema de gran interés en la biotecnología. Estos microorganismos, capaces de sobrevivir en entornos considerados extremos para la vida, han desarrollado enzimas con características únicas y una notable estabilidad en condiciones extremas (Gómez Fernández et al., 2018).

Tradicionalmente, se ha sostenido que las enzimas son altamente específicas para sus sustratos. Sin embargo, en la actualidad, este paradigma fundamental de la especificidad enzimática está siendo objeto de cuestionamiento por parte de varios investigadores (Hult & Berglund, 2007; Khersonsky et al., 2011; Yang et al., 2020). En situaciones en las que el entorno cambia y surge la necesidad de una nueva reacción enzimática, la naturaleza aprovecha las enzimas existentes para interactuar con sustratos ambiguos y, de esta manera, catalizar la nueva reacción requerida. A estas enzimas se les denomina "enzimas promiscuas". Esta característica es especialmente relevante en el caso de las extremoquinas (enzimas sintetizadas por microorganismos extremófilos), ya que su adaptación a condiciones extremas podría haberles dado la capacidad de realizar reacciones químicas adicionales.

Se ha postulado que factores ambientales regulan la función promiscua en bacterias. Por lo tanto, la promiscuidad enzimática confiere a estos microorganismos un repertorio de una amplia variedad de sustratos que pueden modificarse en diferentes condiciones ambientales (Martínez-Núñez & Pérez-Rueda, 2016). Para hacer frente a las condiciones ambientales cambiantes, los organismos de vida libre desarrollaron muchas enzimas con funciones promiscuas que permiten al organismo alterar y reprogramar sus vías metabólicas. De esta manera, estas enzimas están sujetas a una menor regulación metabólica en comparación con otras enzimas con especificidad absoluta, proporcionando plasticidad genómica para sobrevivir en ambientes extremos (Aharoni et al., 2005). De hecho, se observó que las duplicaciones de genes ocurren con mayor frecuencia en organismos de vida libre en comparación con organismos que habitan ambientes más estables (Singla & Bhardwaj, 2020).

La promiscuidad enzimática se define como la capacidad de una enzima para catalizar una reacción fortuita además de su función nativa. Sus funciones son generalmente lentas en comparación con la reacción principal, confiriendo la supervivencia de los organismos durante las limitaciones ambientales donde la reacción secundaria se convierte en la reacción principal. Se ha descubierto

que la actividad principal de una enzima es “robusta” hacia el cambio mientras que las actividades promiscuas son más “plásticas” (Yoshikuni et al., 2006). Las enzimas promiscuas pueden utilizar el mismo sitio activo para su actividad primaria y secundaria. Por lo tanto, diferentes sustratos pueden unirse a estas enzimas en un sitio activo determinado para producir múltiples productos (Copley, 2003).

En el contexto de la terapia enzimática, como se mencionó anteriormente, la única enzima utilizada como agente anticancerígeno para el tratamiento de ALL es la asparaginasa (ASNasa) bacteriana (Abuchowski et al., 1984; Wetzler et al., 2007; Lukey et al., 2017). Las dos terapias principalmente comercializadas son Oncaspar® y Erwinase®, siendo su principal actividad canónica enzimática conocida la de ASNasa con la desamidación de ASN a ácido aspártico y amoníaco (Maggi & Scotti, 2019). Sin embargo, también posee coactividad glutaminasa, lo que le permite hidrolizar la glutamina en ácido glutámico y amoníaco, aunque con menor afinidad y menor tasa máxima (Chan et al., 2014). La glutamina es un aminoácido no esencial ampliamente utilizado en el cuerpo y es esencial para numerosos procesos metabólicos, incluyendo la síntesis de proteínas, ADN, ARN, lípidos y otros aminoácidos no esenciales y se ha demostrado que los tumores sólidos tienen un alto consumo de Gln para mantener la biosíntesis y la proliferación celular (DeBerardinis et al., 2007).

En el tratamiento de enfermedades como la ALL, la ASNasa ejerce efectos tanto canónicos como no canónicos. En su función canónica, la ASNasa agota la asparagina y el ácido aspártico del ambiente extracelular, lo que puede resultar en una disminución de la síntesis de proteínas y en la muerte celular debido a la falta de estos aminoácidos esenciales. Sin embargo, su coactividad glutaminasa también influye en las células cancerosas, afectando los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), la progresión del ciclo celular, la autofagia y la muerte celular apoptótica (Song et al., 2015; Song et al., 2017; Costa-Silva et al., 2020). Además, se ha identificado que la ASNasa, al inhibir las vías de señalización Akt/mTOR y Erk, presenta otro mecanismo anticancerígeno, ya que estas vías son esenciales para el crecimiento y la supervivencia celular (Dhankhar et al., 2020). La vía de señalización Akt/mTOR también participa en la inducción de la autofagia.

Comprender cómo estas enzimas pueden influir con su actividad anticancerígena es fundamental para determinar si son candidatos prometedores en el desarrollo de terapias dirigidas contra esta enfermedad.

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Los microorganismos halófilos y halotolerantes aislados del Desierto de Atacama poseen mecanismos de haloadaptación a condiciones poliextremas, lo que los convierte en candidatos prometedores para producir enzimas anticancerígenas, cuya aplicación terapéutica conlleve a la depleción de aminoácidos, capaces de inhibir la proliferación y crecimiento de células cancerosas, siendo estas potencialmente utilizables en terapia enzimática.

2.2 Objetivo general

Aislar y caracterizar bacterias halófilas y halotolerantes provenientes del Desierto de Atacama, como potenciales productores de enzimas anticancerígenas. Evaluar la actividad de estas enzimas en la inhibición del crecimiento y proliferación de células malignas al disminuir o eliminar aminoácidos esenciales para el crecimiento tumoral.

2.3 Objetivos específicos

1. Aislar y caracterizar bacterias halófilas y halotolerantes presentes en muestras del Desierto de Atacama.
2. Evaluar y seleccionar enzimas sintetizadas por microorganismos halófilos y halotolerantes, con capacidad para degradar aminoácidos.
3. Medir la toxicidad de las enzimas de interés en líneas celulares.
4. Evaluar la capacidad anticancerígena de las enzimas aisladas de microorganismos halófilos y halotolerantes en líneas celulares específicas, utilizando el marcador de proliferación celular Ki-67 como indicador de la actividad antiproliferativa.

3 MATERIALES Y METODOS

3.1 Sitio de muestreo y recolección de muestras

Se utilizaron 2 muestras obtenidas del Desierto de Atacama para la obtención y aislamiento de bacterias halotolerantes y halófilas, descritas en la siguiente tabla:

Tabla 2. Detalle de la obtención de las muestras extraídas de varios sitios del Desierto de Atacama.

Día	Nombre del sitio	Etiqueta	S	W	Altura (m.s.n.m)	Profundidad	Comentario
4/11/2016	Valle de la Luna	VL1	22.56.610	68.16.779	2493	2-3 cm	Saline rock wall
6/11/2016	Salar de Tara	ST2	23.02.471	67.16.967	4337	10-20 cm	Salar border

3.2 Aislamiento e identificación de cepas bacterianas halotolerantes y halófilas.

3.2.1 Aislamiento

Para aislar y favorecer el crecimiento de microorganismos halófilos y halotolerantes, se empleó una estrategia de cultivo en medios con diferentes concentraciones de NaCl. Para esto, se realizó el siguiente procedimiento:

Se adicionó 1 gr de cada muestra (Tabla 2) en 50 ml de medio líquido contenido en matraces de 250 ml y se incubaron durante 7 días a 37°C para permitir el crecimiento microbiano. Posteriormente, se tomó 200 µl de cada cultivo y se sembró en placas con agar que contenían el mismo medio de cultivo inicial. Las placas se incubaron por 10 días a 37°C. Posteriormente, se llevó a cabo el aislamiento de colonias en nuevas placas con el mismo medio de crecimiento. Este proceso de aislamiento se realizó de forma consecutiva tres veces para obtener colonias aisladas y representativas de un solo microorganismo. Cada cultivo en placa se mantuvo por 10 días adicionales para permitir el crecimiento adecuado.

Los medios utilizados para los cultivos fueron: **LB-NaCl** (LB [15 g] + NaCl [5%, 10%, 15%, 20%]) + Agar [20 g] por litro de agua destilada a pH 7 y 9, **SW-Medium modificado** (NaCl [15%, 20%, 25%, 30%] + MgCl \cdot 6H $_2$ O [9,75 g] + MgSO $_4$ \cdot 7H $_2$ O [15,25 g] + CaCl $_2$ [0,25 g] + KCl [1,5 g]

+ NaHCO₃ [0,05 g] + KBr [0,175 g] + Extracto de Levadura [5 g] + Casaminoácidos [5 g] + Agar [20 g] por litro de agua MilliQ a pH 7.

Las colonias obtenidas después de los tres traspasos en placa fueron preservadas en un medio líquido correspondiente al cultivo, conteniendo un 15% de glicerol, y almacenadas a -20°C para su conservación.

3.2.2 Extracción ADN

Para la obtención de ADN bacteriano, se empleó una extracción rápida basada en el método de shock térmico descrito por Hernández et al., (2009), con modificaciones. Las colonias bacterianas presentes en las placas de agar fueron recolectadas y resuspendidas en 100 µL de agua MilliQ. Posteriormente, los tubos fueron sometidos a una temperatura de 98°C durante 10 minutos en un termociclador (T960, Heal Force, China), seguido de un enfriamiento en hielo durante 3 minutos y finalmente, centrifugados durante 10 min a 13.000 rpm a 4°C.

Se recolecto el sobrenadante obtenido en un nuevo tubo Eppendorf estéril de 1,5 mL, y se procedió a almacenar las muestras a -20°C hasta su posterior utilización.

3.2.3 Amplificación

El gen 16S rRNA fue amplificado mediante PCR utilizando partidores universales para bacterias, Eub9-27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') y Eub1542R (5' AGAAAGGAGGTGATCCAGCC 3') (Stackebrandt, 1993). Cada reacción de PCR de 50 µL contenía 2 µL del templado de ADN, 6 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,4 µL de Taq polimerasa (5 U/µL; GoTaq Flexi DNA Polymerase), 1 µL de dNTPs (10 mM), 1 µL de cada partidor (10 µM), 1 µL de BSA (10 mg/mL), 10 µL de 5X Buffer de PCR (Green GoTaq Flexi Buffer) y 27,6 µL de H₂O-MilliQ libre de nucleasas (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA).

El proceso de PCR se llevó a cabo con una desnaturalización inicial de 95°C durante 5 min, seguida de 30 ciclos con tres pasos: desnaturalización (95°C por 0,45 s), alineamiento (56°C por 30 seg), y extensión (72°C por 2 min). La extensión final se realizó a 72°C por 7 min.

Posteriormente, los productos de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) fueron verificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) y posteriormente se el producto de PCR fue purificado y secuenciado mediante secuenciación capilar utilizando un secuenciador de ADN

automatizado ABI Prism 3730XL (Applied Biosystems, Macrogen Inc., Korea), con los mismos partidores de PCR para la asignación a nivel de especie.

3.2.4 Análisis filogenético basado en el gen 16S rRNA

Las secuencias del gen 16 rRNA fueron analizadas y editadas utilizando el software BioEdit 7.2 (Hall, 1999). Para determinar el grado de similitud entre las secuencias obtenidas y las secuencias de bases de datos, se utilizó la herramienta NCBI BLAST (Altschul et al., 1990). Un aislado fue asignado a una especie cuando presentó una similitud igual o superior al 97% con la base de datos.

La construcción del árbol filogenético se llevó a cabo mediante algoritmos de unión de vecinos (Neighbour-Joining algorithms) (Saitou & Nei, 1987) con un modelo de sustitución de Tamura-Nei utilizando el software MEGA 11 (Tamura et al., 2021). Los alineamientos múltiples de todas las secuencias del gen 16S rRNA se realizaron mediante el algoritmo CLUSTALW (Alineamiento global pareado por algoritmo Needleman-Wunsch) (Larkin et al., 2007). Para evaluar la robustez del árbol filogenético, se realizaron 1000 Bootstrap (Felsenstein, 1981), lo que permitió obtener una estimación de la confiabilidad de las agrupaciones filogenéticas.

3.3 Detección de la producción de las enzimas de interés por los aislados halófilos y halotolerantes.

En esta sección, se llevó a cabo la detección de cepas productoras de enzimas basándose en la Tabla 1, que proporcionó una lista de posibles enzimas con potencial terapéutico en terapia enzimática.

Se seleccionaron las siguientes enzimas de interés, cada una con su respectiva actividad en la producción de amoníaco a partir de un aminoácido específico:

I. L-asparaginasa (ASNasa):

La L-asparaginasa es una enzima clasificada como asparaginasa EC 3.5.1.1, perteneciente a la clase de las hidrolasas. Su función es catalizar la hidrólisis de L-asparagina en ácido aspártico y amoníaco.

II. *L-glutaminasa (GL):*

La glutaminasa (EC 3.5.1.2) pertenece a la clase de las hidrolasas, más específicamente a la subclase de las amidohidrolasas. Su función es catalizar la hidrólisis del aminoácido L-glutamina en ácido glutámico y amoníaco.

III. *Arginina deiminasa (ADI):*

La arginina deiminasa (ADI) (EC 3.5.3.6) se clasifica como una enzima de la clase de las liasas, más precisamente como una amidinohidrolasa. Su actividad consiste en la conversión de la arginina en citrulina y amoníaco, mediante la hidrólisis de la guanidina de la arginina.

IV. *Glicina oxidasa (GO):*

La glicina oxidasa (EC 1.4.3.19) pertenece a la clase de las oxidoreductasas y se clasifica como una oxidoreductasa. Su función es catalizar la oxidación de la glicina a glicina desaminada (glicoxilato), generando peróxido de hidrógeno y amonio como subproductos.

V. *Serina desaminasa o Serina deshidratasa (SDH):*

La serina desaminasa (EC 4.3.1.17) pertenece a la clase de las liasas y su función es catalizar la deshidratación de serina a acrilato, amoníaco y agua.

VI. *Metioninasa o metionina gamma-liasa (MGL):*

La metioninasa (EC 4.4.1.11) pertenece a la clase de las liasas y su función es catalizar la desaminación de la metionina, para producir metilmercaptopiruvato (MMP) y amoníaco.

Método de ensayo rápido en placa: Este método se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Gulati et al., 1997. Se prepararon placas de prueba para determinar presencia y actividad de las distintas enzimas. Para ello, se realizó la inoculación de las cepas halotolerantes y halófilas en un medio M9 mínimo modificado con los siguientes componentes: KH_2PO_4 [3 g] + NaCl [20,5 g] + sustrato apropiado de aminoácidos (Según corresponda: Asn, Gln, Arg, Gli, Ser, Met) [5 g] + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [0,5 g] + $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [0,15 g] + Glucosa [2 g] + Agar [20 g] por litro de agua MilliQ a pH 7. Se complementó el medio con 0,009% de rojo fenol como indicador de pH. Las placas se incubaron a 37°C por 48 h y se establecieron placas no inoculadas como control.

Durante la reacción en las placas con los aminoácidos específicos, la producción de amonio resultante condujo a un cambio de color del indicador de pH de rojo fenol. Este cambio de color fue utilizado como una señal visual para determinar la presencia y actividad de las enzimas en las cepas evaluadas.

3.4 Ensayo cuantitativo de la actividad de las enzimas obtenidas

El ensayo cuantitativo de la producción de enzimas se realizó utilizando el medio líquido M9 modificado. Durante el trazado de las curvas de crecimiento, las muestras fueron incubadas en una incubadora de agitación orbital (MaxQ 4000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) a 250 rpm y 28°C. Para la detección de la actividad enzimática, se empleó el método de nesslerización directa.

El procedimiento consistió en combinar 25 µl de solución enzimática con 225 µl de PBS 1X (pH 7) y 250 µl de la solución de sustrato del aminoácido específico para la reacción, a una concentración de 10 mM. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 30 min. Posteriormente, se detuvo la reacción mediante la adición de 225 µl de ácido tricloroacético al 15% (p/v). Después de la centrifugación (13000 rpm, 15 min), se tomó 500 µl del sobrenadante y se mezcló con 500 µl de agua MilliQ y 125 µL de reactivo Nessler. El desarrollo del color tuvo lugar durante una incubación de 10 min.

Las muestras fueron agitadas en vórtex y se colocaron 200 µL de cada muestra en una placa de 96 pocillos para medir la absorbancia a 490 nm utilizando un espectrofotómetro visible en el lector de placas (MicroRead 1000. Global Diagnostics B, Geel, Bélgica). Para obtener una referencia, se trazó una curva estándar con diferentes concentraciones conocidas de amoníaco (Figura 2).

La actividad enzimática se expresó en Unidades Internacionales (UI), donde 1 UI equivale a la cantidad de amonio producido por la actividad de la enzima por minuto (Komathi et al., 2013).

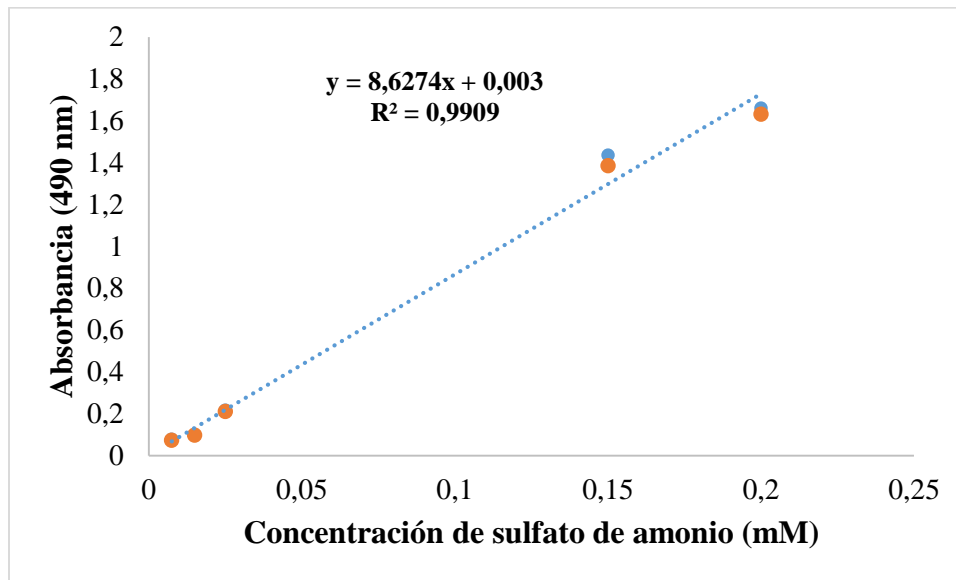


Figura 2. Curva de calibración del método de detección de sulfato de amonio.

3.5 Efecto del pH, concentración de NaCl y de la temperatura en la producción y actividad de enzimas de interés:

Se evaluaron las cepas que presentaron una mayor actividad de las enzimas de interés para estudiar el efecto de diferentes factores en la producción de dichas enzimas. Se utilizó el método de un factor a la vez (OFAT) en un medio de cultivo M9 modificado como medio basal. Se midió la actividad enzimática a las 0, 24, 48, 72 y 96h de incubación utilizando el reactivo de Nessler y se registró la absorbancia a 490 nm.

Los siguientes factores fueron estudiados:

1. El efecto de la temperatura: Se incubaron las cepas seleccionadas a diferentes temperaturas de 30°C, 37°C y 42°C.
2. pH óptimo de producción enzimática: El pH inicial del medio de cultivo fue ajustado a valores de pH 6, 7, 8.
3. Efecto de las concentraciones de NaCl: Se suplementó el medio de incubación con diferentes concentraciones de NaCl, incluyendo 0%; 1% y 2,5% (p/v).

3.6 Producción de enzimas de interés

Una vez establecidas las condiciones físico-químicas óptimas para la producción de las enzimas de interés, las cepas seleccionadas fueron cultivadas en Matraces Erlenmeyer de 500 mL

conteniendo 100 mL de medio M9 modificado con 5 g/L de cada sustrato específico (aminoácido). Las condiciones óptimas de pH (6.0-8.0), temperatura (30-42°C) y salinidad (0-2,5%) fueron ajustadas según las necesidades de las mejores cepas productoras de las enzimas potenciales, y los cultivos fueron incubados por 24 h con agitación a 200 rpm.

Después de la incubación, los cultivos se centrifugaron a 13000 rpm durante 30 min a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos se utilizaron como fuente de enzimas extracelulares. Se midió la actividad máxima y la concentración de proteínas presentes en los sobrenadantes.

3.7 Determinación de concentración de proteínas

La concentración de proteína se determinará mediante el Método Bradford (Bradford, 1976) utilizando suero de albúmina bovina como estándar.

3.8 Purificación de las enzimas de interés

La purificación de cada enzima se realizó a partir del sobrenadante obtenido, el cual fue filtrado utilizando filtros hidrofílicos PVDF de 0,22 μm (PureTech Syringe Filter). Posteriormente, se procedió a purificar las proteínas utilizando el sistema de cromatografía líquida de proteínas rápidas (FPLC) AKTA (Pharmacia Amersham Biotech).

1. Cromatografía de filtración en gel: Esta técnica separa las proteínas de acuerdo a su tamaño.

Se cargaron 500 μl de la muestra del sobrenadante en una columna Superdex 200 increase 10/300 gl (30 x 1 cm), que tiene un rango de separación para moléculas con pesos entre 10 a 600 kDa. Previamente, la columna se equilibró con tampón PBS 1X (pH 7,4). La elución de la proteína se realizó con el mismo tampón a una velocidad de flujo 0,75 mL min⁻¹.

En todas las fracciones obtenidas, se midió la actividad enzimática utilizando el método de Nessler, para identificar las fracciones que contenían la enzima purificada con máxima actividad. Estas fracciones fueron almacenadas a 4°C por un máximo de 2 semanas para su uso posterior.

3.9 Líneas celulares

Para el estudio de la actividad antitumoral in vitro, se utilizaron tres líneas celulares:

Las líneas celulares de melanoma (RQ y DFB), fueron gentilmente donadas por la Doctora Mercedes Lopez Nitsche (Cancer Regulation and Immunoediting Laboratory, Facultad de Medicina, Universidad de Chile) y la línea celular de cáncer de mama MCF-7, donada amablemente por la Doctora Lilian Jara Sosa (Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile) y se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta su posterior utilización.

El análisis de las enzimas en todas las líneas celulares se realizó en el laboratorio del Dr. Pablo Caviedes (Laboratorio de Terapia Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Chile).

El proceso de descongelación consistió en sumergir las células en un baño de agua a 37 °C durante 1 minuto, posteriormente, fueron sembradas en placas Petri de 10 cm de diámetro.

Para las líneas celulares de melanoma RQ y DFB, se utilizó un medio de cultivo compuesto por RPMI 1640, suplementado con 1 g/L de bicarbonato de sodio, 40 mg/L de gentamicina, 15 mM de HEPES y 10% de suero fetal bovino (FBS) a pH 7.4, y filtrado con una membrana de 0,2 µm.

Por otro lado, para la línea celular de cáncer de mama MCF-7, se empleó un medio de cultivo, conformado por Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 1 g/L de bicarbonato de sodio, 40 mg/L de gentamicina, 15 mM HEPES, 10% de FBS a pH 7.4 y filtrado con una membrana de 0,2 µm.

Las células fueron mantenidas en una incubadora a una atmósfera de 5% de CO₂ a una temperatura de 37 °C y 100% de humedad. Los medios de cultivo fueron renovados cada tres días hasta que las células alcanzaron confluencia adecuada para su uso en los ensayos de citotoxicidad y proliferación celular.

3.10 Ensayo de citotoxicidad por medición de viabilidad celular

Para evaluar la viabilidad celular y el efecto citotóxico de las enzimas obtenidas, se empleó el ensayo de metiltiazol tetrazolio (MTT) (Mosmann, 1983).

El cultivo celular se llevó a cabo en placas de 96 pocillos, donde se incubaron 10⁴ células en 200 µl de su medio (RPMI o DMEM) con 10% de FBS, durante 24 h a 37°C. Posteriormente, las células fueron lavadas con una solución de PBS 1X a pH 7,4, suplementada con glucosa (1,08 g/L), y luego se trataron con 135 µl de diferentes diluciones* de la enzima de interés en triplicado.

Estas diluciones incluyeron concentraciones iniciales del 90%,70% y 50% v/v). El control consistió en células sin tratamiento con su medio correspondiente.

*La actividad del 100% de cada enzima, se observa en la tabla 7, de esta manera los valores de la actividad de cada enzima diluida se considerarán con actividades nominales.

El periodo del tratamiento fue de 24 h, tras lo cual se agregaron 15 µl de reactivo MTT (2mg/mL) y se incubaron durante 3 h a 37°C. Posteriormente, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante para evitar arrastrar los cristales de formazán, y se adiciono 100 µl de DMSO. Se agito durante 5-10 minutos en un agitador de placas a 270 RPM a temperatura ambiente para homogeneizar los cristales en el DMSO. Finalmente, se realizó la lectura en el espectrofotómetro de placas (lector ELISA Titertek Multiskan MCC/340) a 540 nm.

Se consideró que la densidad óptica (DO) de las muestras de control representaba el 100 % de viabilidad, y a partir de esta referencia se calculó la viabilidad de las demás muestras utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{\text{OD células tratadas}}{\text{OD células control}} * 100$$

3.11 Ensayo de proliferación celular con marcador Ki67

Se usaron placas de 3,5 cm de diámetro para el cultivo celular. En cada placa, se incubaron 10⁶ células en 3 mL de medio, durante 24 h a 37°C. Después de este periodo, las líneas celulares se lavaron con solución de PBS 1X y se cultivaron durante otras 24 h con la exposición a diferentes concentraciones (90%, 70% y 50% v/v) de las enzimas de interés, utilizando 3 mL de medio en cada caso. Además, se utilizó un grupo de células sin enzimas como control.

Tras el tratamiento con las enzimas de interés, las líneas celulares se fijaron utilizando etanol al 75% y se mantuvieron a una temperatura de -20°C durante al menos 2 horas para su posterior utilización.

Para el ensayo de proliferación, se utilizó el marcador Ki67 (FITC Mouse Anti-Human Ki-67 Set, Cat. 556026) siguiendo las instrucciones del fabricante (BD Pharmingen) con algunas modificaciones. Las células fijadas con etanol 75%, se incubaron durante 2 horas con el anticuerpo conjugado con FITC para marcar Ki67, y luego se cuantificaron mediante Citometría de flujo (CF).

La expresión de Ki67 se definió como el porcentaje de células vivas marcadas. En cada muestra, se registraron diez mil eventos por tubo. Además, se utilizó un control de isotipo (Mouse IgG1, κ Isotype Control) correspondiente para el marcador, con el fin de corregir el fondo y asegurar la identificación precisa de células positivas reales.

3.12 Análisis estadístico

los análisis estadísticos de la viabilidad celular, se realizaron utilizando el software R 4.3.1. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar medido (SEM). Se aplicó una prueba de Dunnett para evaluar la significación estadística. Los valores de $p \leq 0,05$ se indican con *, los valores de $p \leq 0,01$ se indican con ** y los valores de $p \leq 0,001$ se indican con ***, lo que se consideró como estadísticamente significativo.

Para el cálculo de los valores EC50, se utilizó el Software OriginalPro 2023b, empleando la planilla de dosis-respuesta farmacológica para el ajuste de curvas.

En cuanto al análisis de proliferación, se realizó un análisis estadístico utilizando el software R 4.3.1. Se aplicó un ANOVA para identificar diferencias significativas entre los grupos de tratamiento basadas en el porcentaje de Ki67. Posteriormente, se llevó a cabo una prueba de comparaciones múltiples de Tukey para determinar diferencias significativas entre los pares de grupos. Los resultados se visualizaron mediante gráficos de barras utilizando el paquete 'ggplot2'.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento e identificación de bacterias halófilas y halotolerantes de muestras del Desierto de Atacama

En el presente estudio, se realizó análisis de dos muestras provenientes de dos sitios de estudio distintos (Valle de la luna y Salar de Tara) provenientes del Desierto de Atacama, con el objetivo de aislar e identificar microorganismos halófilos y halotolerantes presentes en las muestras de suelos extremos.

Se obtuvieron un total de 48 aislados de estas muestras de suelos, de los cuales 37 aislados corresponden de la muestra del Valle de la luna y 11 aislados de la muestra del Salar de Tara (Tabla 3).

En cuanto a la tolerancia a la salinidad, los aislados fueron clasificados según la concentración máxima de NaCl en el entorno de su aislamiento. De los cuales, 22 aislados no lograron crecer en salinidades superiores a 10%, los que fueron clasificados como halotolerantes, 15 aislados demostraron una capacidad de crecer hasta salinidades del 15%, siendo clasificados como halófilos moderados. Por último, 11 aislados crecieron de manera óptima en salinidades del 20%, los que se consideraron como halófilos extremos.

En cuanto a la tolerancia a la salinidad, los aislados fueron clasificados según la concentración máxima de NaCl en el entorno de su aislamiento. De los cuales, 22 aislados no lograron crecer en salinidades superiores al 10%, siendo clasificados como halotolerantes. Por otro lado, 15 aislados demostraron la capacidad de crecer hasta salinidades del 15%, siendo considerados como halófilos moderados. Finalmente, 11 aislados exhibieron un crecimiento óptimo en salinidades del 20%, clasificándolos como halófilos extremos.

Tabla 3. Cepas halotolerantes y halófilas aisladas de dos sitios de estudio y diferentes condiciones de cultivo (pH y NaCl).

Cepa	Muestra	Condiciones de crecimiento		Halófilo moderado (HM)/ Halófilo extremo (HE)/ Halotolerantes (HA)
		%NaCl	pH	
VL 1	Valle de la Luna	10	9	HA
VL 2	Valle de la Luna	15	9	HM
VL 3	Valle de la Luna	10	9	HA

VL 4	Valle de la Luna	10	9	HA
VL 5	Valle de la Luna	10	9	HA
VL 7	Valle de la Luna	10	9	HA
VL 8	Valle de la Luna	10	7	HA
VL 10	Valle de la Luna	15	7	HM
VL 11	Valle de la Luna	15	7	HM
VL 12	Valle de la Luna	15	7	HM
VL 13	Valle de la Luna	10	7	HA
VL 14	Valle de la Luna	10	9	HA
VL 16	Valle de la Luna	10	9	HA
VL 17	Valle de la Luna	10	9	HA
VL 20	Valle de la Luna	15	7	HM
VL 21	Valle de la Luna	15	7	HM
VL 22	Valle de la Luna	15	7	HM
VL 23	Valle de la Luna	15	7	HM
VL 24	Valle de la Luna	15	7	HM
VL 25	Valle de la Luna	15	7	HM
VL 26	Valle de la Luna	15	7	HM
VL 27	Valle de la Luna	15	7	HM
VL 28	Valle de la Luna	15	7	HM
VL 29	Valle de la Luna	15	7	HM
VL 30	Valle de la Luna	10	7	HA
VL 31	Valle de la Luna	10	7	HA
VL 32	Valle de la Luna	10	7	HA
VL 33	Valle de la Luna	10	7	HA
VL 34	Valle de la Luna	10	9	HA
VL 35	Valle de la Luna	10	9	HA
VL 36	Valle de la Luna	10	7	HA
VL 37	Valle de la Luna	10	7	HA
VL 38	Valle de la Luna	10	7	HA
VL 39	Valle de la Luna	10	7	HA
VL 40	Valle de la Luna	10	7	HA
VL 41	Valle de la Luna	10	7	HA
VL 42	Valle de la Luna	15	7	HM
ST 1	Salar de Tara	20	7	HE
ST 2	Salar de Tara	20	7	HE
ST 3	Salar de Tara	20	7	HE
ST 4	Salar de Tara	20	7	HE
ST 5	Salar de Tara	20	7	HE
ST 6	Salar de Tara	20	7	HE
ST 7	Salar de Tara	20	7	HE
ST 8	Salar de Tara	20	7	HE
ST 9	Salar de Tara	20	7	HE
ST 10	Salar de Tara	20	7	HE
ST 11	Salar de Tara	20	7	HE

Para lograr una selección específica de las cepas, se utilizaron diferentes condiciones de cultivo, variando el pH y la salinidad en las placas de cultivo, permitiendo en consecuencia, el desarrollo

y crecimiento selectivo de cepas halotolerantes y halófilas, como se evidencia en los resultados de la caracterización filogenética de cada cepa (Figura 3).

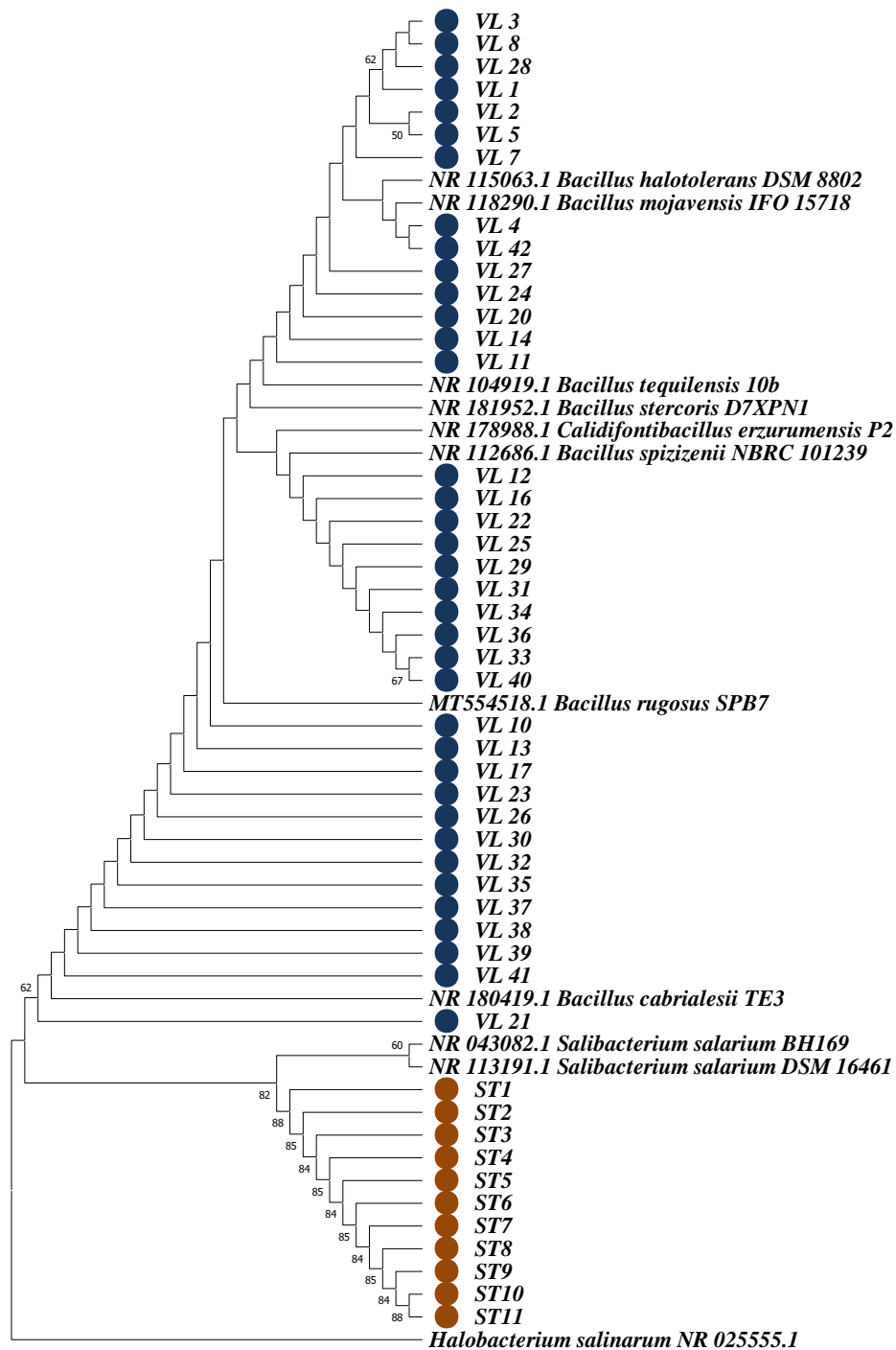


Figura 3. Árbol filogenético ARN 16S

Árbol filogenético de unión de vecinos basado en las secuencias de ARN 16S de los 48 aislados de dos sitios de estudio (Valle de la Luna [VL] y Salar de Tara [ST]) y sus especies estrechamente relacionadas. El árbol se construyó utilizando el algoritmo Neighbor-Joining y el modelo de sustitución de Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993). La Archa *Halobacterium salinarum*

NR_025555.1 se utilizó como grupo externo. Están presentes valores de Bootstrap sobre el 50%. ● Microorganismos aislados de VL. ● Microorganismos aislados de ST.

En base al análisis molecular, se identificó que las bacterias aisladas pertenecían principalmente a los géneros *Salibacterium*, *Calidifontibacillus* y *Bacillus*, siendo este último, el más representativo entre los aislados (Figura 3). El género *Bacillus*, ha sido ampliamente representado en varios estudios relacionados al aislamiento y caracterización de microorganismos provenientes de ambientes altamente desérticos y salinos (Ren & Zhou, 2005; Jiang et al., 2006; Genderjahn et al., 2018). Por otro lado, el género *Salibacterium* se ha descrito, como aislados específicamente en ambientes salinos (Vishnuvardhan et al., 2015; Singh et al., 2018, Wang et al., 2018), lo que indicaría que el aislamiento de bacterias halófilas fue correcto en este estudio. Finalmente, el género *Calidifontibacillus*, es un género aislado de ambientes termales en Turquía (Adiguzel et al., 2020), donde su obtención fue a partir de un medio con concentraciones de 5% de NaCl, lo que indicaría su halotolerancia a la salinidad.

En la figura 3, se observa un claro agrupamiento de los aislados según las muestras de sitio de estudio de origen. Las muestras del Salar de Tara (ST) se agrupan en un cluster altamente similar a la especie *Salibacterium salarium*, una bacteria halófila formadora de esporas aislada de un lago salado en China (Lim et al., 2006). Cabe destacar, que todos los aislados de la muestra obtenida del Salar de Tara, crecieron en medios con una salinidad del 20% (Tabla 3), lo que sugiere que estos aislados, junto con su identificación y alta similitud con *Salibacterium salarium*, podrían ser clasificados como halófilos extremos.

Por otro lado, el segundo cluster observado en la Figura 3, indica un agrupamiento de todos los aislados obtenidos de la muestra perteneciente al Valle de la luna. Estos aislados, muestran una alta similitud con especies que han sido aisladas en condiciones extremas o salinas. Por ejemplo, se encuentran especies como *Bacillus Halotolerans*, aislada de un suelo árido en Marruecos (Delaporte & Sasson, 1967), *Bacillus Mojavensis*, bacteria aislada de suelos desérticos (Roberts et al., 1994) y ambientes marinos (Ma et al, 2012), *Bacillus stercolis*, aislados de ambientes marinos (Rath et al., 2022) y en una mina de cobre (Majhi et al., 2022), *Calidifontibacillus erzurumensis* mencionado anteriormente como una especie aislada de una fuente termal en Turquía (Adiguzel et al., 2020), *Bacillus rugosus*, aislada de la esponja marina *Spongia officinalis* (Bhattacharya et al., 2020), *Bacillus spizizenii*, aislado del Océano Indico (Fan et al., 2011) y *Bacillus tequilensis*, un aislado obtenido de un tumba en México de hace 2000 años de antigüedad (Gatson et al., 2006)

y de un lago salobre (Pradhan et al., 2013). Esta alta similitud con especies aisladas de ambientes extremos y salinos, sumado al aislamiento en este estudio en condiciones de salinidad entre 10-15% de NaCl, indica la presencia de bacterias halotolerantes y halófilas moderadas.

Los resultados del análisis molecular de los microorganismos aislados en este estudio proporcionan información valiosa sobre la diversidad de microorganismos halotolerantes y halófilos presentes en los sitios de estudio analizados, lo que indica su adaptación a condiciones extremas y salinas. Estos hallazgos tienen una importancia fundamental, ya que indican que todos los aislados obtenidos en este estudio, provenientes de suelos en condiciones extremas, podrían ser de gran interés para la producción de nuevas enzimas con potencial terapéutico. La capacidad de estos microorganismos para adaptarse a condiciones poliextremas sugiere que podrían sintetizar compuestos naturales únicos que podrían ser explorados para aplicaciones en terapia enzimática. (Giddings et al., 2015; Corral et al., 2019).

4.2 Producción y purificación de enzimas anticancerígenas de bacterias halófilas y halotolerantes.

4.2.1 Producción

Se evaluó por método rápido en placa, la capacidad de producción de distintas enzimas en los 48 aislados caracterizados como halófilos o halotolerantes. De estos aislados, 48, 24, 5, 17, 48 y 6 fueron capaces de producir asparaginasa, glutaminasa, serina desaminasa, glicina oxidasa, arginina deiminasa y metioninasa, respectivamente (Tabla 4).

Cabe destacar que, en este ensayo solo podemos observar cambios de pH (color en el medio), que ocurren cuando las cepas, en un medio que contiene un aminoácido específico como sustrato, logra sintetizar la enzima capaz de convertir ese aminoácido en un producto como el amonio (Figura 4). Por ejemplo, la cepa halotolerante VL8 es productora de l-asparaginasa (A), ya que se observa un leve cambio de color en la placa (rosado), pero no sintetiza l-glutaminasa (B), donde no se observa cambio de color en el medio.

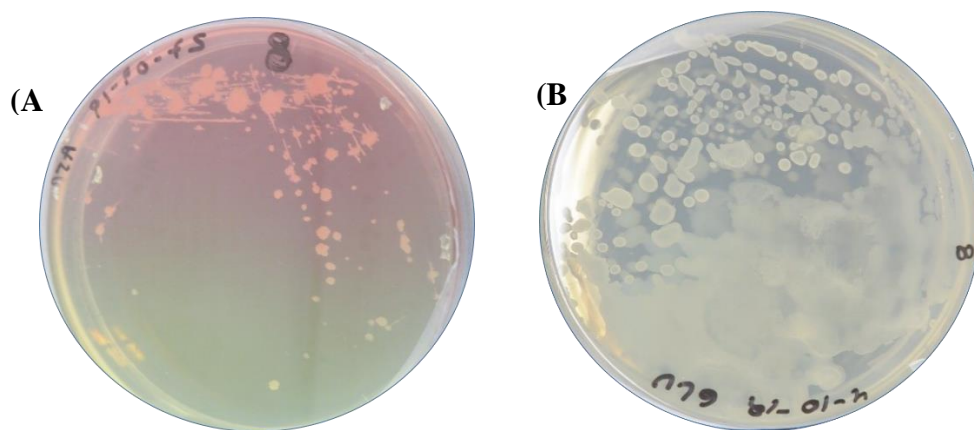


Figura 4. Método de ensayo rápido en placa.

Cepa halotolerante VL8. (A) l-asparaginasa positivo. (B) l-glutaminasa negativo.

La mayoría de las cepas que lograron sintetizar enzimas de interés resultaron ser halófilas. Las enzimas asparaginasa y arginina deiminasa fueron las más comunes en todos los aislados (100%). Solo la cepa VL14 logró sintetizar las 6 enzimas evaluadas en placa (2,1%). VL2 sintetizó 5 enzimas (2,1%), 10 aislados lograron sintetizar 4 enzimas evaluadas (20,8%), 25 aislados sintetizaron al menos 3 enzimas (52%) y los 11 aislados restantes, sintetizaron al menos 2 enzimas de interés (23%) (Tabla 4). Estudios previos, ha informado sobre la capacidad de síntesis de más de una enzima que cataliza su reacción con sustratos de aminoácidos en distintos microorganismos halófilos y halotolerantes (Zolfaghar et al., 2019). Sin embargo, es relevante destacar que, en este estudio, las cepas aisladas del sitio de estudio Salar de Tara, presentaron alta similitud con la bacteria *Salibacterium salarium*, la cual hasta el momento no ha demostrado evidencia de producir este tipo de enzimas en particular.

Tabla 4. Producción de enzimas de cada aislado, evaluado en ensayo rápido en placa.

Cepa	Asparaginasa	Glutaminasa	Serina desaminasa	Glicina oxidasa	Arginina deiminasa	Metioninasa
VL 1	+	-	-	-	+	-
VL 2	+	+	+	+	+	-
VL 3	+	+	-	-	+	-
VL 4	+	+	-	-	+	-
VL 5	+	+	-	-	+	-
VL 7	+	-	+	-	+	-
VL 8	+	-	+	-	+	-
VL 10	+	-	+	-	+	-
VL 11	+	-	-	-	+	-
VL 12	+	-	-	-	+	-
VL 13	+	-	-	+	+	-

VL 14	+	+	+	+	+	+
VL 16	+	+	-	+	+	-
VL 17	+	+	-	+	+	-
VL 20	+	+	-	+	+	-
VL 21	+	+	-	+	+	-
VL 22	+	+	-	+	+	-
VL 23	+	+	-	+	+	-
VL 24	+	+	-	-	+	-
VL 25	+	+	-	-	+	-
VL 26	+	+	-	-	+	+
VL 27	+	-	-	-	+	+
VL 28	+	+	-	+	+	-
VL 29	+	-	-	+	+	-
VL 30	+	-	-	+	+	-
VL 31	+	-	-	-	+	-
VL 32	+	-	-	-	+	-
VL 33	+	-	-	+	+	+
VL 34	+	-	-	+	+	-
VL 35	+	+	-	-	+	+
VL 36	+	-	-	-	+	-
VL 37	+	-	-	-	+	-
VL 38	+	-	-	-	+	-
VL 39	+	-	-	-	+	-
VL 40	+	-	-	-	+	+
VL 41	+	-	-	+	+	-
VL 42	+	-	-	-	+	-
ST 1	+	-	-	+	+	-
ST 2	+	+	-	-	+	-
ST 3	+	+	-	-	+	-
ST 4	+	-	-	-	+	-
ST 5	+	+	-	-	+	-
ST 6	+	-	-	+	+	-
ST 7	+	+	-	-	+	-
ST 8	+	+	-	-	+	-
ST 9	+	+	-	-	+	-
ST 10	+	+	-	-	+	-
ST 11	+	+	-	-	+	-

Tras obtener resultados positivos mediante el método rápido en placa en la identificación de la síntesis de las enzimas de interés, se procedió a evaluar la actividad enzimática utilizando el método cuantitativo de nesslerización en el sobrenadante de los medios de cultivo iniciales de cada cepa. El objetivo fue obtener únicamente enzimas extracelulares para posterior producción y purificación. La primera evaluación, reveló que solo 5 enzimas fueron producidas de manera extracelular; asparaginasa, glutaminasa, serina desaminasa, glicina oxidasa y arginina deiminasa.

Sin embargo, la enzima metioninasa no presentó actividad en el sobrenadante, lo que sugiere que esta enzima en particular solo se sintetiza de forma intracelular en los aislados positivos.

Estudios previos sobre la caracterización de la enzima metioninasa en distintos microorganismos, han indicado que en especies bacterianas se sintetiza como una enzima intracelular (Tanaka et al., 1976, El-Sayed, 2010), lo que respalda los resultados obtenidos en este estudio y proporciona una comprensión adicional de las respuestas metabólicas y adaptaciones específicas de estos microorganismos halófilos y halotolerantes en condiciones extremas.

Este conocimiento podría orientar futuras investigaciones sobre la enzima metioninasa y su función en la adaptación de estos microorganismos a entornos salinos, con posibles implicaciones significativas en diversos campos, incluyendo la aplicación potencial de estas enzimas en terapia enzimática.

4.2.2 Efectos de pH, temperatura y NaCl en la producción de enzimas de interés y la actividad enzimática

Se seleccionaron cepas potenciales, en función de su capacidad para producir las enzimas extracelulares con mayor actividad enzimática, de un total de 5 enzimas evaluadas (Tabla 5). Los resultados indicaron que 4 cepas halófilas, ST5, ST9, VL2 y ST6, fueron capaces de sintetizar 4 enzimas (asparaginasa, glutaminasa, serina desaminasa y glicina oxidasa, respectivamente) con mayor actividad enzimática (IU/ml), mientras que solo una cepa halotolerante, VL13, sintetizó una enzima (arginina deiminasa) con mayor actividad enzimática.

Las cepas seleccionadas, cuyas secuencias fueron analizadas en NCBI, se identificaron por su alta similitud (%) con *Bacillus stercoris* para la cepa VL2, *Bacillus rugosus* para la cepa VL13 y *Salibacterium salarium* para las cepas ST5, ST6 y ST9.

Tabla 5. Cepas seleccionadas productoras de enzimas con mayor actividad

Enzima	Cepa	Cepa de tipo más cercano	Semejanza (%)
Asparaginasa (ASNasa)	ST5	<i>Salibacterium salarium</i>	98,69
Glutaminasa (GL)	ST9	<i>Salibacterium salarium</i>	98,69
Serina desaminasa (SDH)	VL2	<i>Bacillus stercoris</i>	98,41
Glicina oxidasa (GO)	ST6	<i>Salibacterium salarium</i>	98,48
Arginina deiminasa (ADI)	VL13	<i>Bacillus rugosus</i>	99,86

Posteriormente, se realizaron cultivos iniciales por triplicado en viales de 20 mL con 8 mL de medio de cultivo M9 y su correspondiente aminoácido como sustrato para cada enzima. Los cultivos se llevaron a cabo a una salinidad inicial del 0,5% de NaCl y pH 7, con agitación constante a 250 rpm. Utilizando el método de un factor a la vez, se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 6 (Anexo A). Estas condiciones de crecimiento permitieron obtener la mayor actividad enzimática para cada enzima, lo que fue utilizado para su posterior producción y purificación.

Tabla 6. Condiciones de crecimiento de las cepas seleccionadas para mayor actividad enzimática.

Enzima	Cepa	Temperatura Máxima	pH Máximo	%NaCl Máximo
Asparaginasa (ASNasa)	ST5	42	6	2,5%
Glutaminasa (GL)	ST9	37	6	1,0%
Serina desaminasa (SDH)	VL2	42	8	2,5%
Glicina oxidase (GO)	ST6	37	8	2,5%
Arginina deiminasa (ADI)	VL13	37	8	0,0%

Las enzimas asparaginasa, glutaminasa y arginina deiminasa, han sido ampliamente estudiadas y aisladas de distintos microorganismos debido a su relevancia en terapia enzimática y diversas aplicaciones biotecnológicas (Nandakumar et al., 2003; Cachumba et al., 2016; Kawatra et al., 2022). La caracterización de estas enzimas obtenidas de distintos microorganismos, indican la amplitud de su actividad en relación a pH y temperatura. Cabe destacar que las condiciones de pH y temperatura presentadas en la Tabla 6 corresponden a las condiciones de crecimiento del microorganismo y no reflejan necesariamente los óptimos de actividad enzimática. Este dato es particularmente relevante al considerar las enzimas purificadas, las cuales podrían presentar condiciones óptimas de actividad diferentes a las condiciones de crecimiento del microorganismo (Alföldi & Kerekes, 1968; Nishiya & Imanaka, 1998). Por otro lado, serina desaminasa y glicina oxidasa, son enzimas pocos estudiadas en relación a estudios en terapia enzimática. Sin embargo, su purificación y caracterización ya ha sido descrita en otros microorganismos bacterianos (Alföldi & Kerekes, 1968; Nishiya & Imanaka, 1998).

Cabe destacar que las cuatro enzimas purificadas de los microorganismos halófilos presentaron una actividad máxima en presencia de NaCl (1-2,5%), en comparación con la enzima proveniente del microorganismo halotolerante (VL13), cuya actividad máxima se observó en ausencia de salinidad. Sin embargo, la enzima de VL13 también mostro actividad en salinidades de 1 y 2,5% (Anexo A). Este hecho es relevante de considerar en la obtención de estas enzimas, ya que, por

ejemplo, las L-asparaginasas derivadas de *E. coli* y *E. chrysanthemi*, las que hoy en día son utilizadas en terapia enzimática, pierden significativamente su actividad (40% y 80%, respectivamente) en solución salina al 0,9% (osmolaridad similar a la del suero humano) (Werber et al. 1997). Esta pérdida de actividad conlleva a aumentar las dosis de la enzima en el tratamiento, lo que se ha asociado con una mayor incidencia de efectos adversos en los pacientes, como hipersensibilidad, alergias e inmunogenicidad aumentada (Oettgen et al., 1970). Por lo tanto, la actividad enzimática combinada con la estabilidad favorable en condiciones similares al suero humano sería beneficioso, ya que permitiría la administración de menor cantidad de la enzima para alcanzar la actividad deseada, reduciendo así la probabilidad de efectos adversos relacionados con la terapia enzimática. Estudios previos han demostrado que niveles más bajos de antígeno en la terapia están asociados con menor incidencia de reacciones adversas y toxicidad (Korver et al., 1987; Young et al., 1978). Estos antecedentes, en resumen, indican la potencialidad de estas cinco enzimas en ser utilizadas para los ensayos posteriores debido a su estabilidad en ambientes salinos.

4.2.3 Purificación

Una vez establecidas las condiciones de cultivo para la producción de las enzimas de interés, se procedió a la purificación mediante cromatografía en gel utilizando los sobrenadantes obtenidos en el cultivo de cada enzima. Además, se midió la actividad enzimática mediante el método de nesslerización, antes y después de la purificación, para evaluar la correcta purificación en las fracciones obtenidas.

La purificación de las 5 enzimas se logró correctamente, como se aprecia en la Figura 5, donde se observan los distintos peak de elución de absorbancia a 280 nm correspondiente a cada fracción cromatográfica (1, 2, 3, 4 y 5). Posteriormente, se confirmó su actividad enzimática a través de la cuantificación por nesslerización de las fracciones obtenidas (Figura 5, (A), (B), (C), (D) y (E)), y los resultados se encuentran detallados en la tabla 7. Se observó un aumento en la actividad enzimática (U/ml) de cada enzima. Las enzimas glicina oxidasa, serina desaminasa, asparaginasas, arginina desaminasa y glutaminasa aumentaron su actividad en 18, 6, 3, 2,5 y 2 veces su actividad enzimática, respectivamente, en comparación con la actividad de las enzimas no purificadas.

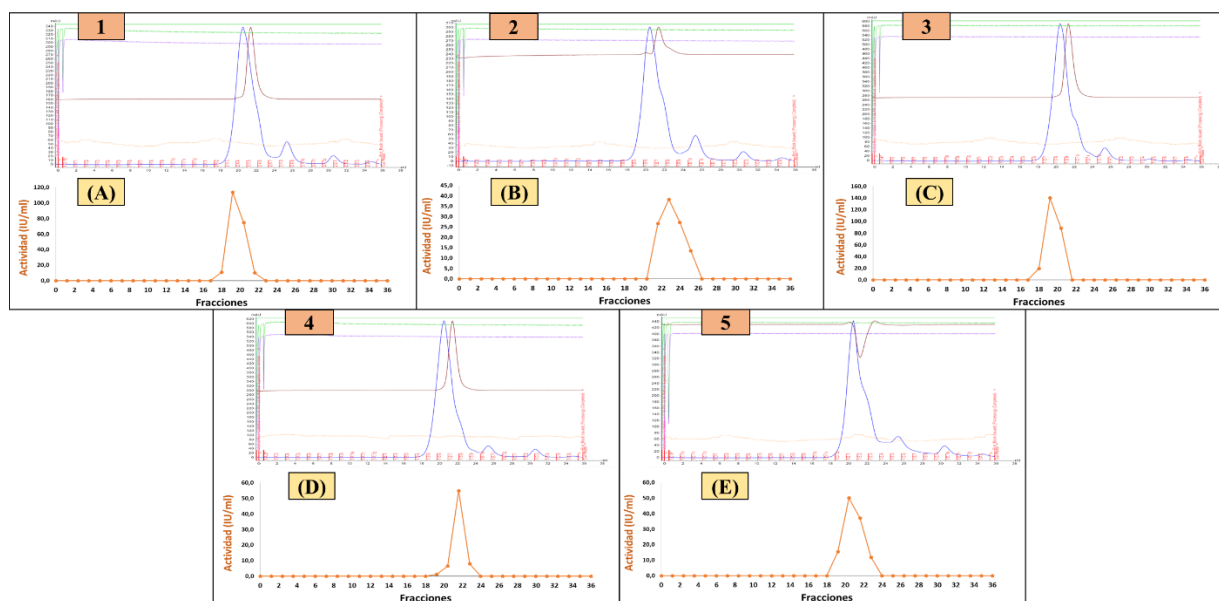


Figura 5. Perfil cromatográfico de enzimas purificadas por filtración en gel.

(1) Asparaginasa, (2) Glutaminasa, (3) Serina desaminasa, (4) Glicina oxidasa y (5) Arginina deiminasa. Actividad enzimática de las fracciones obtenidas en la purificación, (A) Asparaginasa, (B) Glutaminasa, (C) Serina desaminasa, (D) Glicina oxidasa, y (E) Arginina deiminasa.

Tabla 7. Actividad enzimática antes y después de la etapa de purificación por cromatografía de exclusión molecular.

Enzima	Actividad inicial (IU/ml) (antes de la purificación)	Actividad final (IU/ml) (después de la purificación)	Fracción actividad máx.
Asparaginasa	39,3	182,4	19
Glutaminasa	17,9	914,8	22
Serina desaminasa	23,1	410,6	19
Glicina oxidasa	3,04	135,6	22
Arginina deiminasa	20,2	182,4	20

Es relevante destacar que, en este estudio, no se pudo determinar el peso molecular de cada enzima mediante SDS-PAGE debido a la baja concentración de las enzimas en las eluciones en fracción. A pesar de esta limitación, es posible comparar los resultados obtenidos con estudios previos que han abordado la caracterización de estas enzimas purificadas a partir de bacterias.

Para la enzima asparaginasa, se ha reportado una amplia variedad en los tamaños de proteínas purificadas, oscilando entre 25 a 170 kDa (Chand et al., 2020). En el caso de la glutaminasa, estudios previos indican tamaños aproximados entre 33 a 148,8 kDa (Amobonye et al., 2019). La arginina deiminasa ha sido descrita con tamaños entre 46 a 55 kDa (Kawatra et al., 2022), mientras

que para la glicina oxidasa, los tamaños de proteínas purificadas se encuentran en un rango de 42 a 159 kDa (Nishiya & Imanaka, 1998; Martínez-Martínez et al., 2006). Por último, la serina deiminasa ha sido informada con tamaños aproximados entre 30 a 60 kDa (Xu et al., 2011; Urusova et al., 2012).

Estos hallazgos nos permiten inferir que las enzimas purificadas en este estudio podrían tener tamaños similares a los informados previamente, a pesar de no haber podido determinarlos en este trabajo. La purificación exitosa de estas enzimas y su correspondiente actividad enzimática resaltan su potencial para ser evaluados a continuación como posible aplicación en terapia enzimática.

4.3 Medición de la toxicidad de las enzimas de interés en líneas celulares

El tercer objetivo de este estudio se relaciona en estudiar el efecto de las enzimas purificadas (asparaginasa, glutaminasa, serina desaminasa, glicina oxidasa y arginina deiminasa) en tres líneas celulares (melanoma RQ y DFB y cáncer de mama MCF-7), para evaluar su capacidad anticancerígena.

Se utilizó el ensayo MTT (Metiltiazol tetrazolio), el cual es una técnica ampliamente utilizada, para evaluar la viabilidad y la actividad anticancerígena de compuestos o tratamientos en células cancerosas in vitro. Este ensayo colorimétrico se basa en la capacidad de las células vivas en reducir el MTT a un producto de color formazán (violeta) insoluble en agua, que se cuantifica mediante espectrofotometría y proporciona una medida indirecta de la viabilidad celular. Las células viables entonces, reducirán MTT y producirán mayor nivel de formazán en comparación con las células dañadas o muertas

Una vez cultivadas las células, se examinó la actividad citotóxica de las cinco enzimas purificadas en las tres líneas celulares (mencionadas con anterioridad) a las 24 horas de exposición y utilizando el ensayo MTT para su evaluación.

En general, se observó una disminución significativa en la viabilidad celular en las líneas celulares tratadas con las enzimas obtenidas, en comparación con los controles no tratados (Figura 6). La concentración efectiva máxima (EC_{50}) (la actividad enzimática se expresa en IU/ml nominales, respecto a la actividad de la enzima medida del 100% [datos en Tabla 7]), que representa la

concentración de cada enzima requerida para obtener una inhibición del 50% en la viabilidad celular, varió entre las distintas enzimas y las líneas celulares probadas (Tablas 8 y 9) (Anexo B).

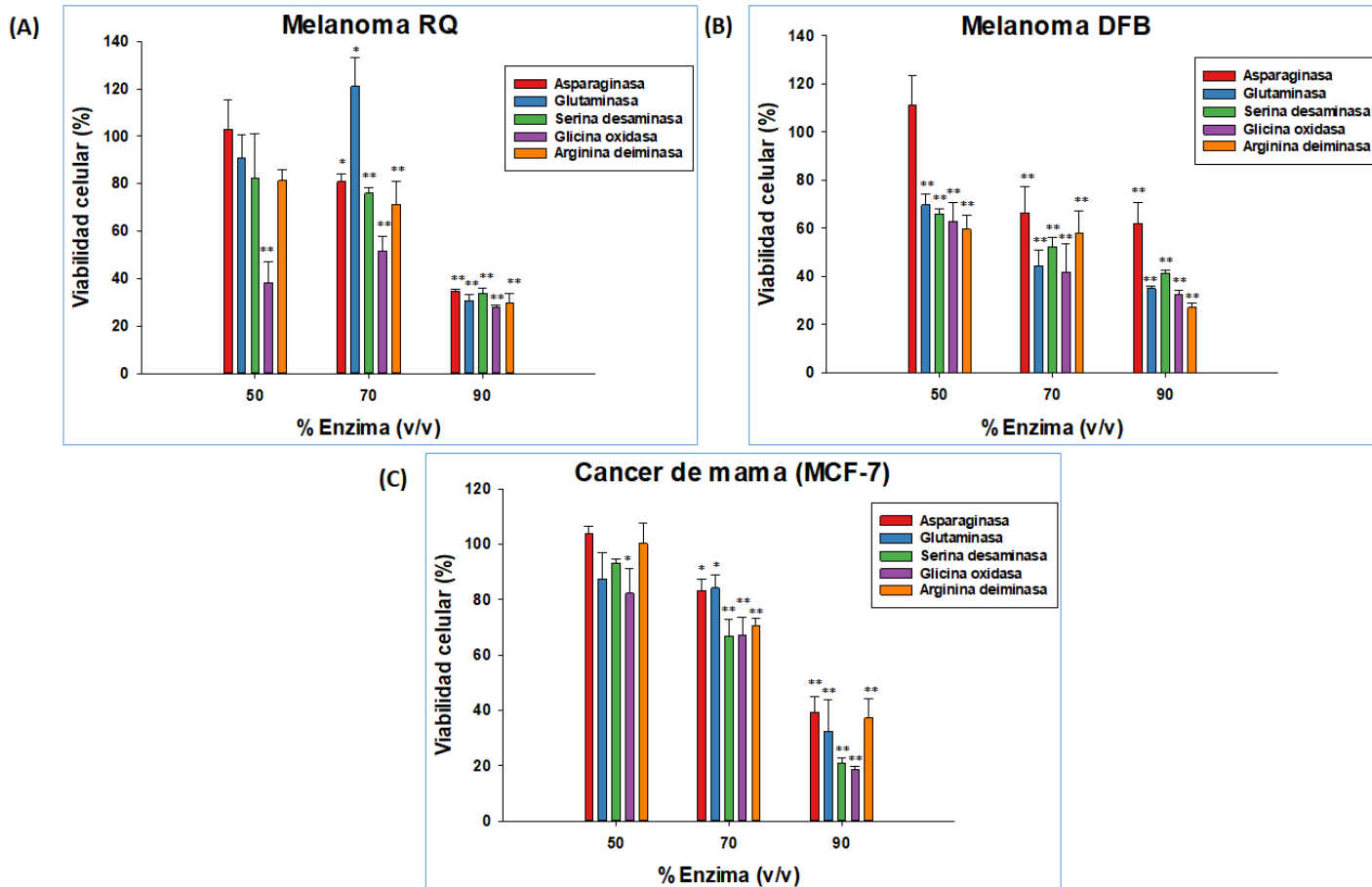


Figura 6. Citotoxicidad mediante ensayo MTT.

La muerte celular fue inducida por Asparaginasa, Glutaminasa, Serina desaminasa, Glicina oxidasa y Arginina deiminasa (50, 70 y 90%) en células de melanoma RQ (A), melanoma DFB (B) y MCF7 (C). (* $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$ en comparación con el grupo de control correspondiente).

La enzima asparaginasa mostró una actividad similar en EC_{50} en las tres líneas celulares (100-101,1 IU/ml), lo que sugiere un efecto citotóxico significativo en distintos tipos de cáncer. Por otro lado, la enzima glutaminasa exhibió una mayor citotoxicidad en las líneas celulares de melanoma RQ y DFB (456,4 y 415,02 IU/ml respectivamente) en comparación con la línea celular MCF-7 (702 IU/ml), lo que indicaría que esta enzima puede ser más efectiva en ciertos tipos de melanoma.

La enzima serina desaminasa y la arginina deiminasa demostraron una variación en la citotoxicidad según la línea celular a la que se expusieron. La serina desaminasa, muestra mayor citotoxicidad en la línea celular de melanoma RQ (242,4 IU/ml) seguido MCF-7 (284,5 IU/ml) y melanoma DFB (318,02 IU/ml), mientras que arginina deiminasa, posee mayor efecto citotóxico en

melanoma RQ (118 IU/ml), seguido de MCF-7 (126 IU/ml) y melanoma DFB (145 IU/ml), lo que sugiere que el efecto anticancerígeno de estas enzimas puede depender del tipo específico de células malignas. Finalmente, la enzima glicina oxidasa mostró una elevada citotoxicidad en la línea celular de melanoma DFB (47,2 IU/ml) en comparación a melanoma RQ y MCF-7 (69,3 y 101 IU/ml), lo que sugiere que esta enzima puede ser más efectiva en este tipo particular de melanoma.

Tabla 8. Ensayo de viabilidad celular EC₅₀ expresado en la actividad enzimática (IU/ml) nominal.

Línea celular	EC50 [Actividad (IU/ml)]				
	Asparaginasa	Glutaminasa	Serina desaminasa	Glicina oxidasa	Arginina deiminasa
Melanoma RQ	100	456,4	242,4	69,3	118
Melanoma DFB	101	415,02	318,02	47,2	145
MCF-7	101,1	702	284,5	101	126

Tabla 9. Viabilidad celular EC₅₀ en % nominal de la enzima de interés

Línea celular	EC50 [% Enzima (v/v)]				
	Asparaginasa	Glutaminasa	Serina desaminasa	Glicina oxidasa	Arginina deiminasa
Melanoma RQ	54,8	49,9	53,04	51,1	64,7
Melanoma DFB	55,4	45,4	77,4	34,8	79,5
MCF-7	55,4	76,7	69,3	74,5	69,1

Los resultados del ensayo MTT revelan la alta eficacia de las cinco enzimas purificadas de microorganismos halófilos y halotolerantes aislados de sitios de estudio del desierto de atacama. Estas enzimas mostraron una inhibición significativa en la viabilidad de las líneas celulares de cáncer analizadas, destacando la potencialidad de estas enzimas como agentes anticancerígenos en las tres líneas celulares evaluadas.

Las enzimas purificadas de microorganismos halófilos y halotolerantes han demostrado ser altamente prometedoras en investigaciones previas debido a su adaptación a condiciones salinas y su potencial para producir enzimas con propiedades únicas y específicas (Corral et al., 2019; Vijayakumar, 2021). Varios estudios se han centrado en la búsqueda, aislamiento y caracterización de tres enzimas principales (asparaginasa, glutaminasa y arginina deiminasa) a partir de microorganismos halófilos y halotolerantes (Shirazian et al., 2016; Zolfaghar et al., 2016; Ghasemi

et al., 2017; Zolfaghar et al., 2019). Además, diversos estudios han demostrado los efectos citotóxicos sobre células cancerosas de estas enzimas.

En relación a la enzima l-asparaginasa, Ghasemi et al., (2017) estudiaron una asparaginasa recombinante proveniente de la bacteria halófila *Halomona elongata*, demostrando su citotoxicidad en las líneas celulares de leucemia humana Jurkat y U937, con IC₅₀ de 2 y 1 U/ml, respectivamente. Otro estudio realizado por El-Fakharany et al., (2022) mostro que la l-asparaginasa purificada a partir de *Bacillus halotolerans*, exhibió efecto citotóxico en tres tipos diferentes de carcinoma, una línea celular de leucemia, cáncer de mama y hepatoma, sin afectar células normales. Los valores de IC₅₀ de la L-asparaginasa en células NFS-60, HepG-2 y MCF fueron estimados en 37,15, 10,29 y 17,95 µg/ml, respectivamente. Bhat & Marar (2015) por otra parte, demostraron que la L-asparaginasa a partir de *Salinicoccus* sp. MKJ997975 había sido capaz de inhibir el crecimiento de las líneas celulares HeLa y Jurkat con una IC₅₀ de 0,096 y 0,171 UI/ml, respectivamente. Estos estudios sustentan la alta efectividad de esta enzima en la viabilidad celular de distintos tipos de cáncer, lo que respalda los resultados obtenidos a partir de la enzima asparaginasa purificada en este estudio.

En el caso de la enzima glutaminasa, diversos microorganismos marinos han demostrado que la glutaminasa sintetizada tiene la capacidad de afectar distintos tipos de células malignas (Patel et al., 2021). Por ejemplo, el estudio realizado por Pandian et al., (2014) evidencio que *Alcaligenes faecalis* KLU102 pudo inhibir la viabilidad de las células HeLa con un valor de IC₅₀ de aproximadamente de 12,5 mg/ml, en un periodo de 24 h. Otra investigación realizada por Kiruthika & Swathi (2019) demostró que la enzima glutaminasa purificada a partir una bacteria marina *Bacillus subtilis* JK-79, mostró actividad citotóxica frente a varias líneas celulares leucémicas probadas, con un valor IC₅₀ de 231, 480 y 500 µg/ml para las líneas celulares K562, U932 y Jurkat, respectivamente. Además, se determinó que la glutaminasa también tuvo efecto citotóxico en otras líneas celulares de cáncer como MCF-7, OV1063 y HCA 7 con valores IC₅₀ de 500, 526 y 750 µg/ml, respectivamente. Estos resultados refuerzan la versatilidad de la glutaminasa en afectar la viabilidad celular de distintos tipos de células malignas, corroborando nuevamente los hallazgos obtenidos en este estudio.

Es relevante mencionar que, aunque la mayoría de los estudios relacionados con la purificación y el efecto citotóxico de la enzima glutaminasa se han centrado en microorganismos marinos, en este trabajo se pudo demostrar que el desierto de Atacama, un ambiente poliextremo, alberga una gran

cantidad de microorganismos adaptados a condiciones extremas, los cuales tienen la capacidad de sintetizar estas enzimas con actividad citotóxica. Esto subraya la importancia de la biodiversidad en la búsqueda de nuevas fuentes de agentes antitumorales.

Se ha descrito que la enzima arginina deiminasa (ADI) posee una notable actividad contra varios modelos de líneas celulares de cáncer humano y animal (Miyazaki et al., 1990). Además, se ha investigado su aislamiento y caracterización a partir de diversos microorganismos y los efectos citotóxicos de ADI en líneas celulares (Kawatra et al., 2022). Por ejemplo, Sharma et al., (2017), demostraron que la ADI obtenida a partir de rizobacterias, indujo citotoxicidad en líneas celulares de cáncer de colon (HCT-116), leucemia (K-562), próstata (PC-3) y mama (T47D) de manera dependiente de la dosis. Entre las ADI probadas, las ADI de PS2 y FB1 mostraron efectos antiproliferativos más significativos, con valores de IC₅₀ más bajos en todas las células cancerosas analizadas a las 48 h.

Por otro lado, Kaur & Kaur (2016) demostraron que la ADI purificada de *Enterococcus faecium* exhibió una inhibición del crecimiento de células Hep-G2 de manera dependiente de la dosis, con un valor IC₅₀ de 1,956 µg/ml. Estos estudios resaltan el potencial de ADI como agente anticancerígeno. Sin embargo, es importante destacar que los estudios relacionados con la búsqueda de la enzima ADI a partir de microorganismos halófilos y halotolerantes son escasos. Aunque Monstadt et al., (1991), lograron purificar y caracterizar la arginina deiminasa a partir de una archa halófila extrema *Halobacterium salinarium*, hasta el momento no se ha descrito sus efectos citotóxicos. Esto resalta la importancia del descubrimiento de esta enzima en nuevas fuentes de microorganismos halófilos y halotolerantes, que evidencian poseer efectos significativos en la viabilidad celular de las células analizadas.

A pesar de que se han realizado amplios estudios evaluando la capacidad anticancerígena de las tres enzimas mencionadas anteriormente, se ha descubierto que diversos tipos de cáncer presentan dependencia a otros aminoácidos, como la glicina, prolina o metionina, lo que resalta la influencia del metabolismo de estos aminoácidos en la progresión de la tumorigénesis.

Es importante destacar que no se han encontrado estudios relacionados con la evaluación de la citotoxicidad de la serina desaminasa y la glicina oxidasa provenientes de microorganismos halófilos y halotolerantes. Esto convierte a este estudio en una demostración destacada de la influencia en la viabilidad de estas tres líneas celulares expuestas a estas enzimas.

Estos hallazgos sugieren que el metabolismo de los aminoácidos, incluidas las enzimas que participan en su procesamiento, puede desempeñar un papel crucial en el desarrollo y progresión del cáncer. La investigación de las enzimas provenientes de microorganismos halófilos y halotolerantes, como la serina desaminasa y la glicina oxidasa, podría proporcionar nuevas perspectivas para comprender y abordar de manera más efectiva la complejidad del cáncer y el diseño de tratamientos terapéuticos dirigidos específicamente a las necesidades metabólicas de las células cancerosas.

La serina y la glicina desempeñan un papel crucial en la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos esenciales para el crecimiento de las células cancerosas (Maggi & Scotti, 2019). El metabolismo de la glicina se asocia estrechamente con la tumorigénesis y la proliferación de células cancerosas. Estudios realizados por Jain et al., (2012) han demostrado que tanto la captación de glicina como la expresión de enzimas en la vía biosintética mitocondrial de la glicina, se correlacionan a un aumento en la tasa proliferativa de células cancerosas en líneas celulares NCI-60.

La serina también juega un papel esencial en el cáncer y está estrechamente interconectada con el metabolismo de la glicina (Amelio et al., 2017; Maddocks et al., 2017). La serina se sintetiza a partir del 3-fosfoglicerato, producido en el ciclo glucolítico, mediante la enzima fosfoglicerato deshidrogenasa (PHGDH). Estudios han demostrado que la síntesis de serina de novo a través de PHGDH aumenta significativamente en ciertos cánceres de mama y melanomas, y un aumento en el número de copias de PHGDH se correlaciona con una mayor dependencia de la producción de serina (Pollari et al. 2011). También se ha estudiado la modulación del metabolismo de la serina en células de hepatoma de rata (3924A) (Snell et al., 1987).

Estos hallazgos respaldan la importancia del metabolismo de la serina y la glicina en la tumorigénesis y el crecimiento tumoral, y sugieren que la manipulación de estos procesos metabólicos podría ofrecer nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer.

4.4 Evaluación de la respuesta anticancerígena de las enzimas purificadas en líneas celulares, mediante el marcador de proliferación celular Ki67.

Una vez evaluada la actividad de las enzimas purificadas en la viabilidad celular de las tres líneas celulares, se procedió a evaluar la respuesta en la proliferación celular utilizando el marcador Ki67.

Este marcador, es una proteína nuclear estrictamente asociada con la proliferación celular, ya que se expresa en todas las fases activas del ciclo celular (fase G₁, S, G₂ y M), y se ausenta en células quiescentes (reposo) (G₀) (Bruno & Darzynkiewicz, 1992).

En las últimas décadas, la evaluación del índice Ki67 ha generado un amplio interés en oncología humana, debido a que demostró tener un valor pronóstico significativo en diversos tipos de tumores (Bruno & Darzynkiewicz, 1992; Penault-Llorca & Radosevic-Robin, 2017; Kreipe, 2018). También se ha utilizado como herramienta útil para el diagnóstico (Hall et al., 1988; De Melo et al., 1992; Bryant et al., 2006) y la predicción de la respuesta a la terapia en diferentes contextos oncológicos (Denkert et al., 2013; Schlotter et al., 2017).

En este estudio, la cuantificación del porcentaje de Ki67 se realizó mediante Citometría de Flujo en las tres líneas celulares (RQ, DFB y MCF-7) después de 24 horas de exposición a las cinco enzimas purificadas. Los datos obtenidos mostraron una disminución en la proliferación celular en todas las células malignas expuestas a las cinco enzimas en comparación con el control sin tratar (Figura 7) en diversas concentraciones, indicando el efecto inhibitor en la proliferación celular en las tres líneas celulares estudiadas. Un análisis más completa de cada variación en la proliferación celular de las líneas celulares, se indica en la sección 4.4.1.

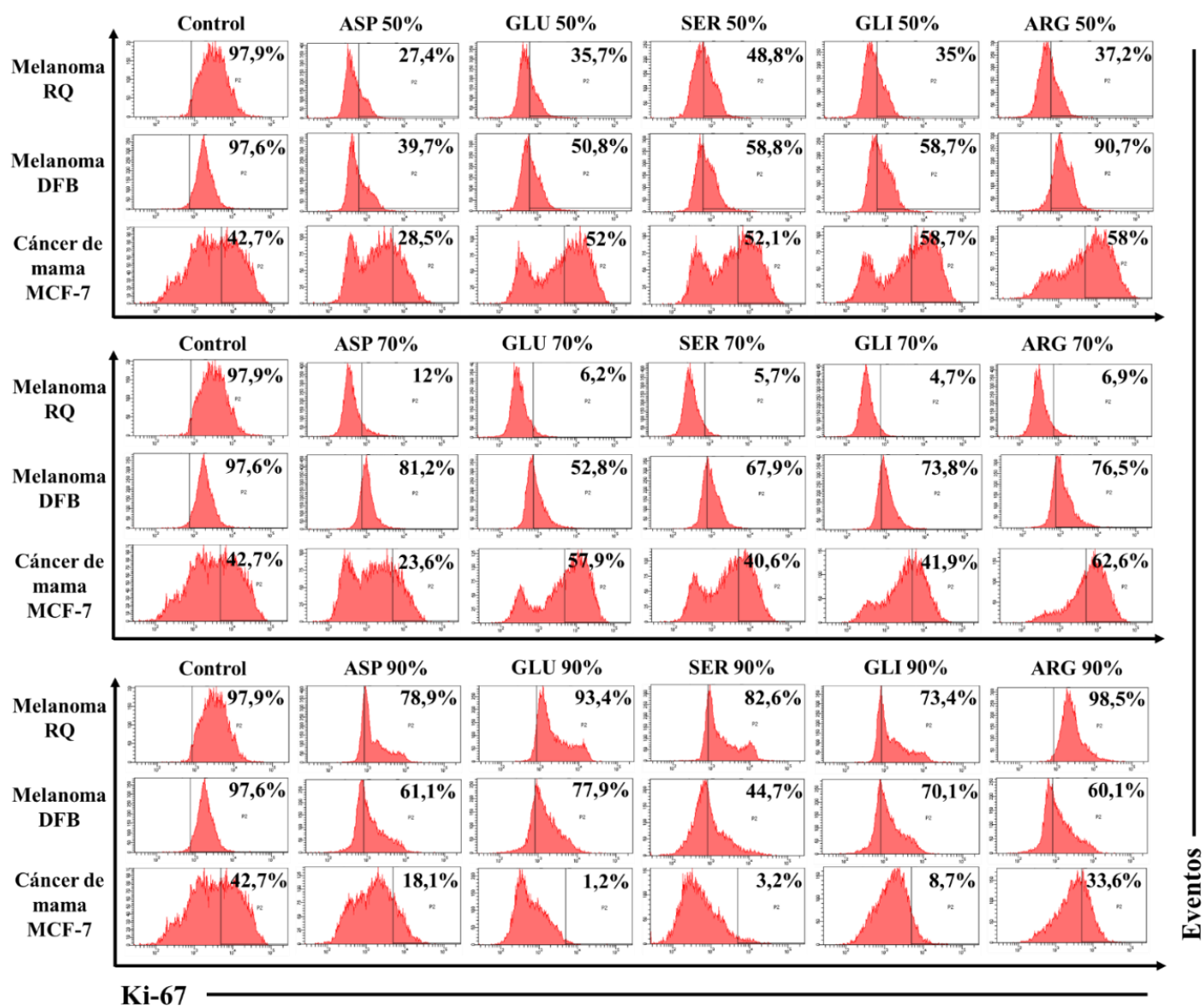


Figura 7. Análisis de citometría de flujo de la proliferación celular mediante el índice Ki67.

Células de melanoma RQ, melanoma DFB y cáncer de mama MCF-7, expuestas a tres porcentajes de las cinco enzimas purificadas (50%, 70%, 70% Porcentajes del marcador de proliferación celular Ki67: las tres líneas celulares (melanoma RQ y DFB, y MCF-7) expuestas a tres concentraciones de cada enzima purificada (50%, 70%, 90%) después de 24 horas de exposición. a 24 h de exposición. El control son células sin tratar. **ASP**, Asparaginasa; **GLU**, Glutaminasa; **SER**, Serina desaminasa; **GLI**, Glicina oxidasa; **ARG**, Arginina deiminasa.

En el contexto del cáncer de mama, la evaluación de Ki67 se ha convertido en una herramienta importante para estimar el pronóstico y guiar la selección del tratamiento adyuvante, así como para predecir la respuesta al tratamiento neoadyuvante. Estudios previos han demostrado que niveles más altos de Ki67 están asociados con una peor supervivencia en el cáncer de mama (Urruticochea et al., 2005; De Azambuja et al., 2007; Penault-Llorca & Radosevic-Robin, 2017).

Además, la medición del índice KI67 después de la terapia neoadyuvante ha sido utilizado como un valioso indicador pronostico en pacientes con cáncer de mama (Jones et al., (2009)). Estudios realizados Von Minckwitz et al., (2013), distinguieron tres grupos de pacientes, según el nivel del índice Ki-67 (bajo: 0-15%, intermedio: 15,1%-35%, alto: > 35,1%) y observaron que del total de los pacientes que tenían un valor de Ki67 bajo posterior al tratamiento, solo el 27% recayó a los 5 años, en comparación a los pacientes que tenían valores de altos de Ki67, donde el 77% de ellos posterior al tratamiento tuvo un mal pronóstico y supervivencia. Además, se evidencio que pacientes con Ki67 inicial bajo o Ki67 bajo inducido por un tratamiento hormonal (letrozol o anastrozol) tuvieron un buen pronóstico, que podría beneficiarse con tratamientos adicionales (Zhang et al., 2021).

Por otro lado, en relación al cáncer de melanoma, el marcador de proliferación más utilizado es Ki67. Su índice elevado se ha asociado con melanomas más agresivos y con peores resultados (Moretti et al., 1990; Wollina et al., 1991; Steinbeck et al., 1996; Lindboe & Torp, 2002; Chorny et al., 2003; Li et al., 2003; Kucher et al., 2004). Aunque se ha informado que Ki67 está asociado con el pronóstico en el melanoma en diferentes etapas (Nielsen et al., 2013; Falkenius et al., 2017; Jurmeister et al., 2019) y la supervivencia general en el melanoma mucoso (Ma et al., 2017), su uso tiene limitaciones debido a su falta de especificidad para los melanocitos. En tumores con alta infiltración de células inmunitarias mitóticamente activas, el Ki67 puede sobrestimar la proliferación (Kim & Meehan, (2017)). Es esencial tener en cuenta estas limitaciones al interpretar los resultados del Ki67 en pacientes con melanoma, ya que no existe un factor establecido que correlacione directamente el porcentaje adecuado de Ki67 con el diagnóstico, pronóstico y supervivencia de los pacientes con este tipo de tumor. Por lo tanto, es fundamental considerar otros marcadores y factores clínicos relevantes para obtener una evaluación más completa y precisa del pronóstico y la progresión del cáncer de melanoma.

Sin embargo, cabe destacar en este estudio, que la disminución en el porcentaje del marcador Ki67 relacionado a la proliferación en todas las líneas celulares expuestas a las cinco enzimas, es prometedor, debido a que podría ser utilizada como una terapia dirigida primaria para el tratamiento de estos tipos de cáncer.

Una vez obtenido los datos por citometría de flujo de la proliferación celular mediante el marcador Ki67, se realizó un análisis estadístico de los datos utilizando ANOVA (Análisis de Varianza) para comparar los porcentajes de Ki67 entre diferentes tratamientos (Control (0%), 50%, 70% y 90%)

de cada enzima y las líneas celulares (RQ, DFB y MCF7). El ANOVA reveló diferencias significativas en la proliferación celular entre los grupos.

Posteriormente, se aplicó el test post hoc de Tukey para realizar comparaciones múltiples entre los grupos de tratamiento. Los resultados observados en la Figura 8, mostraron que:

En la línea celular de melanoma RQ, todos los tratamientos de las enzimas (50%, 70% y 90%) mostraron diferencias altamente significativas en el porcentaje de Ki67 en comparación con el grupo control. Al comparar las concentraciones de enzima entre sí, todas las diferencias son altamente significativas. Esto nos indica que las concentraciones 50%, 70 y 90% de cada enzima, tienen efectos diferentes y significativos en la proliferación celular en la línea RQ.

Con respecto a la línea celular de melanoma DFB, todos los tratamientos de las enzimas (50%, 70% y 90%) también mostraron diferencias significativas en la proliferación celular en comparación al control. Sin embargo, al comparar las concentraciones de las enzimas entre sí, ninguna de las diferencias es significativa.

Finalmente, en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, solo el tratamiento de 90% de cada enzima, mostro una disminución significativa en la proliferación celular en comparación con el control. Al comparar las concentraciones de enzima entre sí, ninguna de las diferencias es significativa.

El análisis estadístico demostró que las concentraciones de enzima tienen un efecto significativo en la proliferación celular, pero este efecto varía según la línea celular estudiada. Estos resultados son relevantes para comprender como influyen las enzimas en la proliferación celular en los diferentes contextos y pueden tener implicaciones en el diseño y desarrollo de tratamientos y terapias específicas.

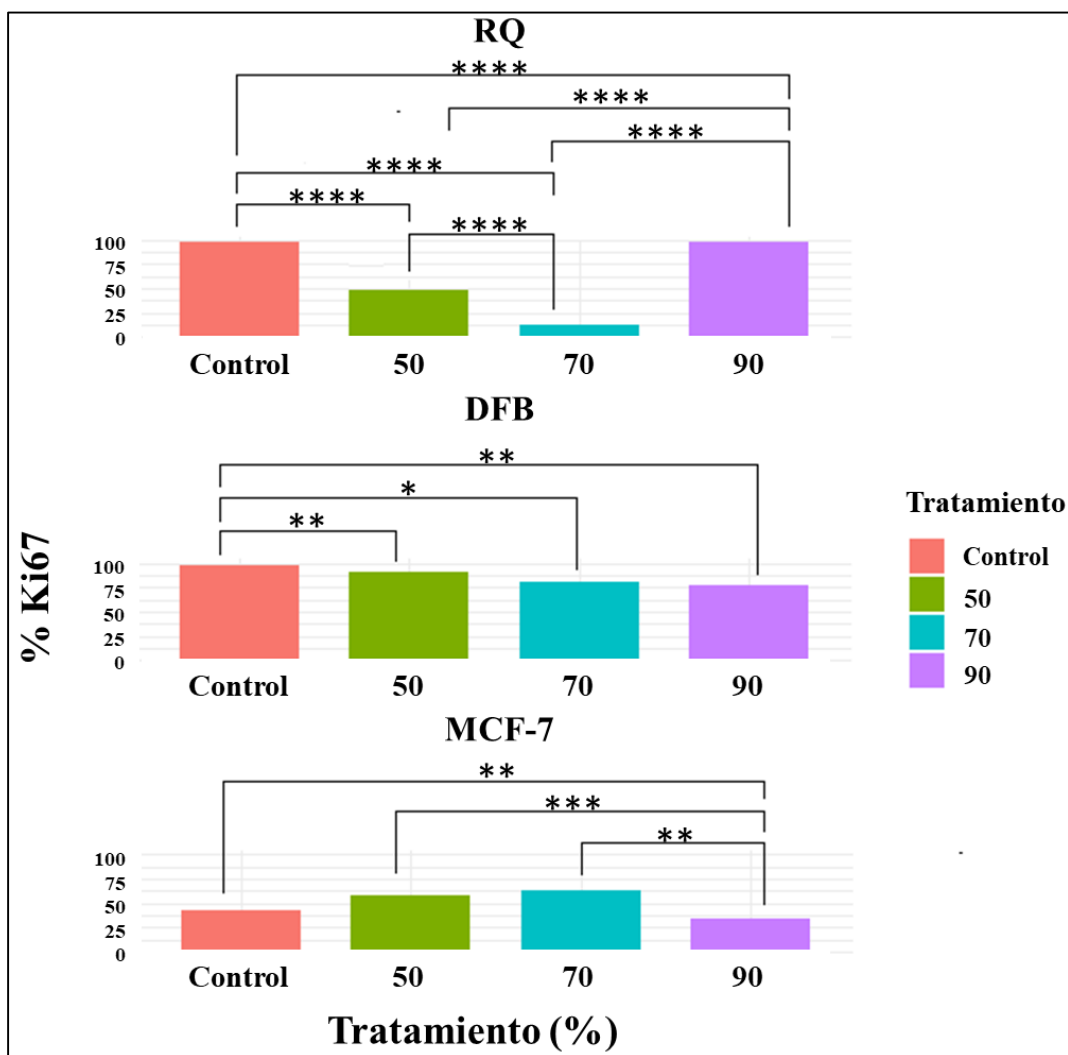


Figura 8. Análisis estadístico ANOVA y la prueba Tukey HSD de comparación de índice Ki67 (%) entre diferentes tratamientos.

Se utilizaron tres concentraciones de las cinco enzimas (50%, 70% y 90%) más un control sin tratamiento (0%). Las comparaciones se realizaron por el total de los grupos en las tres líneas celulares de melanoma RQ, melanoma DFB y cáncer de mama MCF7. Las diferencias entre los grupos de control y tratamientos correspondientes son significativas en * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $P < 0,001$ y **** $P < 0,0001$ (ANOVA y la prueba Tukey HSD).

4.4.1 Posibles efectos canónicos y no canónicos de las enzimas purificadas en las tres líneas celulares

En el contexto de la investigación del cáncer y la terapia enzimática, el “comportamiento canónico” se refiere al comportamiento normal o esperado de las enzimas y las vías metabólicas en las células o tejidos cancerosos. Esto implica la actividad catalítica esperada de las enzimas y así a la activación de las vías de señalización asociadas, resultando en la muerte de las células

malignas debido a la actividad de las enzimas. En contraste, el "comportamiento no canónico" se refiere a efectos inesperados o alternativos de las enzimas e intermediarios en la progresión y metástasis del cáncer (Williams & Fingleton, 2019). Estos comportamientos no canónicos pueden surgir como resultado de la adaptación de las células cancerosas a un entorno desafiante o como una respuesta a tratamientos anticancerígenos, en este caso, a las enzimas, lo que implica aumentar los estudios sobre esta área de investigación y tratamiento del cáncer.

En este estudio, para evaluar el comportamiento de las respuestas asociadas a la viabilidad celular y la proliferación celular en las tres líneas celulares (Melanoma RQ, Melanoma DFB y Cáncer de mama MCF-7) expuestas a cinco enzimas purificadas de microorganismos extremófilos (Asparaginasa, Glutaminasa, Serina desaminasa, Glicina oxidasa y Arginina deiminasa), y de esta manera determinar si se evidencia un posible efecto canónico o no canónico de estas enzimas, se realizó un análisis utilizando solo los datos obtenidos en concentraciones crecientes de cada enzima de 50%, 70% y 90% (0.5, 0.7 y 0.9) a las 24 h de exposición del ensayo MTT (véase el Anexo C).

Cabe destacar que los resultados de proliferación celular utilizando el marcador Ki67, se realizó midiendo 10.000 células por citometría de flujo, lo que se considera una muestra suficientemente representativa y estadísticamente robusta de la población celular en estudio, para así obtener resultados más precisos

En la Figura 9, se presentan dos gráficos por línea celular: uno muestra la viabilidad celular mediante un gráfico de barras, y el otro gráfico en líneas que representa el porcentaje de células proliferativas utilizando el marcador Ki67, expuestas a las cinco enzimas purificadas en tres concentraciones crecientes de 50%, 70% y 90% (0.5, 0.7 y 0.9). Observamos igual como se indicó en la sección 4.3, que a medida que aumentamos la concentración de las enzimas, se produjo una disminución significativa en la viabilidad celular, donde la concentración del 0.9 de todas las enzimas es altamente significativa en todas las líneas celulares. Sin embargo, hay divergencia en las concentraciones más bajas (0.5 y 0.7). Con relación a la proliferación celular, utilizando el marcador KI67, se expone los resultados en la sección 4.4.

Comportamiento Canónico vs. No Canónico:

Línea celular melanoma RQ:

Se observa en esta línea en particular, un comportamiento complejo y no canónico en respuesta a la exposición de las cinco enzimas:

- A concentración más alta de las enzimas (0.9), se observa una disminución significativa en la viabilidad celular en comparación con la exposición a concentraciones más bajas (0.5 y 0.7). Sin embargo, este comportamiento no es uniforme en la exposición de todas las enzimas. La glicina oxidasa afecta significativamente la viabilidad en todas sus concentraciones, mientras que la asparaginasa, serina desaminasa y arginina deiminasa solo disminuye la viabilidad a concentraciones de 0.7 y 0.9. La enzima glutaminasa reduce la viabilidad solo a concentraciones de 0.9. Por otro lado, se puede observar en el caso de asparaginasa y glutaminasa, las concentraciones de 0.5 y 0.7 respectivamente, aumentan la viabilidad, aunque no de manera significativa respecto al control.
- El efecto de las enzimas en la proliferación celular de RQ, parece tener un comportamiento diferente. En general, a medida que aumenta la concentración de las enzimas (0.9), hay un aumento en el porcentaje de células Ki67 positivas, indicando una mayor proliferación celular. Sin embargo, a concentraciones más bajas (0.5 y 0.7) la proliferación disminuye considerablemente.

Este aumento en la proliferación a concentraciones más altas contrasta con la disminución en la viabilidad celular, lo que sugiere un comportamiento no canónico o complejo en respuesta a estas enzimas en la línea celular RQ.

Línea celular melanoma DFB:

- En esta línea celular de melanoma DFB, se observa una influencia significativa en la reducción de la viabilidad celular cuando se expone a cuatro de las enzimas estudiadas (glutaminasa, serina desaminasa, glicina oxidasa y arginina deiminasa) en todas sus concentraciones (0.5, 0.7 y 0.9). Mientras que la enzima asparaginasa solo disminuye significativamente la viabilidad a concentraciones de 0.7 y 0.9, mientras que a 0.5 se observa un aumento en la viabilidad, aunque no significativo en comparación al control.

- Con respecto a la proliferación celular, se observa un comportamiento divergente. Todas las enzimas a concentración baja (0.5) disminuye la proliferación celular de DFB. Sin embargo, algunas enzimas como asparaginasa, serina desaminasa y glicina oxidasa, aumentan ligeramente la proliferación a concentraciones de 0.7, pero esta disminuye en exposición a la concentración de 0.9. Cabe destacar que, en estos tres casos en particular, si comparamos la proliferación en las tres concentraciones, todas son menores respecto al control. Sin embargo, si observamos el comportamiento en conjunto estas enzimas no siguen un patrón definido con respecto a la disminución de la proliferación a medida que aumentamos la concentración de las enzimas. En el caso de la influencia de glutaminasa en DFB, a concentraciones de 0.7 y 0.9, se observa un aumento en la proliferación, pero en comparación con el control, la proliferación sigue siendo menor. Por otro lado, se observa que la arginina deiminasa presenta una disminución constante en la proliferación celular a medida que la concentración de la enzima aumenta. Esta tendencia sugiere un comportamiento canónico en relación con la línea celular DFB, ya que se correlaciona con la disminución de la viabilidad celular a medida que la concentración de esta enzima se incrementa.

Línea celular de cáncer de mama MCF-7:

- En la línea celular MCF-7, la viabilidad celular se ve afectada significativamente a concentraciones superiores de 0.7 y 0.9 en la exposición de todas las enzimas estudiadas. En particular, cabe resaltar que la enzima glicina oxidasa es la única que muestra efectos notables en la viabilidad de MCF-7 en las tres concentraciones estudiadas.
- En términos de los efectos de cada enzima en la proliferación celular, el comportamiento es divergente. A concentraciones de 0.5 y 0.7, las enzimas glutaminasa y arginina deiminasa, aumentan el porcentaje de células en proliferación, pero a 0.9, se observa una disminución considerable. El comportamiento de estas enzimas en particular es no canónico lo que indicaría efectos variables en la proliferación celular dependiendo de la concentración. Con respecto a glicina oxidasa y serina deiminasa, a concentración de 0.5, aumentan la proliferación celular, mientras que a 0.7 y 0.9, disminuye la proliferación de MCF-7. Asparaginasa, por otro lado, muestra un efecto esperado a medida que aumenta la concentración enzimática, disminuye la proliferación celular.

- En esta línea en particular, aunque se observa un posible comportamiento canónico en términos de viabilidad celular, esto no es consistente con los resultados de algunas de las enzimas en la proliferación celular, donde se observó un aumento en la proliferación a concentraciones bajas, lo que sugiere que el efecto de las cuatro enzimas descritas en la proliferación y viabilidad no sigue un patrón lineal y puede depender de la concentración de cada enzima. Sin embargo, cabe destacar, que la enzima asparaginasa, aunque no produce un efecto significativo en la viabilidad a 0.5, en todos los otros comportamientos, se observa un efecto lineal con respecto a mayor concentración = menor viabilidad y proliferación, lo que podría indicar que esta enzima pueda ser potencialmente utilizable en esta línea en particular como agente anticancerígeno, al observar a visiblemente un comportamiento canónico.

Es importante destacar que estos análisis expuestos requieren para ser determinados definitivamente como comportamiento netamente canónico o no canónico de las enzimas en las líneas celulares, una mayor investigación adicional, donde se puedan incluir análisis moleculares para identificar posibles vías de señalización afectadas por la exposición de estas enzimas y evaluar cómo interactúan con otros componentes celulares. Además, la replicación de estos experimentos en diferentes líneas celulares y sistemas podría proporcionar información adicional sobre la variabilidad en las respuestas celulares.

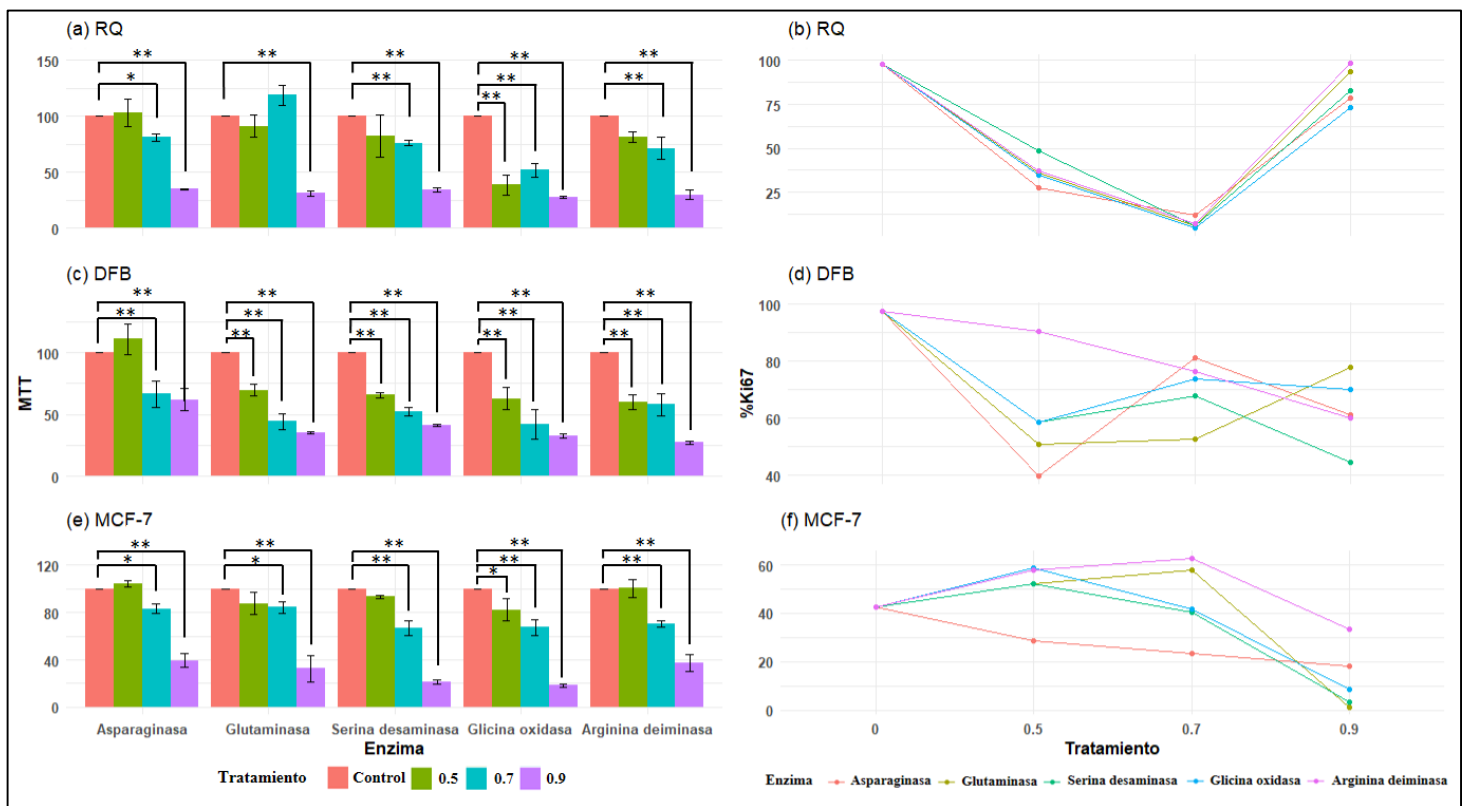


Figura 9. Efectos y comparación sobre la viabilidad y proliferación celular.

Se emplearon tres concentraciones diferentes (0.5, 0.7 y 0.9) de cada una de las cinco enzimas, junto con un grupo de control no tratado (Control), para llevar a cabo los análisis estadísticos. Los gráficos de barras (a, c y e) representan los resultados de los análisis de ANOVA y las pruebas de Dunnett correspondientes que evaluaron los efectos de cada enzima sobre la viabilidad celular en cada línea celular (melanoma RQ, melanoma DFB y cáncer de mama MCF7). Las comparaciones se realizaron en relación al grupo de control, y las diferencias entre los grupos de control y los tratamientos respectivos son estadísticamente significativas con valores de * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA y prueba de Dunnett). Por otro lado, los gráficos de líneas (b, d y f) representan los valores obtenidos en términos del porcentaje de Ki67 en cada línea celular (melanoma RQ, melanoma DFB y cáncer de mama MCF7) expuestas a las tres concentraciones de cada una de las cinco enzimas, además del grupo de control no tratado.

Si bien se ha documentado que la glucosa es una fuente de energía reconocida para el crecimiento y proliferación del cáncer, se ha reconocido que los aminoácidos también son combustibles importantes que apoyan el desarrollo del cáncer (Lieu et al., 2020).

Además de formar los componentes básicos de las proteínas, los aminoácidos proporcionan muchos de los elementos estructurales de una célula y son una importante fuente de energía. Por lo tanto, no sorprende que las células cancerosas, aunque se esfuerzan por mantener la homeostasis de los aminoácidos, promoviendo la síntesis o recuperación de aminoácidos, se vuelvan más dependientes del suministro exógeno de aminoácidos. Esta mayor demanda de aminoácidos puede incluso causar auxotrófia (es decir, la incapacidad de mantener el crecimiento en ausencia de un

nutriente en particular) para los NEAA (Lomelino et al., 2017). Tanto la dependencia selectiva como el potencial para apuntar a un aminoácido específico hacen que algunos sean más adecuados como objetivo terapéutico que otros (Kim & DeBarardinis, (2019)). La importancia del metabolismo de los aminoácidos se destaca por el hecho de que la limitación de la disponibilidad de estos nutrientes puede ser selectivamente letal para las células tumorales (Butler et al., 2021).

Este trabajo apunta a la terapia de privación de aminoácidos, la cual es una estrategia que se caracteriza por el uso de enzimas que agotan los aminoácidos que promueve el crecimiento de ciertos tumores auxotróficos.

Se logró purificar cinco enzimas, las cuales como ya se demostró producen citotoxicidad e inhiben la proliferación celular de tres líneas celulares de manera diferente.

Los efectos de las enzimas que se mencionan a continuación son de tipo canónico (respuestas biológicas predecibles y bien caracterizadas que siguen un patrón específico) al estar cumpliendo su rol principal de catalización de un aminoácido específico, además de no canónico (respuestas biológicas inesperadas o alternativas). De esta manera las respuestas como agente anticancerígeno, son de la siguiente manera:

- ***Asparaginasa para la degradación de asparagina***

Canónico:

La asparaginasa, desempeña un papel crucial en la regulación del metabolismo de los aminoácidos, específicamente en la degradación de la asparagina. En ciertas células cancerígenas, como las células tumorales de ALL y otros tipos de cáncer, la asparaginasa actúa inhibiendo la síntesis de proteínas al eliminar la asparagina del medio extracelular (Pieters et al., 2011; Knott et al., 2018).

La asparagina es un aminoácido esencial para el crecimiento y la proliferación celular en ciertos tipos de cáncer, ya que estas células no pueden sintetizar asparagina por sí mismas y dependen del suministro externo de este aminoácido para sobrevivir y proliferar. Al eliminar la asparagina del medio extracelular, la asparaginasa priva a las células cancerosas de este nutriente esencial, lo que conduce a una disminución en la síntesis de proteínas y, en última instancia, a la inhibición del crecimiento y la proliferación celular (Mazloun-Ravasan et al., 2020).

No canónico:

Se ha descrito que la falta de expresión de la proteína ASNS es una característica distintiva de los blastos de ALL, lo que, por tanto, los hace dependientes de la Asn externa. Knott et al., 2018, demostraron que la expresión de ASNS en el tumor primario de un paciente con cáncer de mama

se correlacionó fuertemente con una recaída metastásica posterior. Esto sugiere que ASNS puede ser un objetivo potencial para la terapia contra el cáncer y que los efectos no canónicos de la asparaginasa pueden depender del trasfondo genético de las células cancerosas.

Además, se ha sugerido que los efectos no canónicos de la asparaginasa también pueden depender del perfil metabólico de las células cancerosas. La inhibición de GCN2 (quinasa control general no reprimible 2) sensibiliza a las células cancerosas con baja expresión de ASNS a la asparaginasa al alterar la respuesta de los aminoácidos: GCN2 es una proteína quinasa que participa en la regulación del metabolismo de los aminoácidos y estudios han demostrado que la inhibición de GCN2 sensibiliza las células cancerosas con baja expresión de ASNS a la asparaginasa (Nakamura et al., 2018).

- ***Glutaminasa para la degradación de glutamina***

La adicción a la glutamina es otra característica metabólica emergente de las células cancerosas (Still & Yuneva, 2017). La glutaminasa es una enzima que desempeña un papel crucial en el metabolismo del cáncer al catalizar la conversión de glutamina en glutamato. Sin embargo, las funciones de la glutaminasa son controvertidas, especialmente desde el punto de vista de las isoenzimas, debido a que según el tipo de glutaminasa a utilizar, estas pueden tener efectos canónicos y no canónicos en las células tumorales (Williams & Fingleton, 2019).

Canónico:

La glutamina es un aminoácido crucial involucrado en diversas vías metabólicas y energéticas, siendo el principal transportador de nitrógeno y el aminoácido más abundante en mamíferos (Covini et al., 2012). Aunque las células pueden sintetizar glutamina, su demanda durante la rápida proliferación aumenta de manera tal, que se requiere la absorción exógena para suministrar suficiente precursor para reacciones energéticas y metabólicas (Cluntun et al., 2017). Investigaciones sobre el metabolismo de células cancerosas han revelado que mutaciones en oncogenes o genes supresores de tumores pueden aumentar la expresión de proteínas implicadas en el metabolismo y absorción de glutamina, lo que sugiere una fuerte correlación entre la oferta de glutamina y la proliferación tumoral (Cluntun et al., 2017). De hecho, las células cancerosas en cultivo requieren la adición de glutamina para sobrevivir y proliferar (Chen & Cui, 2015).

Dado el papel crítico de la glutamina en el desarrollo del cáncer, la privación de glutamina se ha convertido en un tema destacado en la terapia metabólica contra esta enfermedad. Se ha demostrado que la privación de glutamina induce la apoptosis en células de hepatoma, hibridoma,

leucemia, mieloma y fibroblastos (Petronini et al., 1996; Fuchs & Bode, 2006; Matés et al., 2006). Además de inducir apoptosis, la privación de glutamina también puede inducir autofagia y detener el ciclo celular en las células cancerosas (Cardaci et al., 2012).

Referente a la isoenzimas, se ha indicado que el aumento de la expresión de glutaminasa 1 (GLS1) en el cáncer de mama triple negativo se ha asociado con una mala supervivencia libre de enfermedad y una disminución de los leucocitos infiltrantes del tumor (Kim et al., 2017). La mayor absorción y utilización de glutamina por parte de las células tumorales da como resultado una menor disponibilidad de esta fuente de carbono en el microambiente del tumor. La falta de glutamina ambiental, que es importante para la función de los linfocitos (Carr et al., 2010; Sinclair et al., 2013), puede explicar la disminución de los linfocitos infiltrantes del tumor y el mal pronóstico asociado con la expresión de glutaminasa en el cáncer de mama triple negativo. Es así, que la glutaminasa 1 aumenta la supervivencia de las células tumorales a través de su actividad catalítica canónica.

No Canónico:

Además de su papel canónico en el metabolismo del cáncer, la glutaminasa también puede tener efectos no canónicos sobre las células cancerosas. La glutaminasa 2 (GLS2), una isoforma hepática de la glutaminasa, tiene efectos no canónicos, debido a que puede inhibir la metástasis al unirse a proteínas en lugar de llevar a cabo sus funciones catalíticas tradicionales. Se ha demostrado que GL2 se une a la pequeña GTPasa Rac1 (guanosa trifosfatasa/creatinina 1), que regula múltiples procesos celulares, lo que bloquea las interacciones con los factores de intercambio de guanina y da como resultado la inhibición de Rac1. Además, GL2 estabiliza la enzima Dicer, lo que lleva a la maduración de miR-34a (gen MicroRNA 34a) (Kuo et al., 2016). MiR-34a puede reprimir el factor de transcripción-EMT SNAIL (Transición Epitelio-Mesenquimal) e inhibir la metástasis en el carcinoma hepatocelular.

- ***Arginina deiminasa (ADI) para la degradación de arginina***

La arginina deiminasa (ADI) es una enzima ampliamente distribuida entre microorganismos procariontes y algunos eucariotes anaeróbicos, que la utilizan para catalizar la conversión de la arginina en citrulina y amoníaco (Horn, 1933). La vía llamada ADI se utiliza para generar energía, carbono y nitrógeno y también para proteger algunas bacterias de las condiciones ácidas, mediante la producción de amoníaco (Casiano-Colón & Marquis, 1988).

Canónico:

Dada la importancia de la arginina para el crecimiento celular y la proliferación, la actividad de la ADI en las células cancerosas ha sido objeto de investigación para su potencial uso en terapias anticancerígenas. Se han desarrollado tratamientos basados en la administración de ADI, lo que puede conducir a la reducción de los niveles de arginina en las células cancerosas y limitar así su crecimiento y proliferación (Fultang et al., 2016).

La forma de ADI más estudiada es la derivada de *Mycoplasma arginini* (Ma-ADI). Varios estudios, confirmaron el potencial de la actividad anti-cancerígena de Ma-ADI purificada como agente antitumoral en diferentes tipos de cánceres humanos, como hepatoma, fibrosarcoma maligno, carcinoma de células escamosas, melanoma maligno, carcinoma nasofaríngeo y carcinoma de pulmón (Sugimura et al., 1992; Takaku et al., 1992; Ashikaga et al., 1994). Además, estudios preclínicos y clínicos utilizando una forma PEGilada de la enzima, mostró una mayor estabilidad in vivo y una inmunogenicidad reducida con actividades catalíticas y anticancerígenas conservadas, con prometedores resultados para el tratamiento de carcinoma hepatocelular (HCC) y melanomas (Miyazaki et al., 1990).

El mecanismo de actividad anticancerosa de ADI aún no se ha revelado completamente. En general, la privación de aminoácidos conduce a la activación de respuestas al estrés, lo que mejora la autofagia pro-supervivencia y reduce la síntesis de proteínas. Las células cancerosas que no pueden producir arginina endógena de novo (Ej., Células cancerosas deficientes para argininosuccinato sintetasa [ASS] o argininosuccinato liasa [ASL]) o vías de rescate (Ej., Células cancerosas deficientes para ornitina transcarbamil transferasa [OCT]) permanecen en una condición de estrés prolongado que eventualmente resulta en la detención y activación del crecimiento de vías pro-muerte (Fultang et al., 2016).

No canónico:

La sensibilidad del melanoma al tratamiento con ADI se basa en su auxotrófia para la arginina debido a la falta de expresión de argininosuccinato sintetasa (AS), la enzima limitante de la velocidad para la biosíntesis de novo de arginina. Tsai et al. (2009) revelaron un aspecto no convencional del ADI al observar que en las líneas celulares de melanoma A2058 y SK-MEL-2, pero no en las células A375, el tratamiento con ADI indujo la expresión de AS a nivel transcripcional. Esta inducción se correlacionó con la resistencia al tratamiento con ADI en las células de melanoma y se asoció con la expresión inducida de argininosuccinato sintetasa, mediada por c-Myc/HIF-1 α /Sp4. Estos hallazgos sugieren que los efectos no canónicos del ADI pueden depender de la predisposición genética de las células cancerosas.

Serina desaminasa y Glicina oxidasa para la degradación de serina y glicina, respectivamente

Finalmente, a pesar que por el momento no ha habido un intento sistemático de abordar la adicción desde el punto farmacológico de la serina y glicina, estos dos aminoácidos juegan un papel fundamental en el metabolismo de las células malignas (Locasale, (2013); Amelio et al., 2014).

Canónico:

La serina está estrechamente interconectada con el metabolismo de la glicina extracelular y dona un átomo de carbono de su cadena lateral al ácido fólico, convirtiéndolo en glicina. Los grupos metilo de la glicina pueden alimentar el metabolismo de un carbono en el ciclo del folato que las células cancerosas utilizan para la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y cofactores (Locasale, (2013); Amelio et al., 2014). La serina y la glicina también están involucradas en la síntesis de antioxidantes, que aumentan la supervivencia de las células cancerosas en ambientes hipóxicos. El glutamato también es un producto de la síntesis de serina, y su conversión en alfa-cetoglutarato puede alimentar la producción de energía por parte del ciclo del TCA (Amelio et al., 2014).

La serina y la glicina son esenciales para la proliferación de células tumorales, y algunos metabolitos o enzimas críticas en su metabolismo regulan el crecimiento de las células tumorales. La serina exógena es el tercer nutriente consumido más rápidamente por las células cancerosas cultivadas (Jain et al., 2012; Hosios et al., 2016). Cuando la suplementación exógena de serina es insuficiente, las células tumorales pueden producir serina endógena a través de la vía de síntesis de serina (SSP).

La privación de serina y glicina ha mostrado reducir el crecimiento de tumores en modelos experimentales y puede considerarse como una estrategia terapéutica potencial (Maddocks et al., 2013). En el caso del cáncer de mama, la serina desempeña un papel específico en el apoyo a la proliferación tumoral, independiente del metabolismo de carbono. La inhibición del crecimiento celular se observa cuando la serina es privada, lo que sugiere que esta privación puede ser una terapia metabólica efectiva para ciertos tipos de cáncer de mama (Labuschagne et al., 2014). Sumado a esto, se ha observado en otro estudio, que los ratones alimentados con dietas que carecen de serina y glicina muestran tamaños de tumor de xenoinjerto colorrectal reducidos y sobreviven más tiempo que los ratones alimentados con dietas de control, lo que indica que el uso terapéutico de la depleción de serina/glicina merece una mayor investigación (Maddocks et al., 2013).

Dado el papel crucial del metabolismo de la serina y la glicina en el desarrollo tumoral, las enzimas clave involucradas en estas vías pueden convertirse en marcadores clínicos y objetivos terapéuticos potentes para el cáncer (Locasale, 2013; Amelio et al., 2014).

La serina desaminasa, también conocida como serina deshidratasa o L-serina amonioliasa, es una enzima que cataliza la conversión de la serina en piruvato y amoníaco (Maggi & Scotti, 2019).

La glicina oxidasa, también conocida como glicina dehidrogenasa, es una enzima que cataliza la oxidación de glicina en glicina iminoácido (glicina hidroxipiruvato) en la mitocondria. Esta reacción forma parte del ciclo de la serina, que es una vía metabólica importante para la interconversión de varios aminoácidos, incluyendo la serina, glicina y glicina iminoácido (Maggi & Scotti, 2019).

No canónico:

En general, la serina desaminasa y la glicina oxidasa juega un papel crítico en el metabolismo celular y puede tener efectos en la proliferación celular a través de sus interacciones con otras rutas metabólicas y de señalización. La investigación en este campo continúa avanzando con el objetivo de comprender mejor la función de estas enzimas y su relevancia en diversas condiciones fisiológicas y patológicas, incluyendo el cáncer (Locasale, 2013; Amelio et al., 2014; Maggi & Scotti, 2019). Es importante destacar que, aunque estas enzimas están siendo estudiadas en el contexto de la terapia enzimática, aún no se han establecido completamente sus roles no canónicos en las células tumorales, y este es un área de investigación en curso.

Finalmente, es esencial resaltar que todo lo expuesto subraya la complejidad celular involucrada en la terapia del cáncer. Los efectos observados en estas células malignas tras la exposición a tratamientos enzimáticos no se limitan únicamente a la eliminación de aminoácidos esenciales; también pueden influir en diversas vías de señalización metabólica y genética intracelular. Por lo tanto, es importante señalar la necesidad de llevar a cabo investigaciones adicionales en este campo para profundizar en nuestra comprensión y abordar de manera más efectiva esta área de estudio.

5 CONCLUSIONES

En este estudio, se logró aislar y caracterizar un total de 48 bacterias halófilas y halotolerantes a partir de muestras de suelos poliextremos del Desierto de Atacama. Las diferentes condiciones de cultivo influyeron en el crecimiento selectivo de halófilos extremos, moderados y halotolerantes. A través del análisis molecular, se identificaron principalmente tres géneros bacterianos: *Salibacterium*, *Calidifontibacillus* y *Bacillus*, previamente asociados a ambientes extremos.

Cabe destacar que estos microorganismos tienen la capacidad de responder y adaptarse a condiciones poliextremas, lo que les permite sintetizar nuevos compuestos naturales con potencial terapéutico. Adicionalmente, se evaluó la capacidad de producción de enzimas en los aislados halófilos y halotolerantes, encontrando que diversas enzimas como asparaginasa, glutaminasa, serina desaminasa, glicina oxidasa, metioninasa y arginina deiminasa fueron producidas por diferentes cepas, siendo las bacterias halófilas las más comunes en esta síntesis. Lo que indica el alto potencial de estos aislados en producir una variedad de enzimas.

Las enzimas purificadas de las cepas seleccionadas mostraron una actividad enzimática óptima en presencia de salinidad, lo que sugiere su estabilidad en ambientes salinos similares al suero humano, resultando así tener potencial para ser consideradas como posibles aplicaciones en terapia enzimática y otras aplicaciones biotecnológicas.

Asimismo, se destaca el potencial de las enzimas purificadas de microorganismos halófilos y halotolerantes como agentes anticancerígenos. Se observó una inhibición significativa de la viabilidad celular en líneas celulares malignas de melanoma (RQ y DFB) y cáncer de mama (MCF-7). Sin embargo, se identificaron efectos citotóxicos variables de estas enzimas en las líneas celulares evaluadas, lo que sugiere su aplicabilidad en diferentes tipos de cáncer y en el diseño de tratamientos dirigidos a las necesidades metabólicas específicas de células cancerosas. Estos hallazgos ofrecen nuevas perspectivas en la investigación oncológica y podrían contribuir al desarrollo de terapias más efectivas contra el cáncer.

Finalmente, este estudio también pone de relieve la importancia de considerar tanto los efectos canónicos como los no canónicos de las enzimas en diferentes contextos celulares. Se observa un comportamiento canónico en la viabilidad celular, donde las enzimas en concentraciones más altas disminuyen significativamente la viabilidad en la mayoría de las líneas celulares. No obstante, se identifica un comportamiento no canónico sobre la proliferación celular, donde algunas enzimas

aumentan la proliferación a concentraciones bajas. Esto subraya la necesidad de investigaciones adicionales para comprender completamente cómo estas enzimas interactúan con las células cancerosas y las vías de señalización específicas afectadas. Además, en este estudio se destaca la riqueza de los microorganismos halófilos y halotolerantes provenientes de ambientes poliextremos, como el Desierto de Atacama, como una fuente potencial de recursos valiosos para la ciencia, la medicina y la biotecnología.

6 PROYECCIONES

El trabajo de investigación sobre bacterias halófilas y halotolerantes del Desierto de Atacama, así como el estudio de las enzimas purificadas y su actividad anticancerígena, tienen diversas proyecciones que pueden tener un impacto significativo en diferentes áreas científicas y aplicaciones prácticas. Algunas de estas proyecciones incluyen:

1. **Desarrollo de Agentes Anticancerígenos:** Las enzimas purificadas que mostraron actividad anticancerígena en las líneas celulares malignas podrían ser consideradas como candidatas para el desarrollo de nuevos agentes antitumorales. La investigación en este campo podría llevar al diseño de terapias más específicas y efectivas contra diferentes tipos de cáncer, abriendo nuevas perspectivas en la lucha contra esta enfermedad.
2. **Medicina Personalizada:** Las diferencias en la actividad anticancerígena de las enzimas en diferentes líneas celulares indican que ciertos tratamientos pueden ser más efectivos para ciertos tipos de cáncer. Estos hallazgos podrían sentar las bases para el desarrollo de terapias personalizadas, adaptadas a las características específicas de cada paciente y su tipo de cáncer.
3. **Investigación en Metabolismo de Aminoácidos:** Los resultados que sugieren el papel del metabolismo de aminoácidos en la proliferación celular de tumores podrían fomentar una mayor investigación en esta área. Comprender cómo las enzimas purificadas afectan el metabolismo celular podría conducir al desarrollo de estrategias novedosas para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades relacionadas con alteraciones metabólicas.
4. **Estudio de Efectos Canónicos y No Canónicos:** Los resultados que muestran comportamientos canónicos y no canónicos de las enzimas en las líneas celulares malignas plantean preguntas importantes sobre los mecanismos subyacentes a estos efectos divergentes. Esta área de investigación puede conducir a un mayor entendimiento de cómo las enzimas interactúan con las células cancerosas y cómo sus efectos pueden variar según la concentración o el tipo de célula. Los estudios asociados podrían incluir análisis moleculares detallados para identificar las vías de señalización afectadas, así como investigaciones sobre las interacciones proteína-proteína y proteína-metabolito en el contexto de estas enzimas.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abuchowski, A., Kazo, G. M., Verhoest Jr, C. R., Van Es, T., Kafkewitz, D., Nucci, M. L., ... & Davis, F. F. (1984).** Cancer therapy with chemically modified enzymes. I. Antitumor properties of polyethylene glycol-asparaginase conjugates. *Cancer biochemistry biophysics*, 7(2), 175-186.
- Adiguzel, A., Ay, H., Baltaci, M. O., Akbulut, S., Albayrak, S., & Omeroglu, M. A. (2020).** Genome-based classification of *Calidifontibacillus erzurumensis* gen. nov., sp. nov., isolated from a hot spring in Turkey, with reclassification of *Bacillus azotoformans* as *Calidifontibacillus azotoformans* comb. nov. and *Bacillus oryzae* as *Calidifontibacillus oryzae* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(12), 6418-6427.
- Aharoni, A., Gaidukov, L., Khersonsky, O., Gould, S. M., Roodveldt, C., & Tawfik, D. S. (2005).** The 'evolvability' of promiscuous protein functions. *Nature genetics*, 37(1), 73-76.
- Alföldi, L., Raskó, I., & Kerekes, E. (1968).** L-serine deaminase of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 96(5), 1512-1518.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Amelio, I., Cutruzzolá, F., Antonov, A., Agostini, M., & Melino, G. (2014).** Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends in biochemical sciences*, 39(4), 191-198.
- Amelio, I., Melino, G., & Frezza, C. (2017).** Exploiting tumour addiction with a serine and glycine-free diet. *Cell Death and Differentiation*, 24(8), 1311.
- Amobonye, A., Singh, S., & Pillai, S. (2019).** Recent advances in microbial glutaminase production and applications—a concise review. *Critical reviews in biotechnology*, 39(7), 944-963.
- Ashikaga, T., Wang, Z., Yamamoto, M., Yamasaki, M., Magae, J., & Nagai, K. (1994).** Development and characterization of macrophage hybridomas derived from murine peritoneal exudate cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 58(5), 839-842.

- Azua-Bustos, A., González-Silva, C., & Corsini, G. (2017).** The hyperarid core of the Atacama Desert, an extremely dry and carbon deprived habitat of potential interest for the field of carbon science. *Frontiers in microbiology*, 8, 993.
- Azua-Bustos, A., Urrejola, C., & Vicuña, R. (2012).** Life at the dry edge: microorganisms of the Atacama Desert. *FEBS letters*, 586(18), 2939-2945.
- Bhat, M., & Marar, T. (2015).** Cytotoxic Effect of Purified L-asparaginase from *Salinicoccus* sp. M KJ997975. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 4, 701-712.
- Bhattacharya, D., de los Santos Villalobos, S., Ruiz, V. V., Selvin, J., & Mukherjee, J. (2020).** *Bacillus rugosus* sp. nov. producer of a diketopiperazine antimicrobial, isolated from marine sponge *Spongia officinalis* L. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 113, 1675-1687.
- Bowers, K. J., Mesbah, N. M., & Wiegel, J. (2009).** Biodiversity of poly-extremophilic Bacteria: Does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physico-chemical boundary for life? *Saline systems*, 5, 1-8.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bruno, S., & Darzynkiewicz, Z. (1992).** Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell proliferation*, 25(1), 31-40.
- Bryant, R. J., Banks, P. M., & O'malley, D. P. (2006).** Ki67 staining pattern as a diagnostic tool in the evaluation of lymphoproliferative disorders. *Histopathology*, 48(5), 505-515.
- Bull, A. T., & Asenjo, J. A. (2013).** Microbiology of hyper-arid environments: recent insights from the Atacama Desert, Chile. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103, 1173-1179.
- Bull, A. T., Andrews, B. A., Dorador, C., & Goodfellow, M. (2018).** Introducing the Atacama Desert.
- Butler, M., van der Meer, L. T., & van Leeuwen, F. N. (2021).** Amino acid depletion therapies: starving cancer cells to death. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 32(6), 367-381.

- Cachumba, J. J. M., Antunes, F. A. F., Peres, G. F. D., Brumano, L. P., Santos, J. C. D., & Silva, S. S. D. (2016).** Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. *Brazilian journal of microbiology*, *47*, 77-85.
- Cantor, J. R., Panayiotou, V., Agnello, G., Georgiou, G., & Stone, E. M. (2012).** Engineering reduced-immunogenicity enzymes for amino acid depletion therapy in cancer. *Methods in enzymology*, *502*, 291-319.
- Cardaci, S., Rizza, S., Filomeni, G., Bernardini, R., Bertocchi, F., Mattei, M., ... & Ciriolo, M. R. (2012).** Glutamine deprivation enhances antitumor activity of 3-bromopyruvate through the stabilization of monocarboxylate transporter-1. *Cancer research*, *72*(17), 4526-4536.
- Carr, E. L., Kelman, A., Wu, G. S., Gopaul, R., Senkevitch, E., Aghvanyan, A., ... & Frauwirth, K. A. (2010).** Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T lymphocyte activation. *The Journal of Immunology*, *185*(2), 1037-1044.
- Casiano-Colón, A. I. D. A., & Marquis, R. E. (1988).** Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, *54*(6), 1318-1324.
- Cavuoto, P., & Fenech, M. F. (2012).** A review of methionine dependency and the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension. *Cancer treatment reviews*, *38*(6), 726-736.
- Chan, W. K., Lorenzi, P. L., Anishkin, A., Purwaha, P., Rogers, D. M., Sukharev, S., ... & Weinstein, J. N. (2014).** The glutaminase activity of L-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *123*(23), 3596-3606.
- Chand, S., Mahajan, R. V., Prasad, J. P., Sahoo, D. K., Mihooliya, K. N., Dhar, M. S., & Sharma, G. (2020).** A comprehensive review on microbial l-asparaginase: Bioprocessing, characterization, and industrial applications. *Biotechnology and applied biochemistry*, *67*(4), 619-647.
- Changou, C. A., Chen, Y. R., Xing, L., Yen, Y., Chuang, F. Y., Cheng, R. H., ... & Kung, H. J. (2014).** Arginine starvation-associated atypical cellular death involves mitochondrial

dysfunction, nuclear DNA leakage, and chromatin autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(39), 14147-14152.

Charlesworth, J. C., & Burns, B. P. (2015). Untapped resources: biotechnological potential of peptides and secondary metabolites in archaea. *Archaea*, 2015.

Chen, L., & Cui, H. (2015). Targeting glutamine induces apoptosis: a cancer therapy approach. *International journal of molecular sciences*, 16(9), 22830-22855.

Chorny, J. A., Barr, R. J., Kyshtoobayeva, A., Jakowatz, J., & Reed, R. J. (2003). Ki-67 and p53 expression in minimal deviation melanomas as compared with other nevocytic lesions. *Modern pathology*, 16(6), 525-529.

Chung, W. J., Lyons, S. A., Nelson, G. M., Hamza, H., Gladson, C. L., Gillespie, G. Y., & Sontheimer, H. (2005). Inhibition of cystine uptake disrupts the growth of primary brain tumors. *Journal of Neuroscience*, 25(31), 7101-7110.

Cluntun, A. A., Lukey, M. J., Cerione, R. A., & Locasale, J. W. (2017). Glutamine metabolism in cancer: understanding the heterogeneity. *Trends in cancer*, 3(3), 169-180.

Copley, S. D. (2003). Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic promiscuity. *Current opinion in chemical biology*, 7(2), 265-272.

Cordero, R. R., Damiani, A., Jorquera, J., Sepúlveda, E., Caballero, M., Fernandez, S., ... & Labbe, F. (2018). Ultraviolet radiation in the Atacama Desert. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 111, 1301-1313.

Corral, P., Amoozegar, M. A., & Ventosa, A. (2019). Halophiles and their biomolecules: recent advances and future applications in biomedicine. *Marine drugs*, 18(1), 33.

Costa-Silva, T. A., Costa, I. M., Biasoto, H. P., Lima, G. M., Silva, C., Pessoa, A., & Monteiro, G. (2020). Critical overview of the main features and techniques used for the evaluation of the clinical applicability of L-asparaginase as a biopharmaceutical to treat blood cancer. *Blood Reviews*, 43, 100651.

- Covini, D., Tardito, S., Bussolati, O., R Chiarelli, L., V Pasquetto, M., Digilio, R., ... & Scotti, C. (2012).** Expanding targets for a metabolic therapy of cancer: L-asparaginase. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, 7(1), 4-13.
- Das, K., Butler, G. H., Kwiatkowski, V., Clark, A. D., Yadav, P., & Arnold, E. (2004).** Crystal structures of arginine deiminase with covalent reaction intermediates: implications for catalytic mechanism. *Structure*, 12(4), 657-667.
- De Azambuja, E., Cardoso, F., de Castro, G., Colozza, M., Mano, M. S., Durbecq, V., ... & Paesmans, M. (2007).** Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. *British journal of cancer*, 96(10), 1504-1513.
- De Melo, N., Matutes, E., Cordone, I., Morilla, R., & Catovsky, D. (1992).** Expression of Ki-67 nuclear antigen in B and T cell lymphoproliferative disorders. *Journal of clinical pathology*, 45(8), 660-663.
- DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., & Thompson, C. B. (2007).** Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), 19345-19350.
- Delaporte, B., & Sasson, A. (1967).** Study of bacteria from arid soils of Morocco: *Brevibacterium haloterans* n. sp. and *Brevibacterium frigoritolerans* n. sp. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles*, 264(18), 2257-2260.
- Denkert, C., Loibl, S., Müller, B. M., Eidtmann, H., Schmitt, W. D., Eiermann, W., ... & Von Minckwitz, G. (2013).** Ki67 levels as predictive and prognostic parameters in pretherapeutic breast cancer core biopsies: a translational investigation in the neoadjuvant GeparTrio trial. *Annals of oncology*, 24(11), 2786-2793.
- Dhankhar, R., Gupta, V., Kumar, S., Kapoor, R. K., & Gulati, P. (2020).** Microbial enzymes for deprivation of amino acid metabolism in malignant cells: biological strategy for cancer treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 2857-2869.
- Douce, R., Bourguignon, J., Neuburger, M., & Rébeillé, F. (2001).** The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends in plant science*, 6(4), 167-176.

- Dufour, E., Gay, F., Aguera, K., Scoazec, J. Y., Horand, F., Lorenzi, P. L., & Godfrin, Y. (2012).** Pancreatic tumor sensitivity to plasma L-asparagine starvation. *Pancreas*, *41*(6), 940-948.
- El-Fakharany, E., Orabi, H., Abdelkhalek, E., & Sidkey, N. (2022).** Purification and biotechnological applications of L-asparaginase from newly isolated *Bacillus halotolerans* OHEM18 as antitumor and antioxidant agent. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *40*(9), 3837-3849.
- Elia, I., Broekaert, D., Christen, S., Boon, R., Radaelli, E., Orth, M. F., ... & Fendt, S. M. (2017).** Proline metabolism supports metastasis formation and could be inhibited to selectively target metastasizing cancer cells. *Nature communications*, *8*(1), 15267.
- El-Sayed, A. S. (2010).** Microbial L-methioninase: production, molecular characterization, and therapeutic applications. *Applied microbiology and biotechnology*, *86*, 445-467.
- Elsayed, S. S., Trusch, F., Deng, H., Raab, A., Prokes, I., Busarakam, K., ... & Rateb, M. E. (2015).** Chaxapeptin, a lasso peptide from extremotolerant *Streptomyces leeuwenhoekii* strain C58 from the hyperarid Atacama Desert. *The Journal of organic chemistry*, *80*(20), 10252-10260.
- Falkenius, J., Johansson, H., Tuominen, R., Frostvik Stolt, M., Hansson, J., & Egyhazi Brage, S. (2017).** Presence of immune cells, low tumor proliferation and wild type BRAF mutation status is associated with a favourable clinical outcome in stage III cutaneous melanoma. *BMC cancer*, *17*, 1-9.
- Fan, J., Ye, J., Kamphorst, J. J., Shlomi, T., Thompson, C. B., & Rabinowitz, J. D. (2014).** Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production. *Nature*, *510*(7504), 298-302.
- Fan, L., Bo, S., Chen, H., Ye, W., Kleinschmidt, K., Baumann, H. I., ... & Cai, D. (2011).** Genome sequence of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* gtP20b, isolated from the Indian ocean. *Journal of bacteriology*, *193*(5), 1276-1277.
- Felsenstein, J. (1981).** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of molecular evolution*, *17*, 368-376.

- Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010).** Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer*, 127(12), 2893-2917.
- Fernandes, H. S., Silva Teixeira, C. S., Fernandes, P. A., Ramos, M. J., & Cerqueira, N. M. F. S. A. (2017).** Amino acid deprivation using enzymes as a targeted therapy for cancer and viral infections. *Expert opinion on therapeutic patents*, 27(3), 283-297.
- Fuchs, B. C., & Bode, B. P. (2006).** Stressing out over survival: glutamine as an apoptotic modulator. *Journal of Surgical Research*, 131(1), 26-40.
- Fultang, L., Vardon, A., De Santo, C., & Mussai, F. (2016).** Molecular basis and current strategies of therapeutic arginine depletion for cancer. *International journal of cancer*, 139(3), 501-509.
- Gatson, J. W., Benz, B. F., Chandrasekaran, C., Satomi, M., Venkateswaran, K., & Hart, M. E. (2006).** *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(7), 1475-1484.
- Geck, R. C., & Toker, A. (2016).** Nonessential amino acid metabolism in breast cancer. *Advances in biological regulation*, 62, 11-17.
- Genderjahn, S., Alawi, M., Mangelsdorf, K., Horn, F., & Wagner, D. (2018).** Desiccation-and saline-tolerant bacteria and archaea in kalahari pan sediments. *Frontiers in microbiology*, 9, 2082.
- Ghasemi, A., Asad, S., Kabiri, M., & Dabirmanesh, B. (2017).** Cloning and characterization of *Halomonas elongata* L-asparaginase, a promising chemotherapeutic agent. *Applied microbiology and biotechnology*, 101, 7227-7238.
- Giddings, L. A., Newman, D. J., Giddings, L. A., & Newman, D. J. (2015).** *Bioactive compounds from terrestrial extremophiles* (pp. 1-75). Springer International Publishing.
- Gómez Fernández, E. J., Delgado Romero, J. A., & González Grau, J. M. (2018).** Evaluación de factores ambientales sobre la actividad enzimática extracelular de los microorganismos en

suelos. Influencia de la temperatura y la desecación. XV Reunión de la Red Nacional de Microorganismos Extremófilos Programa y resúmenes C40 pág. 68.

Gonçalves, V. N., Cantrell, C. L., Wedge, D. E., Ferreira, M. C., Soares, M. A., Jacob, M. R., ... & Rosa, L. H. (2016). Fungi associated with rocks of the Atacama Desert: taxonomy, distribution, diversity, ecology and bioprospection for bioactive compounds. *Environmental microbiology*, 18(1), 232-245.

Gonzalez, N. J. (1969). Enzyme therapy and cancer. *Metabolic Pathways*.

Green, C. R., Wallace, M., Divakaruni, A. S., Phillips, S. A., Murphy, A. N., Ciaraldi, T. P., & Metallo, C. M. (2016). Branched-chain amino acid catabolism fuels adipocyte differentiation and lipogenesis. *Nature chemical biology*, 12(1), 15-21.

Greenberg, D. M., Blumenthal, G., & Ramadan, M. E. A. (1964). Effect of administration of the enzyme glutaminase on the growth of cancer cells. *Cancer Research*, 24(6_Part_1), 957-963.

Gulati, R., Saxena, R. K., & Gupta, R. (1997). A rapid plate assay for screening l-asparaginase producing micro-organisms. *Letters in applied microbiology*, 24(1), 23-26.

Gupta, N., Miyauchi, S., Martindale, R. G., Herdman, A. V., Podolsky, R., Miyake, K., ... & Ganapathy, V. (2005). Upregulation of the amino acid transporter ATB0,+ (SLC6A14) in colorectal cancer and metastasis in humans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1741(1-2), 215-223.

Gupta, N., Prasad, P. D., Ghamande, S., Moore-Martin, P., Herdman, A. V., Martindale, R. G., ... & Ganapathy, V. (2006). Up-regulation of the amino acid transporter ATB0,+ (SLC6A14) in carcinoma of the cervix. *Gynecologic oncology*, 100(1), 8-13.

Hall, P. A., Richards, M. A., Gregory, W. M., d'Ardenne, A. J., Lister, T. A., & Stansfeld, A. G. (1988). The prognostic value of Ki67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *The Journal of pathology*, 154(3), 223-235.

- Hall, T. A. (1999, January).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98).
- Hensley, C. T., Wasti, A. T., & DeBerardinis, R. J. (2013).** Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *The Journal of clinical investigation*, 123(9), 3678-3684.
- Hernández, Y., Lobo, E., Martínez, S., & Zamora, L. (2009).** Evaluación de diferentes métodos de extracción de ADN de micoplasmas para su empleo en el diagnóstico por PCR. *Revista de Salud Animal*, 31(2), 108-114.
- Horn, F. (1933).** The breakdown of arginine to citrulline by *Bacillus pyocyaneus*. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 216, 244-247.
- Hosios, A. M., Hecht, V. C., Danai, L. V., Johnson, M. O., Rathmell, J. C., Steinhauser, M. L., ... & Vander Heiden, M. G. (2016).** Amino acids rather than glucose account for the majority of cell mass in proliferating mammalian cells. *Developmental cell*, 36(5), 540-549.
- Hult, K., & Berglund, P. (2007).** Enzyme promiscuity: mechanism and applications. *Trends in biotechnology*, 25(5), 231-238.
- Jain, M., Nilsson, R., Sharma, S., Madhusudhan, N., Kitami, T., Souza, A. L., ... & Mootha, V. K. (2012).** Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science*, 336(6084), 1040-1044.
- Jiang, H., Dong, H., Zhang, G., Yu, B., Chapman, L. R., & Fields, M. W. (2006).** Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. *Applied and environmental microbiology*, 72(6), 3832-3845.
- Jones, R. L., Salter, J., A'Hern, R., Nerurkar, A., Parton, M., Reis-Filho, J. S., ... & Dowsett, M. (2009).** The prognostic significance of Ki67 before and after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 116, 53-68.
- Jurmeister, P., Bockmayr, M., Treese, C., Stein, U., Lenze, D., Jöhrens, K., ... & von Laffert, M. (2019).** Immunohistochemical analysis of Bcl-2, nuclear S100A4, MITF and Ki67 for risk

stratification of early-stage melanoma—A combined IHC score for melanoma risk stratification. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 17(8), 800-808.

Karunakaran, S., Umapathy, N. S., Thangaraju, M., Hatanaka, T., Itagaki, S., Munn, D. H., ... & Ganapathy, V. (2008). Interaction of tryptophan derivatives with SLC6A14 (ATB0,+) reveals the potential of the transporter as a drug target for cancer chemotherapy. *Biochemical Journal*, 414(3), 343-355.

Kaur, B., & Kaur, R. (2016). Purification of a dimeric arginine deiminase from *Enterococcus faecium* GR7 and study of its anti-cancerous activity. *Protein Expression and Purification*, 125, 53-60.

Kawatra, A., Dhankhar, R., & Gulati, P. (2022). Microbial arginine deiminase: A multifaceted green catalyst in biomedical sciences. *International Journal of Biological Macromolecules*, 196, 151-162.

Khersonsky, O., Malitsky, S., Rogachev, I., & Tawfik, D. S. (2011). Role of chemistry versus substrate binding in recruiting promiscuous enzyme functions. *Biochemistry*, 50(13), 2683-2690.

Kim, J. Y., Heo, S. H., Choi, S. K., Song, I. H., Park, I. A., Kim, Y. A., ... & Lee, H. J. (2017). Glutaminase expression is a poor prognostic factor in node-positive triple-negative breast cancer patients with a high level of tumor-infiltrating lymphocytes. *Virchows Archiv*, 470, 381-389.

Kim, J., & DeBerardinis, R. J. (2019). Mechanisms and implications of metabolic heterogeneity in cancer. *Cell metabolism*, 30(3), 434-446.

Kim, R. H., & Meehan, S. A. (2017). Immunostain use in the diagnosis of melanomas referred to a tertiary medical center: a 15-year retrospective review (2001–2015). *Journal of Cutaneous Pathology*, 44(3), 221-227.

Kiruthika, J., & Swathi, S. (2019). Purification and characterization of a novel broad spectrum anti-tumor L-glutaminase enzyme from marine *Bacillus subtilis* strain JK-79. *African Journal of Microbiology Research*, 13(12), 232-244.

- Knott, S. R., Wagenblast, E., Khan, S., Kim, S. Y., Soto, M., Wagner, M., ... & Hannon, G. J. (2018).** Asparagine bioavailability governs metastasis in a model of breast cancer. *Nature*, 554(7692), 378-381.
- Komathi, S., Rajalakshmi, G., Savetha, S., & Balaji, S. (2013).** Isolation, production and partial purification of l-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* by solid state fermentation. *Sch. Acad. J. Pharm.*, 2(2), 55-59.
- Korver, K., Boeschoten, E. W., Krediet, R. T., Van Steenis, G., & Schellekens, P. (1987).** Dose-response effects in immunizations with keyhole limpet haemocyanin and rabies vaccine: shift in some immunodeficiency states. *Clinical and experimental immunology*, 70(2), 328.
- Kreipe, H. (2018).** Ki67: biological intertumor variance versus variance of assay. *Der Pathologe*, 39, 272-277.
- Kucher, C., Zhang, P. J., Pasha, T., Elenitsas, R., Wu, H., Ming, M. E., ... & Xu, X. (2004).** Expression of Melan-A and Ki-67 in desmoplastic melanoma and desmoplastic nevi. *The American journal of dermatopathology*, 26(6), 452-457.
- Kuo, T. C., Chen, C. K., Hua, K. T., Yu, P., Lee, W. J., Chen, M. W., ... & Kuo, M. L. (2016).** Glutaminase 2 stabilizes Dicer to repress Snail and metastasis in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer letters*, 383(2), 282-294.
- Kushner, D. J. (1978).** Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. *Microbial life in extreme environments*, 317-368.
- Kushner, D. J. (1988).** Physiology of halophilic eubacteria. *Halophilic bacteria*, 109-138.
- Labuschagne, C. F., Van Den Broek, N. J., Mackay, G. M., Vousden, K. H., & Maddocks, O. D. (2014).** Serine, but not glycine, supports one-carbon metabolism and proliferation of cancer cells. *Cell reports*, 7(4), 1248-1258.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., ... & Higgins, D. G. (2007).** Clustal W and Clustal X version 2.0. *bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.

- Leu, S. Y., & Wang, S. R. (1992).** Clinical significance of arginase in colorectal cancer. *Cancer*, 70(4), 733-736.
- Li, L. X. L., Crotty, K. A., Scolyer, R. A., Thompson, J. F., Kril, J. J., Palmer, A. A., & McCarthy, S. W. (2003).** Use of multiple cytometric markers improves discrimination between benign and malignant melanocytic lesions: a study of DNA microdensitometry, karyometry, argyrophilic staining of nucleolar organizer regions and MIB1-Ki67 immunoreactivity. *Melanoma research*, 13(6), 581-586.
- Lieu, E. L., Nguyen, T., Rhyne, S., & Kim, J. (2020).** Amino acids in cancer. *Experimental & molecular medicine*, 52(1), 15-30.
- Lim, J. M., Jeon, C. O., Lee, S. M., Lee, J. C., Xu, L. H., Jiang, C. L., & Kim, C. J. (2006).** *Bacillus salarius* sp. nov., a halophilic, spore-forming bacterium isolated from a salt lake in China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(2), 373-377.
- Lindboe, C. F., & Torp, S. H. (2002).** Comparison of Ki-67 equivalent antibodies. *Journal of clinical pathology*, 55(6), 467-471.
- Lo, M., Ling, V., Wang, Y. Z., & Gout, P. W. (2008).** The xc⁻ cystine/glutamate antiporter: a mediator of pancreatic cancer growth with a role in drug resistance. *British journal of cancer*, 99(3), 464-472.
- Locasale, J. W. (2013).** Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nature Reviews Cancer*, 13(8), 572-583.
- Lomelino, C. L., Andring, J. T., McKenna, R., & Kilberg, M. S. (2017).** Asparagine synthetase: Function, structure, and role in disease. *Journal of Biological Chemistry*, 292(49), 19952-19958.
- Lukey, M. J., Katt, W. P., & Cerione, R. A. (2017).** Targeting amino acid metabolism for cancer therapy. *Drug discovery today*, 22(5), 796-804.
- Ma, Z., Wang, N., Hu, J., & Wang, S. (2012).** Isolation and characterization of a new iturinic lipopeptide, mojavensin A produced by a marine-derived bacterium *Bacillus mojavensis* B0621A. *The Journal of antibiotics*, 65(6), 317-322.

- Ma, X., Wu, Y., Zhang, T., Song, H., Jv, H., Guo, W., & Ren, G. (2017).** Ki67 proliferation index as a histopathological predictive and prognostic parameter of oral mucosal melanoma in patients without distant metastases. *Journal of Cancer*, 8(18), 3828.
- Maddocks, O. D., Berkers, C. R., Mason, S. M., Zheng, L., Blyth, K., Gottlieb, E., & Vousden, K. H. (2013).** Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. *Nature*, 493(7433), 542-546.
- Maddocks, O. D., Athineos, D., Cheung, E. C., Lee, P., Zhang, T., Van Den Broek, N. J., ... & Vousden, K. H. (2017).** Modulating the therapeutic response of tumours to dietary serine and glycine starvation. *Nature*, 544(7650), 372-376.
- Maggi, M., & Scotti, C. (2019).** Enzymes in metabolic anticancer therapy. *Therapeutic Enzymes: Function and Clinical Implications*, 173-199.
- Majhi, K., Let, M., Halder, U., & Bandopadhyay, R. (2023).** Copper adsorption potentiality of *Bacillus stercoris* GKSM6 and *Pseudomonas alcaliphila* GKSM11 isolated from Singhbhum copper mines. *Geomicrobiology Journal*, 40(2), 193-202.
- Martínez-Martínez, I., Navarro-Fernández, J., Lozada-Ramírez, J. D., García-Carmona, F., & Sánchez-Ferrer, Á. (2006).** Maximization of Production of His-Tagged Glycine Oxidase and Its M261 Mutant Proteins. *Biotechnology progress*, 22(3), 647-652.
- Martínez-Núñez, M. A., & Pérez-Rueda, E. (2016).** Do lifestyles influence the presence of promiscuous enzymes in bacteria and Archaea metabolism?. *Sustainable Chemical Processes*, 4(1), 1-5.
- Matés, J. M., Segura, J. A., Alonso, F. J., & Márquez, J. (2006).** Pathways from glutamine to apoptosis. *Front Biosci*, 11(3), 3164-80.
- Mazloun-Ravasan, S., Madadi, E., Fathi, Z., Mohammadi, A., Mosafer, J., Mansoori, B., ... & Darvishi, F. (2020).** The effect of *Yarrowia lipolytica* L-asparaginase on apoptosis induction and inhibition of growth in Burkitt's lymphoma Raji and acute lymphoblastic leukemia MOLT-4 cells. *International journal of biological macromolecules*, 146, 193-201.

- McKay, C. P., Friedmann, E. I., Gómez-Silva, B., Cáceres-Villanueva, L., Andersen, D. T., & Landheim, R. (2003).** Temperature and moisture conditions for life in the extreme arid region of the Atacama Desert: four years of observations including the El Niño of 1997–1998. *Astrobiology*, 3(2), 393-406.
- Miyazaki, K., Takaku, H., Umeda, M., Fujita, T., Huang, W., Kimura, T., ... & Horio, T. (1990).** Potent growth inhibition of human tumor cells in culture by arginine deiminase purified from a culture medium of a Mycoplasma-infected cell line. *Cancer research*, 50(15), 4522-4527.
- Moffatt, B. A., & Ashihara, H. (2002).** Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 1.
- Monstadt, G. M., & Holldorf, A. W. (1991).** Arginine deiminase from *Halobacterium salinarum*. Purification and properties. *Biochemical Journal*, 273(3), 739-745.
- Moretti, S., Massobrio, R., Brogelli, L., Novelli, M., Giannotti, B., & Bernengo, M. G. (1990).** Ki67 antigen expression correlates with tumor progression and HLA-DR antigen expression in melanocytic lesions. *Journal of investigative dermatology*, 95(3), 320-324.
- Mosmann, T. (1983).** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Nachtigall, J., Kulik, A., Helaly, S., Bull, A. T., Goodfellow, M., Asenjo, J. A., ... & Fiedler, H. P. (2011).** Atacamycins A–C, 22-membered antitumor macrolactones produced by *Streptomyces* sp. C38. *The Journal of Antibiotics*, 64(12), 775-780.
- Naidu, M. U. R., Ramana, G. V., Rani, P. U., Suman, A., & Roy, P. (2004).** Chemotherapy-induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis-complicating the treatment of cancer. *Neoplasia*, 6(5), 423-431.
- Nakamura, A., Nambu, T., Ebara, S., Hasegawa, Y., Toyoshima, K., Tsuchiya, Y., ... & Hara, T. (2018).** Inhibition of GCN2 sensitizes ASNS-low cancer cells to asparaginase by disrupting the amino acid response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(33), E7776-E7785.

- Nandakumar, R., Yoshimune, K., Wakayama, M., & Moriguchi, M. (2003).** Microbial glutaminase: biochemistry, molecular approaches and applications in the food industry. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 23(2-6), 87-100.
- Navarro-González, R., Rainey, F. A., Molina, P., Bagaley, D. R., Hollen, B. J., de la Rosa, J., ... & McKay, C. P. (2003).** Mars-like soils in the Atacama Desert, Chile, and the dry limit of microbial life. *Science*, 302(5647), 1018-1021.
- Nielsen, P. S., Riber-Hansen, R., Jensen, T. O., Schmidt, H., & Steiniche, T. (2013).** Proliferation indices of phosphohistone H3 and Ki67: strong prognostic markers in a consecutive cohort with stage I/II melanoma. *Modern Pathology*, 26(3), 404-413.
- Nishiya, Y., & Imanaka, T. (1998).** Purification and characterization of a novel glycine oxidase from *Bacillus subtilis*. *FEBS letters*, 438(3), 263-266.
- Oettgen, H. F., Stephenson, P. A., Schwartz, M. K., Leeper, R. D., Tallal, L., Tan, C. C., ... & Burchenal, J. H. (1970).** Toxicity of *E. coli* L-asparaginase in man. *Cancer*, 25(2), 253-278.
- Oren, A. (2008).** Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline systems*, 4, 1-13.
- Pandian, S. R. K., Deepak, V., Sivasubramaniam, S. D., Nellaiah, H., & Sundar, K. (2014).** Optimization and purification of anticancer enzyme L-glutaminase from *Alcaligenes faecalis* KLU102. *Biologia*, 69, 1644-1651.
- Patel, N. Y., Baria, D. M., Yagnik, S. M., Rajput, K. N., Panchal, R. R., & Raval, V. H. (2021).** Bio-prospecting the future in perspective of amidohydrolase L-glutaminase from marine habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 5325-5340.
- Penault-Llorca, F., & Radosevic-Robin, N. (2017).** Ki67 assessment in breast cancer: an update. *Pathology*, 49(2), 166-171.
- Petronini, P. G., Urbani, S., Alfieri, R., Borghetti, A. F., & Guidotti, G. G. (1996).** Cell susceptibility to apoptosis by glutamine deprivation and rescue: Survival and apoptotic death in cultured lymphoma-leukemia cell lines. *Journal of cellular physiology*, 169(1), 175-185.

- Pieters, R., Hunger, S. P., Boos, J., Rizzari, C., Silverman, L., Baruchel, A., ... & Pui, C. H. (2011).** L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on Erwinia asparaginase. *Cancer*, *117*(2), 238-249.
- Pokrovsky, V. S., Chepikova, O. E., Davydov, D. Z., Zamyatnin Jr, A. A., Lukashev, A. N., & Lukasheva, E. V. (2019).** Amino acid degrading enzymes and their application in cancer therapy. *Current medicinal chemistry*, *26*(3), 446-464.
- Pollari, S., Käkönen, S. M., Edgren, H., Wolf, M., Kohonen, P., Sara, H., ... & Kallioniemi, O. (2011).** Enhanced serine production by bone metastatic breast cancer cells stimulates osteoclastogenesis. *Breast cancer research and treatment*, *125*, 421-430.
- Pradhan, A. K., Pradhan, N., Mall, G., Panda, H. T., Sukla, L. B., Panda, P. K., & Mishra, B. K. (2013).** Application of lipopeptide biosurfactant isolated from a halophile: *Bacillus tequilensis* CH for inhibition of biofilm. *Applied biochemistry and biotechnology*, *171*, 1362-1375.
- Rath, S., Palit, K., & Das, S. (2022).** Variable pH and subsequent change in pCO₂ modulates the biofilm formation, synthesis of extracellular polymeric substances, and survivability of a marine bacterium *Bacillus stercoris* GST-03. *Environmental Research*, *214*, 114128.
- Ren, P. G., & Zhou, P. J. (2005).** *Salinibacillus aidingensis* gen. nov., sp. nov. and *Salinibacillus kushneri* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from a neutral saline lake in Xinjiang, China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *55*(2), 949-953.
- Roberts, M. S., Nakamura, L. K., & Cohan, F. M. (1994).** *Bacillus mojavensis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and differences in fatty acid composition. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *44*(2), 256-264.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, *4*(4), 406-425.
- Savoca, K. V., Davis, F. F., Van Es, T., McCoy, J. R., & Palczuk, N. C. (1984).** Cancer therapy with chemically modified enzymes. II. The therapeutic effectiveness of arginase, and arginase

modified by the covalent attachment of polyethylene glycol, on the taper liver tumor and the L5178Y murine leukemia. *Cancer biochemistry biophysics*, 7(3), 261-268.

Schlotter, C. M., Tietze, L., Vogt, U., Heinsen, C. V., & Hahn, A. (2017). Ki67 and lymphocytes in the pretherapeutic core biopsy of primary invasive breast cancer: positive markers of therapy response prediction and superior survival. *Hormone molecular biology and clinical investigation*, 32(2), 20170022.

Seckbach, J., Oren, A., & Stan-Lotter, H. (Eds.). (2013). *Polyextremophiles: life under multiple forms of stress* (Vol. 27). Springer Science & Business Media.

Sharma, A., Bala, K., & Husain, I. (2017). Preliminary evaluation of arginine deiminase activity of indigenous bacterial strains for suitable chemotherapeutic applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12, 66-77.

Shirazian, P., Asad, S., & Amoozegar, M. A. (2016). The potential of halophilic and halotolerant bacteria for the production of antineoplastic enzymes: L-asparaginase and L-glutaminase. *EXCLI journal*, 15, 268.

Sinclair, L. V., Rolf, J., Emslie, E., Shi, Y. B., Taylor, P. M., & Cantrell, D. A. (2013). Control of amino-acid transport by antigen receptors coordinates the metabolic reprogramming essential for T cell differentiation. *Nature immunology*, 14(5), 500-508.

Singh, H., Kaur, M., Singh, S., Mishra, S., Kumar, S., Vemuluri, V. R., ... & Pinnaka, A. K. (2018). *Salibacterium nitratireducens* sp. nov., a haloalkalitolerant bacterium isolated from a water sample from Sambhar salt lake, India. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(11), 3506-3511.

Singh, P., Jain, K., Desai, C., Tiwari, O., & Madamwar, D. (2019). Microbial community dynamics of extremophiles/extreme environment. In *Microbial diversity in the genomic era* (pp. 323-332). Academic Press.

Singla, P., & Bhardwaj, R. D. (2020). Enzyme promiscuity—A light on the “darker” side of enzyme specificity. *Biocatalysis and Biotransformation*, 38(2), 81-92.

- Snell, K., Natsumeda, Y., & Weber, G. (1987).** The modulation of serine metabolism in hepatoma 3924A during different phases of cellular proliferation in culture. *Biochemical Journal*, 245(2), 609-612.
- Song, P., Ye, L., Fan, J., Li, Y., Zeng, X., Wang, Z., ... & Ju, D. (2015).** Asparaginase induces apoptosis and cytoprotective autophagy in chronic myeloid leukemia cells. *Oncotarget*, 6(6), 3861.
- Song P, Wang Z, Zhang X, Fan J, Li Y, Chen Q, Wang S, Liu P, Luan J, Ye L, Ju D (2017).** The role of autophagy in asparaginase-induced immune suppression of macrophages. *Cell Death Dis* 8(3):e2721.
- Stackebrandt, E. R. K. O. (1993).** Nucleic acids and classification. *Handbook of new bacterial systematics*, 151-194.
- Steinbeck, Z. R., Heselmeyer, K. M., Gerlach, B., Björnhagen, V., & Auer, G. U. (1996).** Diagnostic impact of nuclear DNA content and proliferative activity in benign and malignant melanocytic lesions. *Melanoma Research*, 6(1), 37-43.
- Still, E. R., & Yuneva, M. O. (2017).** Hopefully devoted to Q: targeting glutamine addiction in cancer. *British journal of cancer*, 116(11), 1375-1381.
- Sugimura, K., Ohno, T., Kusuyama, T., & Azuma, I. (1992).** High sensitivity of human melanoma cell lines to the growth inhibitory activity of mycoplasmal arginine deiminase in vitro. *Melanoma research*, 2(3), 191-196.
- Takaku, H., Takase, M., Abe, S. I., Hayashi, H., & Miyazaki, K. (1992).** In vivo anti-tumor activity of arginine deiminase purified from *Mycoplasma arginini*. *International journal of cancer*, 51(2), 244-249.
- Tamura, K., & Nei, M. (1993).** Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution*, 10(3), 512-526.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021).** MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027.

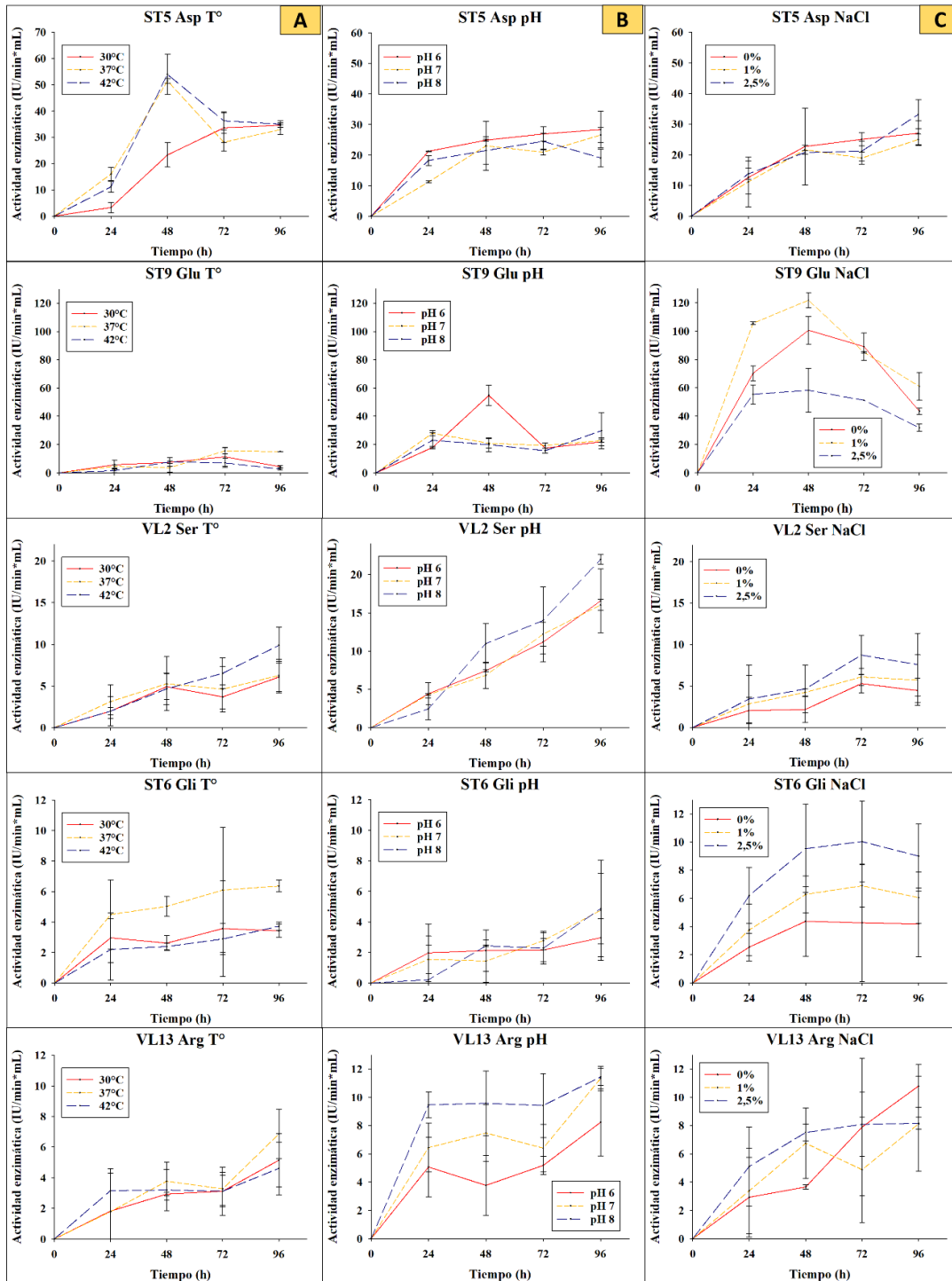
- Tanaka, H., Esaki, N., Yamamoto, T., & Soda, K. (1976).** Purification and properties of methioninase from *Pseudomonas ovalis*. *FEBS letters*, 66(2), 307-311.
- Tsai, W. B., Aiba, I., Lee, S. Y., Feun, L., Savaraj, N., & Kuo, M. T. (2009).** Resistance to arginine deiminase treatment in melanoma cells is associated with induced argininosuccinate synthetase expression involving c-Myc/HIF-1 α /Sp4. *Molecular cancer therapeutics*, 8(12), 3223-3233.
- UmaMaheswari, T., Hemalatha, T., Sankaranarayanan, P., & Puvanakrishnan, R. (2016).** Enzyme therapy: Current perspectives. *Indian J. Exp. Biol.* 54, 7–16.
- Urruticoechea, A., Smith, I. E., & Dowsett, M. (2005).** Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *Journal of clinical oncology*, 23(28), 7212-7220.
- Urusova, D. V., Isupov, M. N., Antonyuk, S., Kachalova, G. S., Obmolova, G., Vagin, A. A., ... & Schnackerz, K. D. (2012).** Crystal structure of D-serine dehydratase from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1824(3), 422-432.
- Van Trimpont, M., Peeters, E., De Visser, Y., Schalk, A. M., Mondelaers, V., De Moerloose, B., ... & Van Vlierberghe, P. (2022).** Novel insights on the use of L-asparaginase as an efficient and safe anti-cancer therapy. *Cancers*, 14(4), 902.
- Vaughn, A. E., & Deshmukh, M. (2008).** Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome c. *Nature cell biology*, 10(12), 1477-1483.
- Vijayakumar, N. (2021).** Review on halophilic microbes and their applications. *Bull Env Pharmacol Life Sci*, 10, 23-36.
- Vishnuvardhan Reddy, S., Thirumala, M., Sasikala, C., & Venkata Ramana, C. (2015).** *Salibacterium halotolerans* gen. nov., sp. nov., a bacterium isolated from a salt pan, reclassification of *Bacillus qingdaonensis* as *Salibacterium qingdaonense* comb. nov. and *Bacillus halochares* as *Salibacterium halochares* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(Pt_11), 4270-4275.

- Von Minckwitz, G., Schmitt, W. D., Loibl, S., Müller, B. M., Blohmer, J. U., Sinn, B. V., ... & Denkert, C. (2013).** Ki67 measured after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Clinical cancer research*, 19(16), 4521-4531.
- Wang, Y. Q., Liu, X. M., Tang, J., Yang, G. Q., & Yu, Z. (2018).** *Salibacterium lacus* sp. nov., a halophilic, non-spore-forming bacterium isolated from sediment of a saline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1), 113-117.
- Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927).** The metabolism of tumors in the body. *The Journal of general physiology*, 8(6), 519.
- Ward, P. S., & Thompson, C. B. (2012).** Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer cell*, 21(3), 297-308.
- Werber, G., Ahlke, E., Nowak-Göttl, U., Jürgens, H., Verspohl, E. J., & Boos, J. (1997).** Asparaginase activities in vitro are highly sensitive to different buffer conditions. In *Acute Leukemias VI: prognostic factors and treatment strategies* (pp. 512-516). Springer Berlin Heidelberg.
- Wetzler, M., Sanford, B. L., Kurtzberg, J., DeOliveira, D., Frankel, S. R., Powell, B. L., ... & Larson, R. A. (2007).** Effective asparagine depletion with pegylated asparaginase results in improved outcomes in adult acute lymphoblastic leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 9511. *Blood*, 109(10), 4164-4167.
- Wheatley, D. N. (2004).** Controlling cancer by restricting arginine availability—arginine-catabolizing enzymes as anticancer agents. *Anti-cancer drugs*, 15(9), 825-833.
- Williams, D., & Fingleton, B. (2019).** Non-canonical roles for metabolic enzymes and intermediates in malignant progression and metastasis. *Clinical & experimental metastasis*, 36(3), 211-224.
- Wollina, U., Kilian, U., Henkel, U., Schaarschmidt, H., & Knopf, B. (1991).** The initial steps of tumor progression in melanocytic lineage: a histochemical approach. *Anticancer research*, 11(4), 1405-1414.

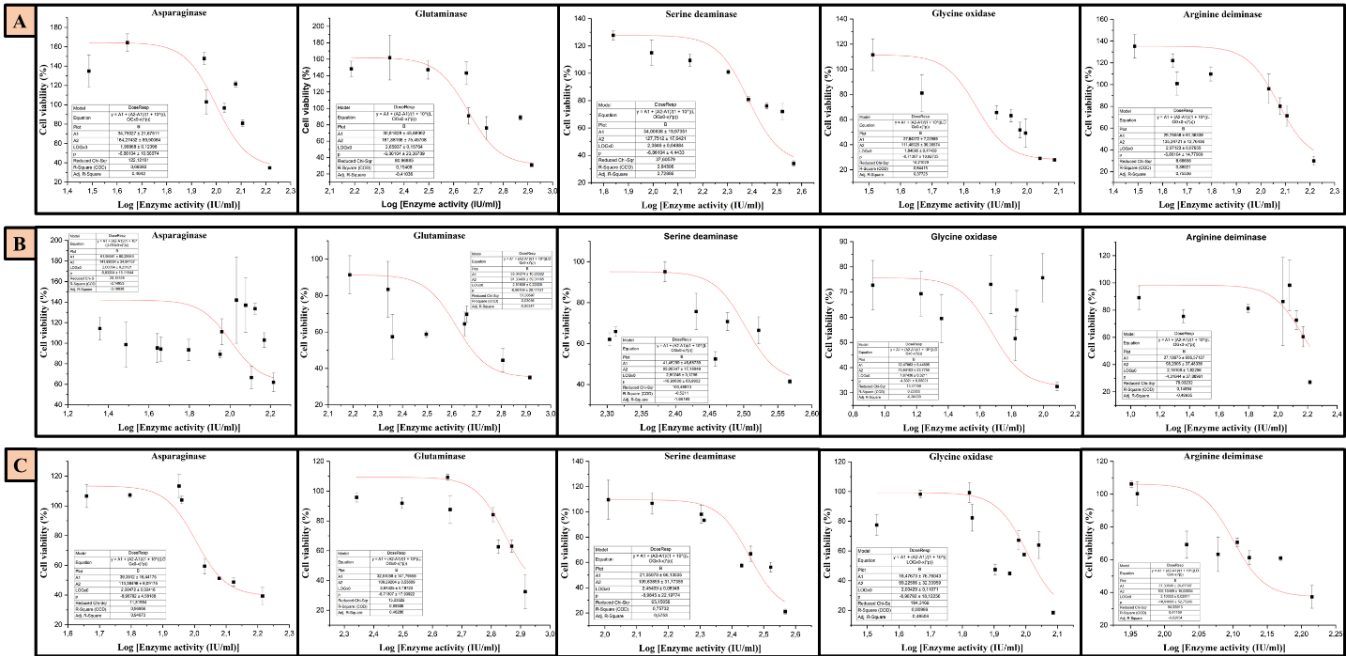
- World Health Organization. (2020).** WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all.
- Xu, X. L., Chen, S., & Grant, G. A. (2011).** Kinetic, mutagenic, and structural homology analysis of L-serine dehydratase from *Legionella pneumophila*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 515(1-2), 28-36.
- Yang, G., Miton, C. M., & Tokuriki, N. (2020).** A mechanistic view of enzyme evolution. *Protein Science*, 29(8), 1724-1747.
- Yoshikuni, Y., Ferrin, T. E., & Keasling, J. D. (2006).** Designed divergent evolution of enzyme function. *Nature*, 440(7087), 1078-1082.
- Young, C. R., Ebringer, A., & Archer, J. (1978).** Antigen dose and strain variation as factors in the genetic control of the immune response to sperm whale myoglobin. *Immunology*, 34(3), 571.
- Zhang, A., Wang, X., Fan, C., & Mao, X. (2021).** The role of Ki67 in evaluating neoadjuvant endocrine therapy of hormone receptor-positive breast cancer. *Frontiers in endocrinology*, 12, 687244.
- Zhang, Y., Morar, M., & Ealick, S. E. (2008).** Structural biology of the purine biosynthetic pathway. *Cellular and molecular life sciences*, 65, 3699-3724.
- Zolfaghar, M., Amoozegar, M. A., & Khajeh, K. (2016).** Production of extracellular L-asparaginase by halophilic bacterium *Vibrio* sp. *Biological Journal of Microorganism*, 5(18), 41-54.
- Zolfaghar, M., Amoozegar, M. A., Khajeh, K., Babavalian, H., & Tebyanian, H. (2019).** Isolation and screening of extracellular anticancer enzymes from halophilic and halotolerant bacteria from different saline environments in Iran. *Molecular biology reports*, 46, 3275-3286.

ANEXOS

Anexo A. Efecto de distintos factores (temperatura **A**, pH **B**, % NaCl **C**) sobre la producción las 5 enzimas seleccionadas. Las barras de error representan el error estándar de la media para n = 3.



Anexo B. Efectos antiproliferativos de las enzimas purificadas en líneas celulares de melanoma RQ (A), melanoma DFB (B) y MCF-7 (C). Se usó el programa OriginalPRO 2023b, para calcular el EC₅₀. Las células se trataron por triplicado con diferentes concentraciones expresadas en actividad enzimática nominal (IU/ml) durante 24 h y se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo MTT.



Anexo C. Datos para análisis comparativo entre viabilidad celular (MTT) y proliferación celular (%Ki67) en tres líneas celulares (melanoma RQ y DFB y Cáncer de mama MCF-7) expuestas a cinco enzimas purificadas (asparaginasa, glutaminasa, serina desaminasa, glicina oxidasa y arginina deiminasa)

Línea Celular	Enzima	Tratamiento	Porcentaje Ki67	MTT	Desviación estándar MTT
RQ	Asparaginasa	0,0	97,9	100,0	0,0
RQ	Asparaginasa	0,5	27,4	102,9	12,6
RQ	Asparaginasa	0,7	12,0	80,9	3,3
RQ	Asparaginasa	0,9	78,9	34,8	0,6
RQ	Glutaminasa	0,0	97,9	100,0	0,0
RQ	Glutaminasa	0,5	35,7	90,8	10,0
RQ	Glutaminasa	0,7	6,2	118,7	9,0
RQ	Glutaminasa	0,9	93,4	30,8	2,7
RQ	Serina desaminasa	0,0	97,9	100,0	0,0
RQ	Serina desaminasa	0,5	48,8	82,2	18,8
RQ	Serina desaminasa	0,7	5,7	76,1	2,1
RQ	Serina desaminasa	0,9	82,6	34,0	1,9
RQ	Glicina oxidasa	0,0	97,9	100,0	0,0
RQ	Glicina oxidasa	0,5	35,0	38,4	8,8
RQ	Glicina oxidasa	0,7	4,7	51,7	6,3
RQ	Glicina oxidasa	0,9	73,4	27,8	1,0
RQ	Arginina deiminasa	0,0	97,9	100,0	0,0
RQ	Arginina deiminasa	0,5	37,2	81,3	4,6
RQ	Arginina deiminasa	0,7	6,9	71,3	9,6
RQ	Arginina deiminasa	0,9	98,5	29,8	4,1
DFB	Asparaginasa	0,0	97,6	100,0	0,0
DFB	Asparaginasa	0,5	39,7	111,1	12,6
DFB	Asparaginasa	0,7	81,2	66,5	10,9
DFB	Asparaginasa	0,9	61,1	62,0	9,0
DFB	Glutaminasa	0,0	97,6	100,0	0,0
DFB	Glutaminasa	0,5	50,8	69,7	4,5
DFB	Glutaminasa	0,7	52,8	44,5	6,4
DFB	Glutaminasa	0,9	77,9	35,0	1,0
DFB	Serina desaminasa	0,0	97,6	100,0	0,0
DFB	Serina desaminasa	0,5	58,8	65,9	2,2
DFB	Serina desaminasa	0,7	67,9	52,5	3,6
DFB	Serina desaminasa	0,9	44,7	41,5	1,0
DFB	Glicina oxidasa	0,0	97,6	100,0	0,0
DFB	Glicina oxidasa	0,5	58,7	62,9	7,7
DFB	Glicina oxidasa	0,7	73,8	41,9	11,8
DFB	Glicina oxidasa	0,9	70,1	32,5	1,6
DFB	Arginina deiminasa	0,0	97,6	100,0	0,0

DFB	Arginina deiminasa	0,5	90,7	59,7	5,9
DFB	Arginina deiminasa	0,7	76,5	58,1	9,1
DFB	Arginina deiminasa	0,9	60,1	27,1	1,6
MCF-7	Asparaginasa	0,0	42,7	100,0	0,0
MCF-7	Asparaginasa	0,5	28,5	104,0	2,5
MCF-7	Asparaginasa	0,7	23,6	83,2	4,4
MCF-7	Asparaginasa	0,9	18,1	39,4	5,8
MCF-7	Glutaminasa	0,0	42,7	100,0	0,0
MCF-7	Glutaminasa	0,5	52,0	87,6	9,3
MCF-7	Glutaminasa	0,7	57,9	84,2	4,8
MCF-7	Glutaminasa	0,9	1,2	32,5	11,4
MCF-7	Serina desaminasa	0,0	42,7	100,0	0,0
MCF-7	Serina desaminasa	0,5	52,1	93,3	1,3
MCF-7	Serina desaminasa	0,7	40,6	66,8	6,0
MCF-7	Serina desaminasa	0,9	3,2	21,1	1,9
MCF-7	Glicina oxidasa	0,0	42,7	100,0	0,0
MCF-7	Glicina oxidasa	0,5	58,7	82,3	8,9
MCF-7	Glicina oxidasa	0,7	41,9	67,3	6,4
MCF-7	Glicina oxidasa	0,9	8,7	18,5	1,2
MCF-7	Arginina deiminasa	0,0	42,7	100,0	0,0
MCF-7	Arginina deiminasa	0,5	58,0	100,2	7,3
MCF-7	Arginina deiminasa	0,7	62,6	70,6	2,5
MCF-7	Arginina deiminasa	0,9	33,6	37,3	7,0
