



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

**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS CON POTENCIAL ACTIVIDAD
ANTICANCERÍGENA A PARTIR DE MUESTRAS DE LA
FOSA DE ATACAMA**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

NATALY JAVIERA NAVEAS MOLINA

PROFESOR GUÍA:
JUAN ASENJO DE LEUZE DE LANCIZOLLE

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
BARBARA ANDREWS FARROW
IRENE MARTÍNEZ BASTERRECHEA

SANTIAGO DE CHILE
2022

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR
AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN
BIOTECNOLOGÍA
POR: NATALY JAVIERA NAVEAS MOLINA
FECHA: 2022
PROF. GUÍA: JUAN A. ASENJO

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA A PARTIR DE MUESTRAS DE LA FOSA DE ATACAMA

El cáncer es una enfermedad que tiene gran relevancia en la actualidad por ser uno de los problemas de salud más graves en el mundo. Es por ello que existe la necesidad de buscar nuevas opciones terapéuticas, donde los compuestos bioactivos se presentan como una alternativa prometedora. En los últimos años, la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos se ha centrado en los microorganismos de ambientes extremos.

Chile es un país con condiciones climáticas únicas, lo cual le entrega ventajas comparativas para el estudio de comunidades microbianas que habitan ambientes extremos. En el año 2019, se hizo una exploración a la fosa de Atacama donde se lograron recolectar muestras a distintas profundidades oceánicas. Estas muestras están siendo analizadas por investigadores del Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CeBiB), quienes lograron el aislamiento de cepas de Actinobacterias que poseen un gran valor biotecnológico.

Los objetivos de este trabajo son evaluar la potencial actividad anticancerígena de dos cepas de bacterias (n°36 y n°63) aisladas de la Fosa de Atacama contra la línea tumoral de tiroide de rata UCHT1. Para esto, se reúnen los antecedentes necesarios, se realiza una extracción de metabolitos por solventes y se diseña una metodología alternativa para medir bioactividad mediante el kit *LIVE/DEAD*. La obtención de imágenes por microscopía fluorescente permitirá realizar gráficos de inhibición del crecimiento celular de cada una de las cepas estudiadas, los que servirán como indicadores de actividad anticancerígena.

Como principales resultados de esta investigación, se obtuvo que los solventes que permiten una mejor recuperación de la fase orgánica son el éter de petróleo y el acetato de etilo. Con el extracto obtenido a partir del solvente acetato, se obtuvo un 71,01 % de actividad anticancerígena para la cepa n°36. Mientras que para el extracto de éter, se obtuvo un 69,82 % de actividad para la cepa n°36 y un 80,5 % para la cepa n°63. Siendo esta última cepa la que presenta el máximo porcentaje de actividad en todos los extractos evaluados.

En conclusión, con este trabajo se logra determinar la presencia de actividad anticancerígena en dos cepas de Actinobacterias aisladas de muestras de la fosa de Atacama, por lo que es importante que se continúen realizando estudios considerando los factores identificados y avanzar en la investigación de nuevos metabolitos bioactivos con posibles usos farmacéuticos para tratar el cáncer.

*No importa lo que decidas hacer,
asegúrate de que te haga feliz.*

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi familia, quienes me han visto crecer y han estado siempre presente. A mis padres y a mi hermano, por todo el cariño, paciencia y apoyo incondicional que me han dado, significa mucho para mí. Mil gracias!

A mis amigas de toda la vida, que a pesar de los años, la amistad se conserva intacta. Gracias por ser quienes son y por estar presente sobretodo en los momentos más difíciles.

A mis compañeros que conocí en los primeros años de Beauchef porque fue ahí cuando hice mis primeras amistades, las que se mantienen hasta el día de hoy. También, gracias a todos con quienes compartí en el ámbito deportivo o extra-académico, que me apañaron en cada cosa que se me ocurría, hasta a subir un cerro el finde...

A mi profesor guía Juan A. Asenjo y a la profesora Barbara Andrews por todo el conocimiento entregado a lo largo de la carrera, por permitirme desarrollar este tema de investigación. Por su gran apoyo y comprensión en los momentos más críticos de este trabajo.

A Diego Sandoval y Carol Jara por la confianza entregada, que me permitieron formar parte de su investigación con las bacterias de la Fosa de Atacama. Y a Giannina Maya, por sus palabras de apoyo y su buena disposición en todo momento.

A Sebastián Guerrero, por su gran paciencia para enseñar y por aconsejarme en gran parte del desarrollo experimental de este trabajo. Al profesor Pablo Caviedes y a Guillermo Elorza, quienes me recibieron en el Laboratorio de Terapia Celular de la Facultad de Medicina, donde pasé largas horas trabajando en el último año.

Tabla de Contenido

1. Introducción	1
1.1. Marco teórico	2
1.1.1. Chile como laboratorio natural	2
1.1.2. Fosa de Atacama	2
1.1.3. Actinobacterias como fuente de metabolitos bioactivos	3
1.1.4. Nuevos anticancerígenos producidos por actinomicetos marinos	3
1.1.4.1. Salinosporamida A	3
1.1.4.2. Tiocoralina	4
1.1.5. Extracción de metabolitos secundarios	5
1.1.6. Métodos de evaluación de actividad anticancerígena	6
1.1.6.1. Ensayo MTT	6
1.1.6.2. Ensayo de viabilidad/citotoxicidad <i>LIVE/DEAD</i>	6
1.1.7. Estudios de actividad anticancerígena en Actinobacterias	7
1.1.7.1. Revisión de antecedentes bibliográficos	7
1.1.8. Línea celular cancerígena UCHT1	10
1.2. Objetivos	11
1.2.1. Objetivo general	11
1.2.2. Objetivos específicos	11
1.3. Limitaciones	11
2. Materiales y metodología	12
2.1. Materiales	12
2.1.1. Cultivo de bacterias extremófilas	12
2.1.2. Extracción de metabolitos bioactivos	13
2.1.3. Bioensayos de actividad anticancerígena	13
2.2. Metodología	14
2.2.1. Cultivos de bacterias extremófilas	14
2.2.2. Extracción de metabolitos bioactivos	15
2.2.3. Cultivo de células animales	16
2.2.4. Bioensayos actividad anticancerígena	17
3. Resultados y discusión	18
3.1. Cultivos de bacterias extremas	18
3.2. Extracción de metabolitos bioactivos	21
3.3. Evaluación de la actividad anticancerígena	24
3.3.1. Control	24

3.3.2.	Extracto 36E	25
3.3.3.	Extracto 36A	26
3.3.4.	Extracto 63E	27
3.3.5.	Extracto 63A	28
3.3.6.	Porcentaje de actividad anticancerígena	29
3.3.6.1.	Cepa n°36	29
3.3.6.2.	Cepa n°63	31
3.4.	Discusión metodológica	34
4.	Conclusiones	35
	Bibliografía	36
	Anexos	40
A.	Medios de cultivo	40
A.1.	Bacterias	40
A.1.1.	Medio marino MB	40
A.1.2.	Medio M2 líquido	41
A.2.	Células animales	41
A.2.1.	Medio DMEM/F12 base	41
A.2.2.	Medio DMEM/F12 con suero	41
A.2.3.	PBS salino	42
A.2.4.	Solución D	42
A.2.5.	Medio de congelación	43
A.2.6.	Solución D con Tripsina	43

Índice de Tablas

1.1.	Resumen de estudios de actividad anticáncer entre 2015 y 2021.	7
3.1.	Cantidad de fase orgánica recuperada según la cepa utilizada.	22
3.2.	Concentración de los extractos crudos según la cepa y el solvente utilizado . .	23
A.1.	Reactivos para la preparación de 100 mL de medio MB.	40
A.2.	Reactivos para la preparación de 100 mL de medio M2.	41
A.3.	Reactivos para la preparación de 1000 mL de medio DMEM/F12.	41
A.4.	Reactivos para la preparación de 250 mL de medio DMEM/F12 con suero. . .	42
A.5.	Reactivos para la preparación de 1000 mL de PBS salino.	42
A.6.	Reactivos para la preparación de 1000 mL de solución D.	42
A.7.	Reactivos para la preparación de 100 mL de medio de congelación.	43
A.8.	Reactivos para la preparación de 100 mL de medio de congelación.	43

Índice de Ilustraciones

1.1.	Estructura química de la salinosporamida A(Feling et al., 2003).	4
1.2.	Estructura química de la tiocoralina (Teszazghi et al., 2013).	4
1.3.	Detección antiproliferativa de extractos crudos de <i>Streptomyces</i> derivados de sedimentos marinos del mar de Bisaya contra el carcinoma de ovario humano, A2780. Los extractos crudos (verde) se analizaron a 2 [mg/mL], el control positivo (rojo) cisplatino se analizó a 0,0041 [mg/mL] (Tenebro et al., 2021).	8
1.4.	(A)Efecto de diferentes concentraciones de extracto de la cepa 196 contra la línea celular de cáncer de pulmón humano A549. (B) Gráfico representativo del porcentaje de células muertas totales (Kumar et al., 2021).	9
3.1.	Cultivos de bacterias de la fosa de Atacama. (A)-(B) Cepa n°36 en medio sólido MB. (C)-(D) Cepa n°63 en medio sólido M2.	18
3.2.	Cultivos en placa de la cepa n°63. (A)-(B) Cepa n° 63 en medio sólido M2. (C)-(D) Cepa n°63 en medio sólido MB.	19
3.3.	Separación de fases para la cepa n°63 utilizando 3 solventes diferentes. (A) Separación de fases utilizando como solvente éter de petróleo. (B) Separación de fases utilizando acetato de etilo. (C) Separación de fases utilizando cloroformo.	21
3.4.	Separación de fases para la cepa n°63 utilizando 3 solventes diferentes. (A) Separación de fases utilizando como solvente éter de petróleo. (B) Separación de fases utilizando acetato de etilo.	22
3.5.	Ensayo de control. Cultivo de la línea celular UCHT1 en solución D. (A) Células cancerígenas en medio DMEM/F12, previo a adicionar la solución D. (B)-(D) Células cancerígenas en solución D, luego de 1 hr de incubación. Células viables (verde), células muertas (rojo). Aumento de 10x.	24
3.6.	Cultivo de la línea celular UCHT1 en Solucion D con extracto 36E. (A) Células cancerígenas en medio DMEM/F12, previo a adicionar el extracto 36E. (B)-(D) Células cancerígenas con extracto 36E, luego de 1 hr de incubación. Células viables (verde), células muertas (rojo). Aumento de 10x.	25
3.7.	Cultivo de la línea celular UCHT1 en Solucion D con extracto 36A. (A) Células cancerígenas en medio DMEM/F12, previo a adicionar el extracto 36A. (B)-(D) Células cancerígenas con extracto 36A, luego de 1 hr de incubación. Células viables (verde), células muertas (rojo). Aumento de 10x.	26
3.8.	Cultivo de la línea celular UCHT1 en Solucion D con extracto 63E. (A) Células cancerígenas en medio DMEM/F12, previo a adicionar el extracto 63E. (B)-(D) Células cancerígenas con extracto 63E, luego de 1 hr de incubación. Células viables (verde), células muertas (rojo). Aumento de 10x.	27

3.9.	Cultivo de la línea celular UCHT1 en Solucion D con extracto 63A. (A) Células cancerígenas en medio DMEM/F12, previo a adicionar el extracto 63A. (B)-(D) Células cancerígenas con extracto 63A, luego de 1 hr de incubación. Células viables (verde), células muertas (rojo). Aumento de 10x.	28
3.10.	Actividad anticancerígena de dos extractos crudos de la cepa n°36 contra la línea celular de cáncer de tiroide de rata UCHT1.	29
3.11.	Actividad anticancerígena de dos extractos crudos de la cepa n°36 contra la línea celular de cáncer de tiroide de rata UCHT1. Gráfico normalizado por el porcentaje del control.	30
3.12.	Actividad anticancerígena de dos extractos crudos de la cepa n°63 contra la línea celular de cáncer de tiroide de rata UCHT1.	31
3.13.	Actividad anticancerígena de dos extractos crudos de la cepa n°63 contra la línea celular de cáncer de tiroide de rata UCHT1. Gráfico normalizado por el porcentaje del control.	31
3.14.	Comparación de la actividad anticancerígena de las cepas n°36 y n°63 con respecto al control.	33

Capítulo 1

Introducción

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se pueden originar en cualquier órgano o tejido del cuerpo cuando las células anormales crecen de forma descontrolada. Se trata de una de las principales causas de muerte en el mundo; en el año 2018 se diagnosticaron un total de 18,1 millones de personas con cáncer y 9,6 millones murieron a causa de esta enfermedad (Organización Mundial de la Salud, 2021).

En Chile, el cáncer representa la segunda causa de muerte, solo detrás de las enfermedades cardiovasculares. En específico, el cáncer de pulmón se ubica con un 12,6 % como la principal causa de muerte, seguido del cáncer de estómago con un 12,2 %, y el cáncer colorrectal con un 11,1 %. En el caso de las mujeres, en primer lugar se encuentra el cáncer de mama con un 5,9 % de mortalidad. Se proyecta que para el 2040 habrá un incremento del 60 % en el número de casos, siendo el cáncer la primera causa de muerte en el país (Parra-Soto et. al, 2020).

Las opciones tradicionales de tratamiento son la cirugía, radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, estas dos últimas pueden provocar efectos adversos para la salud, tales como toxicidad gastrointestinal, lesión del sistema hematopoyético, neurotoxicidad, etc. Estos efectos nocivos conllevan una reducción de la calidad de vida en los pacientes y, en ocasiones, dan lugar a la interrupción del tratamiento. Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar las opciones terapéuticas disponibles para evitar estos efectos perjudiciales (Prieto, 2015).

Una de las nuevas alternativas terapéuticas es la búsqueda de compuestos anticancerígenos producidos por microorganismos que habitan en ambientes extremos. Estudios recientes de bioprospección se han centrado en distintas zonas del desierto de Atacama, los que han mostrado resultados prometedores, logrando caracterizar nuevas especies de bacterias extremas que producen compuestos con potenciales aplicaciones biotecnológicas (Busarakam et al., 2014; Goodfellow et al., 2017; Santhanam et al., 2013).

Por lo anterior, el presente trabajo de título tiene como propósito contribuir con la investigación de microorganismos que habitan en ambientes extremos. En particular, se espera contribuir con el estudio de bacterias aisladas de la fosa de Atacama, las que tienen una capacidad de producir metabolitos con potencial actividad anticancerígena. Para evaluar dicha actividad, se realizarán cultivos en medio líquido de dos cepas de la fosa de Atacama, se hará una extracción por solventes de los cultivos para obtener metabolitos y se diseñará una metodología para realizar bioensayos contra la línea tumoral de tiroide de rata UCHT1.

1.1. Marco teórico

1.1.1. Chile como laboratorio natural

Un laboratorio natural es un territorio geográfico con condiciones únicas de clima que lo convierten en una singularidad a nivel mundial. Estas condiciones le entregan grandes ventajas comparativas para el desarrollo de proyectos de investigación científica (Aguilera, 2018). En el caso de Chile, su principal característica es la longitud de su territorio, el que se extiende por alrededor de 4.200 km desde la región de Arica y Parinacota, donde comienza el altiplano y desierto chileno, hasta la Región de Magallanes y la Antártica chilena, donde existen condiciones ambientales extremas que desafían la vida (Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, 2013).

Chile posee una gran biodiversidad de ecosistemas terrestres y marinos únicos en el mundo, los que albergan una gran variedad de especies. El año 2002 se reportaron un total de 28.490 especies nativas, llegando a 31.099 especies descritas el año 2016, las que comprenden principalmente animales, plantas y hongos (Ministerio del Medio Ambiente, 2020). Pese a esto, aún no se dispone de suficiente información acerca de los ecosistemas microbianos presentes en nuestro país. Por este motivo, en los próximos años se espera que haya un aumento en investigación básica y aplicada, con el objetivo de identificar y caracterizar los ecosistemas microbianos. Una iniciativa destacada que permite disminuir las brechas de conocimiento en el área es el mapa microbiano realizado por la Red Chilena de Ecología Microbiana, con el que se busca dar a conocer algunos de los microorganismos aislados en Chile (Microbiale, 2020).

1.1.2. Fosa de Atacama

Aunque la biodiversidad en la superficie terrestre es extraordinaria, la mayor biodiversidad se encuentra en los océanos. Más del 70 % de la superficie de nuestro planeta está cubierta por océanos. En algunos ecosistemas marinos, como los fondos marinos y los arrecifes de coral, se estima que la diversidad biológica es mayor que en las selvas tropicales (Lu et al., 2020).

Los ecosistemas marinos son considerados como un recurso importante para el descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas. En particular, las fosas oceánicas profundas son algunos de los hábitats menos explorados de la Tierra. Existen alrededor de 15 fosas oceánicas con profundidades superiores a 7.000 m, las que poseen elevadas presiones, bajos porcentajes de oxígeno y ausencia de luz. A pesar de estas condiciones extremas, en este tipo de ambientes se pueden encontrar microorganismos capaces de producir nuevas moléculas bioactivas (Sivalingam et al., 2019).

La fosa de Atacama está ubicada frente a las costas de Perú y Chile, se trata de una de las fosas oceánicas más profundas del mundo, alcanzando una profundidad de 8.065 m aproximadamente. En una exploración realizada en el barco alemán Sonne se recolectaron muestras a distintas profundidades de la fosa. Las que actualmente se encuentran siendo analizadas por investigadores del Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CeBiB).

1.1.3. Actinobacterias como fuente de metabolitos bioactivos

El filo Actinobacteria corresponde a bacterias Gram-positivas filamentosas con un alto contenido de G-C (69% aprox.) en su ADN. *Streptomyces* se considera como el género de mayor número dentro del filo Actinobacteria. En la actualidad, se han descrito más de 500 especies, las que en su mayoría habitan en suelos y ecosistemas marinos (Ayuso et al., 2005). Estas bacterias son la principal fuente de compuestos bioactivos, ya que albergan diferentes grupos de genes, lo que produce diferentes compuestos con diversas estructuras químicas. La mayoría de estos compuestos se secretan en el caldo de fermentación y se pueden extraer con disolventes orgánicos (Bode et al., 2002).

Las Actinobacterias son las procariotas de mayor valor económico y biotecnológico, producen más de 10.000 compuestos bioactivos, 7.600 derivados de *Streptomyces* y 2.500 compuestos derivados de actinomicetos raros. Alrededor del 70% de todos los productos de actinomicetos exhiben actividades antibacterianas y/o antifúngicas (Tiwari, 2014). El género *Streptomyces* ha sido el más estudiado porque se ha hallado que sus distintas especies son capaces de producir aproximadamente dos tercios de los antibióticos más usados clínicamente (Tanaka & Mura, 1993).

La explotación de los actinomicetos como fuente para el descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios aún se encuentra en etapa temprana, no obstante en los últimos años ha ido creciendo la cantidad de metabolitos descubiertos. Los recientes avances en instrumentación para el aislamiento y caracterización de productos naturales ha aumentado la tasa de descubrimiento de varios metabolitos secundarios de aplicación biomédica (Tiwari, 2014). En particular, los actinomicetos que habitan sedimentos de aguas profundas son de gran interés para la producción de nuevos bioproductos, tales como potenciales agentes terapéuticos para tratar el cáncer (Rateb et al., 2011).

1.1.4. Nuevos anticancerígenos producidos por actinomicetos marinos

1.1.4.1. Salinosporamida A

En las últimas décadas, el descubrimiento más significativo de nuevos agentes anticancerígenos es la salinosporamida A (Figura 1.1). Se trata de una nueva β -lactona- γ -lactama bicíclica aislada de un caldo de fermentación del actinomiceto *Salinispora tropica*. En su estructura química posee un anillo bicíclico de gran similitud con el conocido inhibidor del proteasoma Omuralida, lo que sugirió que este compuesto también podría actuar como inhibidor del proteasoma 20S. Se ha demostrado que actúa mediante la unión irreversible a la subunidad β del proteasoma, induciendo la apoptosis en células de mieloma múltiple (Feling et al., 2003).

Desde el año 2006 está siendo desarrollado por *Nereus Pharmaceuticals, Inc.* y se encuentra en fase I de ensayos clínicos en humanos para el tratamiento del mieloma múltiple, por lo que es considerado como un gran candidato clínico para el tratamiento del cáncer.

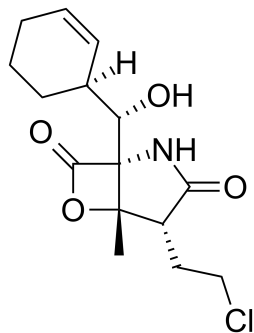


Figura 1.1: Estructura química de la salinosporamida A (Feling et al., 2003).

1.1.4.2. Tiocoralina

Otro metabolito bioactivo de interés es la tiocoralina perteneciente a la familia de los tiodepsipéptidos (Figura 1.2). Se trata de un compuesto cíclico aislado de una cepa de *Micromonospora* cerca de la costa de Mozambique en el Océano Índico (Romero et al., 1997). Tiocoralina demostró una potente citotoxicidad *in vitro* contra la línea celular epitelial alveolar humana (A-549), la línea celular de melanoma humano (MEL-28) y la línea celular de leucemia murina (P-388) con valores de IC_{50} de 0,002 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Además, se demostró que posee una alta citotoxicidad contra la línea celular de carcinoma medular de tiroides humano (MTC-TT), mediante la detención del ciclo celular en la fase G1 y la activación de la vía de señalización Notch que cumple el rol de supresor de tumores (Tsfazghi et al., 2013).

La literatura publicada recientemente sugiere que la tiocoralina aún se encuentra en evaluación preclínica avanzada, pero dado que mostró buenos resultados a concentraciones nanomolares bajas, presenta claramente oportunidades para el desarrollo como agente anticancerígeno.

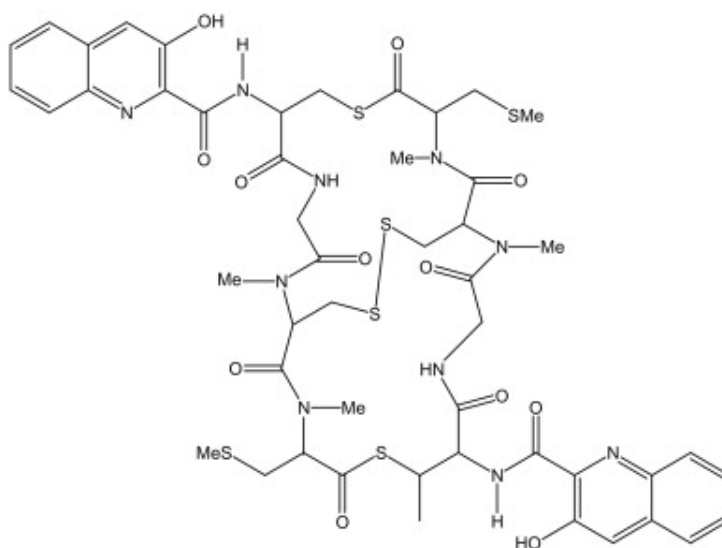


Figura 1.2: Estructura química de la tiocoralina (Tsfazghi et al., 2013).

1.1.5. Extracción de metabolitos secundarios

La extracción por solventes es una de las técnicas de separación líquido-líquido más utilizada en el campo de la ingeniería en biotecnología para obtener metabolitos secundarios. Es un método para separar compuestos en función de sus solubilidades relativas en dos líquidos inmiscibles diferentes, por lo general agua (polar) y un solvente orgánico (apolar). Una vez que se completa la transferencia química de los compuestos, el sistema pasa a una configuración estable donde es posible observar la separación de fases. En los laboratorios se realiza la separación utilizando embudos de decantación, donde el extracto se recupera mediante la llave de paso del embudo. Luego, el soluto se puede recuperar por otros métodos como la evaporación de solventes a presión reducida en un evaporador rotatorio (Zhang et. al, 2013).

Para la elección de los solventes se deben cumplir las condiciones que se detallan a continuación:

- Alta solubilidad para el soluto objetivo y baja solubilidad para el diluyente.
- Densidad diferente a la del diluyente para facilitar la estratificación.
- Fácil separación del soluto después de la extracción.
- Baja toxicidad para un posterior uso industrial.

Algunos de los problemas comunes en este tipo de extracción incluyen la formación de emulsiones y el uso de grandes volúmenes de solventes orgánicos tóxicos; además que el proceso puede ser lento debido a la pequeña diferencia de densidad entre las dos fases inmiscibles (Lavilla et al., 2009).

Kupchan et al. (1973) diseñaron una metodología para identificar solventes de extracción, donde utilizan como solventes el cloroformo, éter de petróleo y tetracloruro de carbono. Para este trabajo de título se usará una versión modificada de la metodología de Kupchan, según los solventes disponibles en el laboratorio del Centro de Biotecnología y Bioingeniería (Ce-BiB).

1.1.6. Métodos de evaluación de actividad anticancerígena

1.1.6.1. Ensayo MTT

Para evaluar la actividad anticancerígena preliminar en términos de viabilidad celular, el ensayo de citotoxicidad MTT se considera como uno de los más económicos, confiables y convenientes. Esto se debe a su facilidad de uso, precisión y rápida indicación de toxicidad. Los ensayos *in vitro* emplean métodos colorimétricos para determinar el número de células viables en función de la actividad mitocondrial. El reactivo que se utiliza es el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio, el que se reduce dentro de las células vivas para formar un colorante de formazán insoluble (Berg et al, 1994).

Luego, se deben agregar agentes solubilizantes para disolver el producto de formazán. Esto funciona según el principio de que la enzima Deshidrogenasa que produce NADH o NADHP, reduce la sal de tetrazolio incolora en un producto de formazán coloreado que es soluble en agua. Así, la cantidad de producto coloreado es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo, ya que el reactivo MTT sólo puede ser reducido a formazán por células que estén metabólicamente activas (McCauley et al., 2013).

1.1.6.2. Ensayo de viabilidad/citotoxicidad *LIVE/DEAD*

Corresponde a un ensayo para determinar la viabilidad de las células en una población. Se basa en la actividad de la esterasa intracelular y la integridad de la membrana plasmática, ya que estas son características distintivas de las células vivas. El kit *LIVE/DEAD* discrimina rápidamente las células viables de las células no viables mediante la tinción simultánea con calceína verde fluorescente para indicar actividad de esterasa intracelular y homodímero-1 de etidio rojo fluorescente para indicar la pérdida de integridad de la membrana plasmática. Es un ensayo seguro que puede utilizarse en microscopía de fluorescencia y proporciona una diferenciación rápida entre células viables (verde fluorescente) y no viables (rojo fluorescente) (ThermoFisher, 2022).

Para ambos métodos, la citotoxicidad de cada muestra se puede expresar como un valor IC_{50} . Este valor corresponde a la concentración de la muestra de prueba que provoca una inhibición del 50 % del crecimiento celular promediada a partir de los experimentos repetidos (Balachandran et al., 2014). El Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos estimó que el valor de IC_{50} tiene que ser inferior a 30 ppm para que un extracto tenga una alta actividad citotóxica (Gao et al., 2012).

1.1.7. Estudios de actividad anticancerígena en Actinobacterias

En esta sección se recopilan algunos estudios realizados entre 2015 y 2021, donde se menciona específicamente el aislamiento de actinomicetos. Se recupera la información con respecto a las condiciones de cultivo (medio, tiempo de incubación, temperatura, RPM); el solvente usado en la extracción de metabolitos y los resultados de la evaluación de extractos con actividad anticancerígena contra distintas líneas celulares de cáncer.

1.1.7.1. Revisión de antecedentes bibliográficos

En la Tabla 1.1 se muestra un resumen de los antecedentes bibliográficos recopilados para los estudios realizados entre 2015 y 2021.

Tabla 1.1: Resumen de estudios de actividad anticáncer entre 2015 y 2021.

Microorganismo	Medio de cultivo	Incubación (días)	Temperatura (°C)	RPM	Solvente	Línea celular	Actividad anticancerígena	Autores
<i>S. leeuwenhoekii</i> C58	ISP2	7	30	180	Acetato de etilo, Hexano	Cáncer pulmón A549	-	Elsayed et al.(2015)
<i>S. aburaviensis</i>	ISP2	7	30	200	Acetato de etilo	Cáncer de pulmón A549	$IC_{50} = 25$ ppm	Ramirez- Rodriguez et al. (2018)
<i>S. gramineus</i>	ISP2	7	30	200	Acetato de etilo	Cáncer de próstata PC3	$IC_{50} = 6,14$ ppm	Ramirez- Rodriguez et al. (2018)
<i>S. psammoticus</i>	ISP2	7	30	200	Acetato de etilo	Cáncer de mama MDA-MB-231	$IC_{50} = 35,53$ ppm	Ramirez- Rodriguez et al. (2018)
<i>Streptomyces</i> sp.	MM1	14	28	200	Acetato de etilo	Carcinoma de ovario humano A2780	96 % (2 mg/ml)	Tenebro et al. (2021)
<i>Streptomyces</i> sp. 196	YM	15	28	200	Acetato de etilo	Cáncer pulmón A549	98,7% (1 mg/ml)	Kumar et al. (2021)

A partir de la información recopilada se puede deducir que el medio de cultivo más utilizado para la producción de compuestos con actividad anticancerígena es ISP2. Algunos estudios confirman que la naturaleza de las fuentes de nitrógeno afecta fuertemente la producción de compuestos bioactivos. Raytapadar y Paul (2001) encontraron que el medio ISP2 con extracto de levadura favorece el crecimiento de *Streptomyces*.

Con respecto a las otras condiciones de cultivo, las más recurrentes son un tiempo de incubación de 7 días, temperatura de 30°C y 200 RPM. Mientras que para la extracción de metabolitos en todas las publicaciones se utilizó acetato de etilo como solvente.

En cuanto a los resultados de actividad anticancerígena, para el estudio de Elsayed et al. (2015) no se reportan porcentajes de actividad. Por el contrario, en la publicación de Ramirez-Rodriguez et al. (2018) se reportan valores para el IC_{50} en unidades ppm. Por último, los autores Tenebro et al. (2021) y Kumar et al.(2021) reportan los porcentajes de actividad anticancerígena en función de la concentración de extracto utilizado. Esto es relevante porque entrega información de cómo se presentan los resultados de actividad.

Cabe mencionar que todos los estudios resumidos en la Tabla 1.1 utilizaron el ensayo de MTT para analizar la actividad anticancerígena del extracto contra diferentes líneas cancerígenas humanas, siendo la línea celular más estudiada la de cáncer de pulmón A549.

Entre todos los estudios recopilados anteriormente, destacan los resultados de Tenebro et al. (2021), ya que realizaron cultivos de una cepa de *Streptomyces* aislada de sedimentos marinos del mar de Bisaya.

A continuación, en el gráfico de la Figura 1.3 se muestra uno de sus principales resultados, donde se observa que los extractos de *Streptomyces* marinos presentaron distintos porcentajes de bioactividad contra el cáncer de ovario humano A2780. En específico, se puede ver que a una concentración de 2 [mg/mL], el aislado DSD015 tuvo el porcentaje de inhibición más alto con un 96 %, seguido por los aislados DSD011 y DSD040 con un 73 % y un 71 % de inhibición, respectivamente.

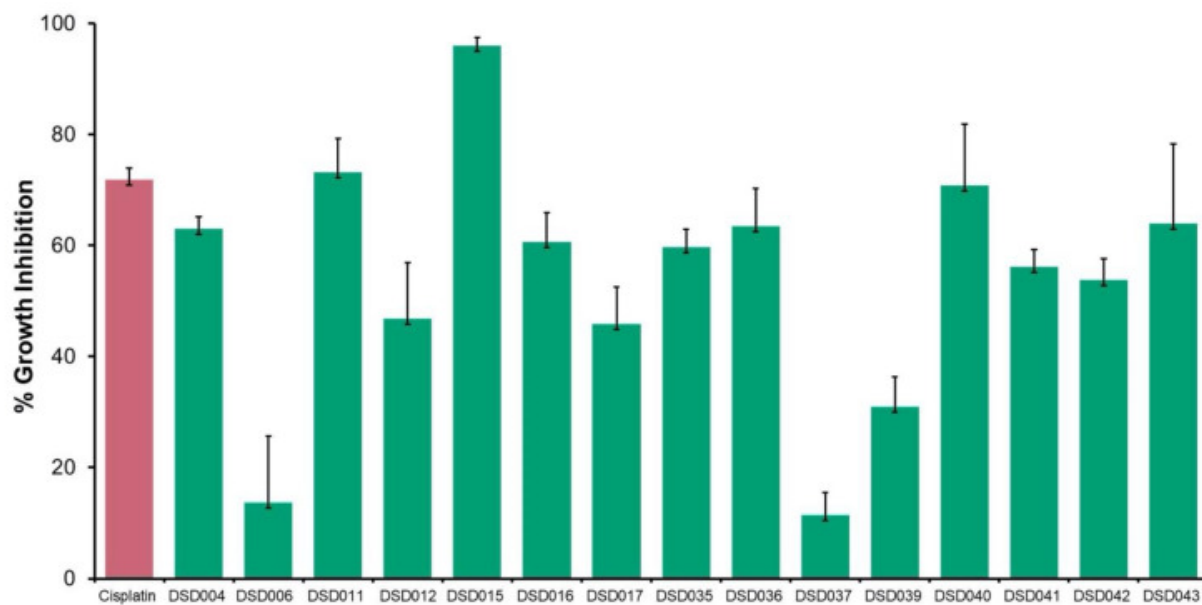


Figura 1.3: Detección antiproliferativa de extractos crudos de *Streptomyces* derivados de sedimentos marinos del mar de Bisaya contra el carcinoma de ovario humano, A2780. Los extractos crudos (verde) se analizaron a 2 [mg/mL], el control positivo (rojo) cisplatino se analizó a 0,0041 [mg/mL] (Tenebro et al., 2021).

También, es de relevancia mencionar los resultados del estudio realizado por Kumar et al. (2021), ya que fue la única investigación donde se utilizó la metodología de fluorescencia para evaluar la actividad de extractos de *Streptomyces sp.* 196 contra la línea celular de cáncer de pulmón humano A549. En este ensayo se utilizó naranja de acridina y bromuro de etidio (AO-EtBr) para evaluar la actividad anticancerígena. Luego de 24 hrs de incubación con el extracto, se recolectaron las células, se mezcló la suspensión unicelular (8 μ l) con tinción de AO-EtBr (1 mg/ml; 1:1 v/v) y se incubaron durante 2 min. Para finalizar, las células se visualizaron con un microscopio de fluorescencia (Make-Nikon ECLIPSE Ti-S, Japón) usando un aumento de 10x.

En la Figura 1.4.(A), se pueden observar las imágenes obtenidas para la evaluación de actividad anticancerígena de los extractos de la cepa 196 contra la línea celular de cáncer de pulmón humano A549, donde se observa que la viabilidad depende de la concentración del extracto y del tiempo transcurrido. Mientras que en la Figura 1.4.(B) se observa que se alcanza el mayor porcentaje de apoptosis de un 98,7% cuando se utiliza una concentración de extracto de 1 [mg/mL], luego de 24 hrs de incubación.

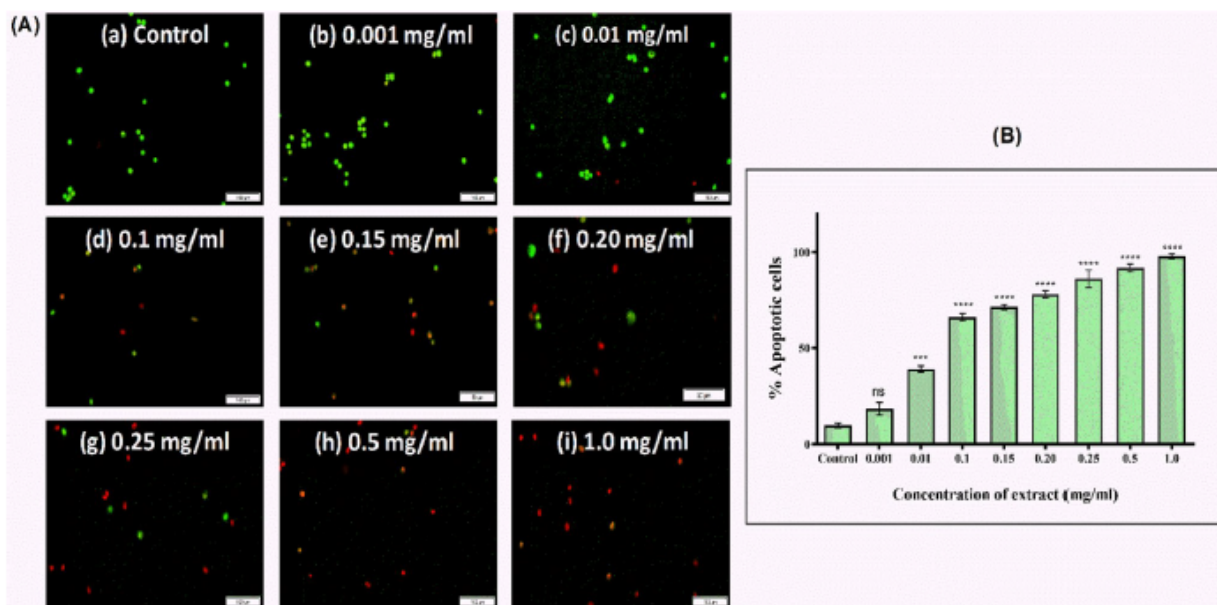


Figura 1.4: (A) Efecto de diferentes concentraciones de extracto de la cepa 196 contra la línea celular de cáncer de pulmón humano A549. (B) Gráfico representativo del porcentaje de células muertas totales (Kumar et al., 2021).

1.1.8. Línea celular cancerígena UCHT1

En el presente estudio se trabajará con la línea celular cancerígena UCHT1, entregada por el Laboratorio de Terapia Celular, del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, a cargo del profesor Pablo Caviedes.

La línea celular UCHT1 fue obtenida de un tumor tiroideo de una rata Fisher 344 adulta, y su desarrollo está establecido de acuerdo al protocolo descrito por Caviedes y Stanbury (1976). Corresponde a una línea celular de tipo adherente, por su necesidad de adherirse a un sustrato para crecer, proliferar y realizar normalmente sus funciones, presentando un tiempo de duplicación de aproximadamente 24 hrs (Caviedes & Stanbury, 1976).

Por lo general, esta línea celular es cultivada en Medio de Eagle modificado y nutriente F12 de Hammezcla (DME/Ham F12, 1:1, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Además, el medio es suplementado con 10 % de suero bovino adulto, 5 % de suero bovino fetal, glucosa, bicarbonato de sodio y HEPES, adicionalmente se le añade Gentamicina 40 mg/L. Las células se siembran en placas de 10 cm de diámetro y incuban a 37°C de temperatura, 5 % CO_2 y 100 % de humedad relativa (Para más detalles de los reactivos utilizados, ver Anexo A.2).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

- Evaluar la presencia de actividad anticancerígena en dos cepas de bacterias aisladas de la fosa de Atacama contra la línea tumoral de tiroide de rata (UCHT1) a través de bioensayos.

1.2.2. Objetivos específicos

- Realizar una extracción por solventes de potenciales metabolitos bioactivos a partir de dos cepas de bacterias aisladas de la fosa de Atacama.
- Diseñar un bioensayo para detectar actividad anticancerígena mediante técnica de *LIVE/DEAD* y microscopía fluorescente.
- Identificar qué cepa de actinobacteria reporta una mayor bioactividad contra la línea tumoral de tiroide de rata (UCHT1).

1.3. Limitaciones

- La selección de las cepas y condiciones de cultivo está sujeta a la investigación previa realizada por estudiantes de doctorado del CeBiB, quienes actualmente se encuentran investigando los aislados de la fosa de Atacama.
- Los medios de cultivo y los solventes utilizados en la extracción de metabolitos bioactivos están sujetos a la disponibilidad de reactivos en el laboratorio del CeBiB.
- La selección de la línea celular animal depende de las líneas celulares disponibles en el laboratorio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.
- El método de medición de actividad anticancerígena depende de los equipos y reactivos disponibles en el laboratorio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Dado que el laboratorio dispone de equipos de microscopía y filtro UV, se evaluará la bioactividad mediante ensayos de viabilidad/citotoxicidad usando el kit *LIVE/DEAD*.

Capítulo 2

Materiales y metodología

2.1. Materiales

A continuación se enumeran los materiales utilizados para el cultivo de las dos cepas de bacterias de la fosa de Atacama, el procedimiento de extracción por solventes y la metodología diseñada para realizar los bioensayos de actividad anticancerígena. Para más detalles de los reactivos utilizados en la preparación de los medios de cultivos, ver Anexo A.

2.1.1. Cultivo de bacterias extremófilas

- Inóculo de las cepas n°36 y n°63
- Medio MB y M2 (100 mL)
- Etanol 70 %
- Agua destilada
- Placas Petri
- Matraces Erlenmeyer de 250 mL
- Pipetas de 1000 µl
- Puntas de 1000 µl
- Asa metálica graduada de 10 µl
- Autoclave
- Thermoshaker (LabTech Modelo LSI-3016R)
- Incubadora
- pHmetro
- Agitador magnético
- Balanza
- Mechero
- Campana de flujo laminar

2.1.2. Extracción de metabolitos bioactivos

- Cultivo medio líquido cepa n°36 y n°63
- Éter de petróleo 40-60°C para análisis, ACS, ISO (Index No: 649-328-00-1 PanReac AppliChem)
- Acetato de etilo (141-78-6 Winkler Ltda.)
- Metanol grado técnico (CAS: 67-56-1 Winkler Ltda.)
- Centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5804 R)
- Cabina de extracción de flujo (ESCO Modelo EBD-4A0)
- Tubos falcon 50 mL
- Soporte universal
- Embudo de decantación 500 mL
- Bomba de vacío 1,7 [m³/h] (Vacuubrand GMBH+CO Modelo MZ 2C)
- Solución D
- Rotoevaporador (DragonLab Re100-Pro)

2.1.3. Bioensayos de actividad anticancerígena

- Línea celular UCHT1
- Medio DMEM/F12 con suero
- Solución D
- Alcohol absoluto
- Etanol 70 %
- Placas de cultivo celular 100 mm
- Placas de cultivo celular 60 mm
- Micropipetas P20, P200 y P1000
- Pipeta electrónica
- Puntas estériles
- Campana de flujo laminar
- PHmetro
- Mechero
- Baño de agua caliente

- Criotubos 2 mL
- Botellas 250 y 1000 mL
- Filtro de membrana 0,2 μm
- Jeringas 50 mL
- Tubo eppendorf
- Incubadora
- Tubos falcon 15 y 50 mL
- Microscopio de fluorescencia Carl Zeiss
- Calceína [2 μM]
- Ioduro de propidio 1:1000 en PBS 1X.

2.2. Metodología

2.2.1. Cultivos de bacterias extremófilas

1. Pesar por separado cada uno de los reactivos (ver Anexo A.1) y colocar en un matraz.
2. Agregar agua destilada utilizando probeta, ajustando según el volumen a utilizar.
3. Añadir un agitador magnético y homogeneizar el medio mediante un agitador magnético.
4. Ajustar pH al indicado para el cultivo, aumentando el pH con NaOH y bajándolo con HCl.
5. Autoclavar a 121°C por 15 min.
6. Rotular placas petri para agregar el medio con agar. Esperar que solidifique el medio bajo campana.
7. Inocular cada placa, tomando muestra con asa calibrada y distribuir en la placa con una pipeta pasteur.
8. Incubar las placas a 30°C, sin agitación.
9. Esperar 7 días, observar el crecimiento celular y la esporulación, si el crecimiento es aceptable, resguardar a 4°C.
10. Preparar medio liquido para cultivar por 7 dias a 30°C y 200 RPM.

2.2.2. Extracción de metabolitos bioactivos

1. Tomar 100 mL de cultivo y traspasar a tubos falcon de 50 mL para luego centrifugar a 10.000 RPM por 10 min.
2. Recuperar el sobrenadante y descartar el *pellet*.
3. Trabajar bajo campana de flujo para añadir los solventes orgánicos en el embudo de decantación.
4. Añadir 50 mL de éter de petróleo (Solvente 1), agitar suavemente el embudo y dejar reposar por 10 min.
5. Recuperar la fase orgánica y la fase acuosa cuando sea visible una separación de fases.
6. Lavar el embudo de decantación con metanol para continuar con el siguiente solvente.
7. Agregar la fase acuosa anteriormente recuperada, añadir 30 mL de acetato de etilo (Solvente 2) y agitar suavemente, dejar reposar por 10 min.
8. Recuperar la fase orgánica cuando sea visible una separación de fases. Desechar la fase acuosa.
9. Concentrar la fase orgánica con el metabolito de interés, utilizando un rotaevaporador. Para ello revisar conexión de bomba de vacío y refrigerante al equipo, abrir grifo de agua de refrigeración.
10. Prender el equipo y configurar la temperatura para precalentar el baño de agua.
11. Con el equipo con 0 rpm, conectar matraz con solución a evaporar con clip de seguridad, sosteniendo con una mano el matraz al finalizar.
12. Girar la llave de vacío para generar vacío en el sistema, una vez se genera la succión se puede soltar el matraz con la solución. Configurar el equipo en 100 RPM y 33°C.
13. Bajar con cuidado al baño caliente hasta que se encuentre el agua al nivel de la solución.
14. Una vez evaporada la solución, realizar lo siguiente:
 - Sacar el matraz del baño y apagar rotación.
 - Sosteniendo con una mano el matraz, abrir la llave de vacío.
 - Con cuidado, sacar el clip que sujeta el matraz.
 - Extraer el matraz sujetándolo con la mano izquierda y girándolo con la mano derecha de forma suave, nunca hacia abajo.
 - Cerrar agua del refrigerante y apagar el equipo.
15. Para extraer el soluto, resuspender la muestra con solución D y filtrar a través de una membrana con tamaño de poro de 0,2 μm para futuros usos.

2.2.3. Cultivo de células animales

Preparación de medios:

1. Pesar por separado cada uno de los reactivos (ver Anexo A.2) según el medio a preparar, colocar en una botella.
2. Agregar agua destilada utilizando probeta, ajustando según el volumen a utilizar.
3. Ajustar pH al indicado para el cultivo, aumentando el pH con NaOH y bajándolo con HCl.
4. Filtrar con membrana de poro 0,2 μm .

Antes de cultivar:

1. Esterilizar la sala y material a utilizar con luz ultravioleta por al menos 30 minutos, se puede aumentar el tiempo de exposición si el material o la sala lleva tiempo sin uso.
2. Apagar la luz ultravioleta, prendiendo el aire acondicionado de la sala, el flujo laminar de la campana y el baño de agua caliente del laboratorio de cultivo.
3. Esperar que se airee la sala por al menos 15 minutos.
4. Limpiar el material y zona de trabajo con etanol al 70 %. Dejar en el baño caliente las soluciones o medios a utilizar.

Protocolo de cultivo de células:

1. Marcar placas a utilizar y calcular volumen total de medio de cultivo a utilizar.
2. Dependiendo de donde se encuentre el criotubo, proceder de la siguiente manera:
 - Si está en el nitrógeno líquido. Prender el baño que está al lado de los tanques y esperar que alcance los 37°C. Luego sacar del nitrógeno líquido el criotubo a utilizar y descongelar en baño de agua caliente durante 1 o 2 minutos, hasta que no se vea congelado a simple vista.
 - Si está en un refrigerador a -80°C. Llevar un tubo falcon de 15 mL con unos 12-13 mL de agua a 37°C (se puede sacar directo del baño de la sala de cultivo). Sacar el criotubo del refrigerador y mantener en el agua del tubo falcon hasta poder dejarlo con un flotador en el baño de la sala de cultivo para que se descongele.
3. Disponer medio de cultivo en un tubo falcon de 50 mL hasta el volumen calculado anteriormente, restando el volumen en el criotubo (1,5 mL aproximadamente).
4. Completar medio de cultivo en el tubo falcon con la línea celular del criotubo. Es importante “resuspender” la línea congelada antes de añadirla al tubo falcon, ya que las células pueden estar adheridas al criotubo.
5. Antes de sembrar la solución, resuspender con la pipeta de vidrio para distribuir homogéneamente las células en el medio.
6. Añadir el volumen correspondiente en las placas de cultivo de células (10 mL para una placa de 100 mm o 5 mL para una placa de 60 mm).

7. Incubar a 37°C y 5% CO_2 .

Protocolo de subcultivo:

1. Observar placas bajo microscopio para revisar el crecimiento y posibles contaminaciones.
2. Si el paso anterior es favorable, succionar medio de cultivo de las placas.
3. Lavar con 1 mL de solución D cada placa. Repartir y succionar.
4. Añadir 1 mL de solución D con tripsina, repartir y dejar cultivando a 37°C durante 5 minutos.
5. De forma cuidadosa arrastrar todas las células despegadas y recolectar en un tubo de falcon de 15 mL.
6. Centrifugar a 1500 RPM durante 10 minutos.
7. Descartar sobrenadante con cuidado de succionar el pellet de células.
8. Resuspender células con el volumen de medio de cultivo correspondiente al subcultivo. En caso de congelar, se debe resuspender con el medio de cultivo para congelación con DMSO.

2.2.4. Bioensayos actividad anticancerígena

1. Dejar incubando 5 placas de 60 mm con 5 mL de medio DMEM/F12 durante 24 hrs para permitir la adhesión de las células a la superficie de la placa.
2. Observar placas bajo microscopio para revisar crecimiento y posibles contaminaciones.
3. Si el paso anterior es favorable, succionar medio de cultivo que contiene la placa.
4. Lavar 2 a 3 veces la placa con 500 μ l de solución D para extraer la mayor cantidad de células muertas. Repartir y succionar.
5. Agregar 5 mL de medio de cultivo DMEM/F12 y dejar incubando a 37°C por 24 hrs.
6. Al cabo de 48 hrs, retirar el medio de cultivo metabolizado. Lavar 2 a 3 veces la placa con 500 μ l de solución D. Repartir y succionar.
7. Adicionar una solución de 500 μ l del extracto sin suplementar con medio de cultivo. Incubar a 37°C durante 1 hr.
8. Posterior a 1 hr, retirar placas de la incubadora para añadir 1 μ l de calceína [2 μ M] y yoduro de propidio 1:1000 en PBS 1X. Incubar a 37°C por 30 min.
9. Posterior a 30 min, llevar las placas bajo el microscopio de fluorescencia. Utilizar filtro para calceína y yoduro de propidio.
10. Enfocar microscopio en posiciones diferentes de la placa. Guardar imágenes para realizar el conteo de células en los cultivos.
11. Calcular el porcentaje de células viables a partir del valor medio del recuento de células y comparar con respecto al control (100 % de viabilidad).

Capítulo 3

Resultados y discusión

3.1. Cultivos de bacterias extremas

En la Figura 3.1, se pueden observar los resultados de los cultivos de las cepas n°36 y n°63 en medio sólido, luego de una incubación por 7 días a 30°C.

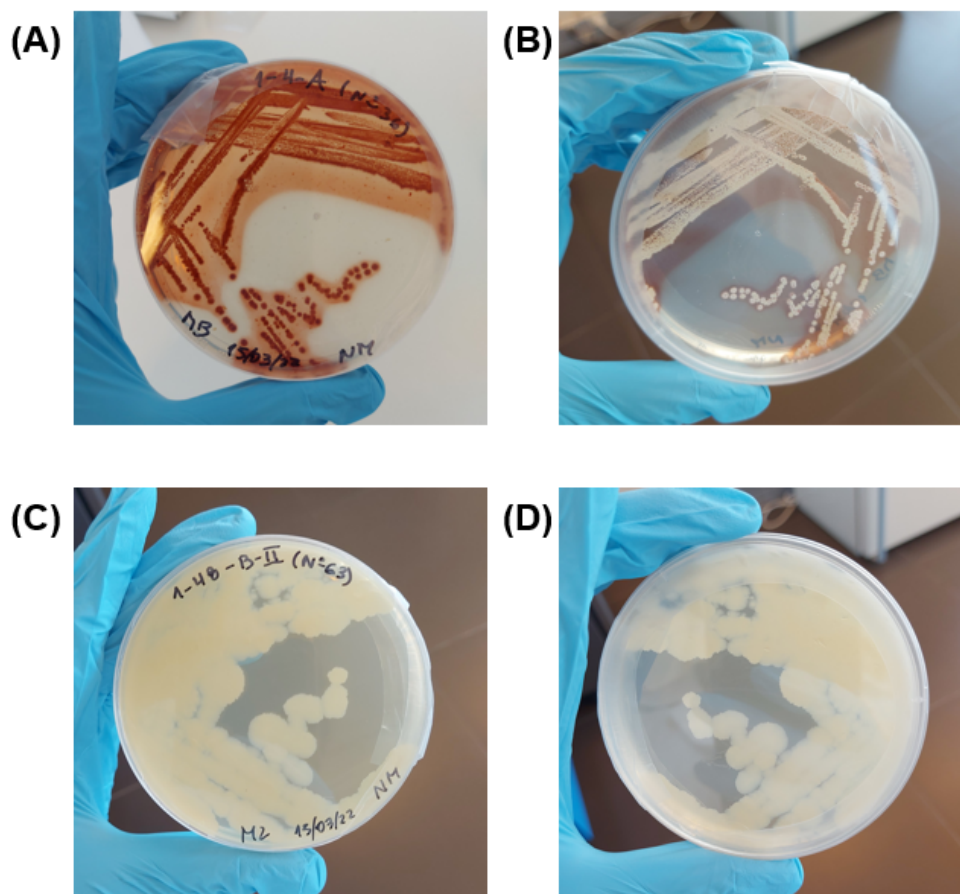


Figura 3.1: Cultivos de bacterias de la fosa de Atacama. (A)-(B) Cepa n°36 en medio sólido MB. (C)-(D) Cepa n°63 en medio sólido M2.

La elección de los medios de cultivo MB y M2 se debe a que estos fueron los medios en que inicialmente se aislaron las cepas en el CeBiB, entonces para comenzar con su estudio se decidió continuar utilizando los mismos medios en que fueron aislados.

En la Figura 3.1.(A) y 3.1.(B) se puede observar que para el caso de la cepa n°36 las colonias son visibles después de los 7 días de incubación. Además, se observa que son de color blanco y generan un pigmento de color rojo. Mientras que para el caso de la cepa n°63, en la Figura 3.1.(C) y 3.1.(D) se observa que esta crece con una coloración amarilla en medio M2, pero no se observa una buena esporulación en el medio después de los 7 días de incubación.

Dado los resultados anteriores, se realizó un cultivo de la cepa n°63 en medio MB sólido para observar su crecimiento en ese medio. También, se repitió el cultivo de la cepa n°63 en medio M2 sólido, manteniendo las condiciones de cultivo anteriores (30°C y 7 días de incubación).

A continuación, en la Figura 3.2 se muestran los resultados obtenidos:

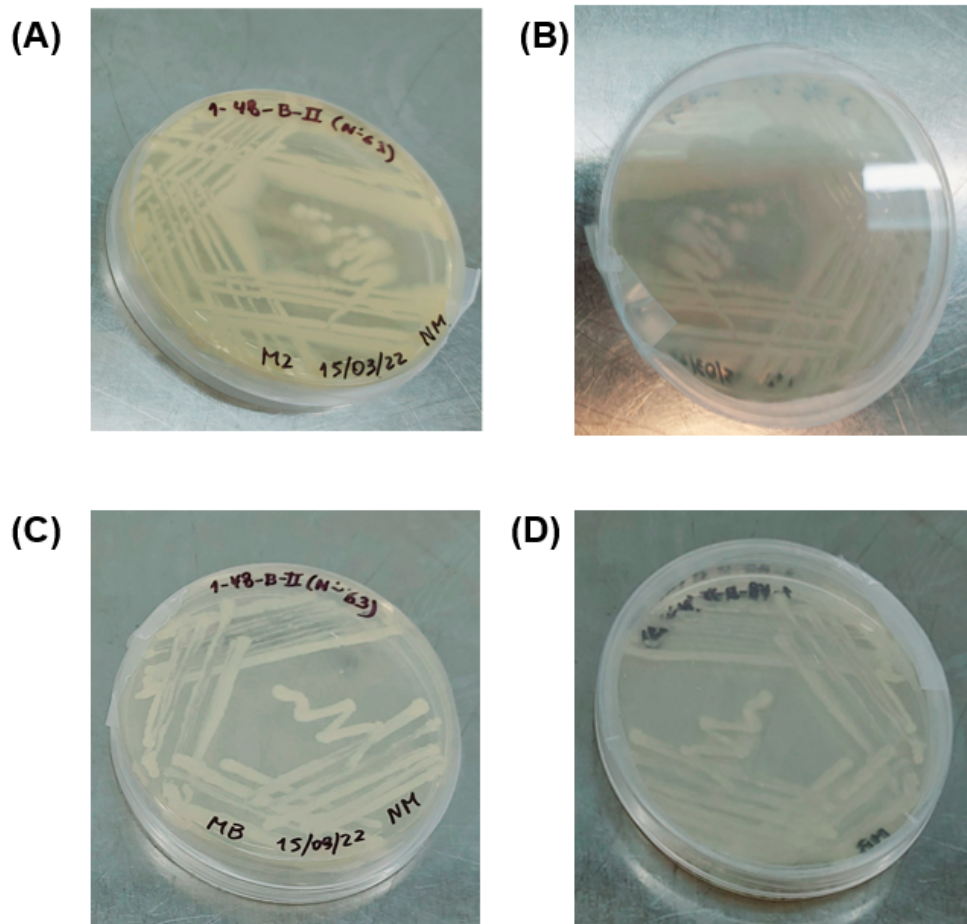


Figura 3.2: Cultivos en placa de la cepa n°63. (A)-(B) Cepa n° 63 en medio sólido M2. (C)-(D) Cepa n°63 en medio sólido MB.

En la Figura 3.2.(C) y 3.2.(D) se observa el cultivo de la cepa n°63 en medio sólido MB, donde hay crecimiento, pero no hay formación de colonias visibles. Esto se puede deber a que se requerían más días de incubación para que aparecieran las colonias o que el medio de cultivo MB no era el más óptimo para el crecimiento de esta cepa. Una posible mejora sería probar nuevos medios de cultivo, tal como ISP2, ya que según la información recopilada es el medio más utilizado en el cultivo de *Streptomyces* y en la producción de metabolitos con actividad anticancerígena (Ramirez-Rodriguez et al.,2018).

Con la Figura 3.2.(A) y 3.2.(B) se corrobora que hay crecimiento de la cepa n°63 en medio M2. A diferencia de los resultados obtenidos en el cultivo anterior, esta vez se puede ver con mayor claridad el patrón de líneas y también se logran distinguir mejor las colonias. Esto se puede deber a que la cantidad de inóculo utilizado fue menor que en el cultivo anterior, por lo que al sembrarlo en la placa se logró distribuir de mejor forma. Con esto se confirma que esta cepa crece y esporula en medio M2, por lo que se puede continuar con la realización de cultivos en medio líquido.

A partir del stock de las cepas, se seleccionaron colonias que estuviesen suficientemente separadas en la placa y se inocularon en dos matraces con 100 mL de medio de cultivo cada uno. Los matraces fueron incubados en un shaker por 7 días a 200 RPM y 30°C, ya que estas condiciones son favorables para la detección de propiedades anticancerígenas de actinomicetos derivados de sedimentos marinos, de acuerdo a la literatura consultada (Tenebro et al., 2021; Ramirez-Rodríguez et al.,2018).

3.2. Extracción de metabolitos bioactivos

Debido a que posterior a los 7 días de incubación se observó un buen crecimiento en medio líquido, es decir, no hubo contaminaciones, se continuó con el siguiente paso. Se realizó la centrifugación a 10.000 RPM por 10 min para así recuperar el sobrenadante. Mientras que el *pellet* se descartó ya que se supone que la mayoría de los metabolitos secundarios se liberan en el sobrenadante y se pueden extraer con disolventes orgánicos (Ayuso et al., 2005).

Para realizar la extracción de metabolitos se utilizó el método de Kupchan modificado. Para comenzar se escogieron 4 solventes: éter de petróleo, acetato de etilo, cloroformo y DM-SO. Se utilizó una proporción 1:1 (volumen/volumen) de éter de petróleo y se recuperó la fase orgánica. A la fase acuosa se le realizó una nueva extracción utilizando una proporción 5:3 (v/v) de los solventes restantes, es decir, para 100 mL de fase acuosa obtenida se agregaron 60 mL del solvente. Posteriormente, se dejó reposar en el embudo de decantación por 10 min.

En la Figura 3.3 se muestra el resultado de la separación para la cepa n°63.

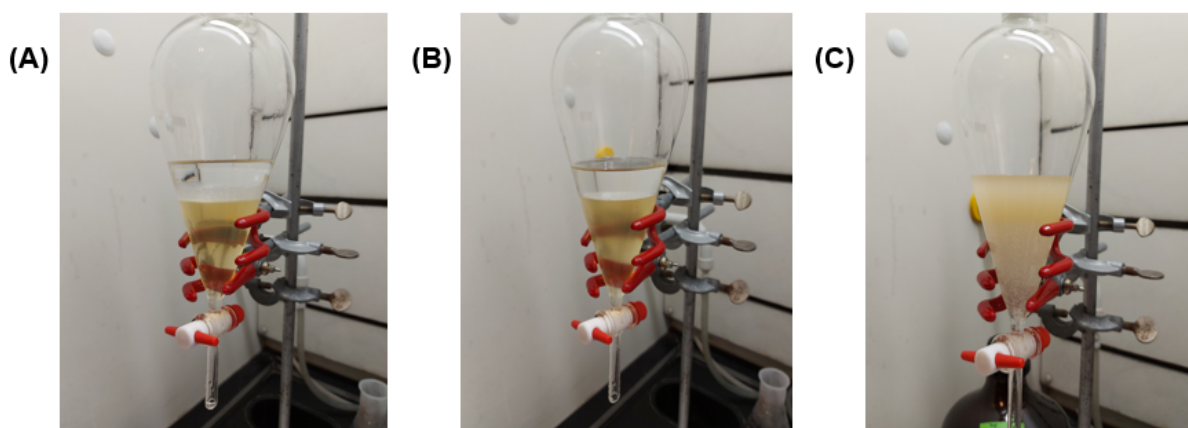


Figura 3.3: Separación de fases para la cepa n°63 utilizando 3 solventes diferentes. (A) Separación de fases utilizando como solvente éter de petróleo. (B) Separación de fases utilizando acetato de etilo. (C) Separación de fases utilizando cloroformo.

A partir de los resultados de la Figura 3.3, se tiene que tanto para el éter de petróleo como para el acetato de etilo hay una separación de fases visible, mientras que para el cloroformo no se observó una separación, luego de 15 min de reposo. Es probable que el proceso sea lento y tarde más tiempo debido a la pequeña diferencia de densidad entre las dos fases inmiscibles (Lavilla et al., 2009).

Considerando los resultados anteriores, se descartó el uso de cloroformo como solvente, por lo que se volvió a repetir el experimento utilizando éter de petróleo y acetato de etilo, tanto para la cepa n°63 como para la n°36. Además, ambos solventes cumplen con los requisitos descritos por Zhang et. al (2013). Los resultados de esta separación se muestran en la Figura 3.4:

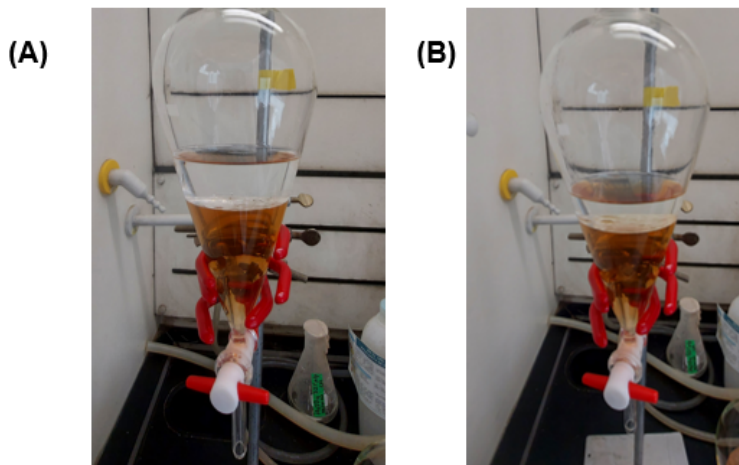


Figura 3.4: Separación de fases para la cepa n°63 utilizando 3 solventes diferentes. **(A)** Separación de fases utilizando como solvente éter de petróleo. **(B)** Separación de fases utilizando acetato de etilo.

Dado que la separación de fases fue favorable, se procedió a recuperar la fase orgánica tanto en éter de petróleo como en acetato, para cada cepa. Cabe mencionar que la fase acuosa final fue desechada, ya que se tomó como supuesto que los solventes utilizados tienen una alta solubilidad para el soluto y una baja solubilidad para el diluyente (Zhang et. al,2013).

En la Tabla 3.1 se muestran los principales resultados de esta extracción por solventes, los que corresponden a los volúmenes obtenidos para la fase orgánica recuperada, según la cepa y el solvente utilizado.

Tabla 3.1: Cantidad de fase orgánica recuperada según la cepa utilizada.

Número de cepa	Éter de petróleo [mL]	Acetato de etilo [mL]
36	87	55
63	92	51

Al realizar la extracción por solventes con éter de petróleo, se obtuvo una mayor cantidad de fase orgánica en ambas cepas, siendo 5 unidades mayor en la cepa n°63. Mientras que para la extracción con acetato de etilo se obtuvo una mayor cantidad en la cepa n°36. Estos resultados indican que al variar la polaridad del solvente utilizado existe una diferencia en la cantidad de volumen recuperado.

Luego de haber obtenido las fases orgánicas (extracto crudo), se trasvasijaron a un rotaevaporador a 100 RPM y 33°C para evaporar la mayor cantidad de solvente y así poder concentrar los metabolitos.

Un factor importante a considerar en la extracción por solventes es la concentración, ya que este valor es útil para comparar las bioactividades obtenidas con la bibliografía. Para medir la concentración de los metabolitos se utilizó 10 mL de éter de petróleo y 5 mL de acetato de etilo, luego se depositaron en placas de vidrio y se dejaron en la estufa a 60°C por 12 hrs. Transcurrido el tiempo de secado, se procedió a medir el peso de las placas con el extracto seco. Luego, se resuspendió el extracto en solución D para obtener la concentración del extracto crudo.

En la Tabla 3.2 se muestran los resultados para la medición de la concentración de los extractos, según el volumen de solvente inicial.

Tabla 3.2: Concentración de los extractos crudos según la cepa y el solvente utilizado

N° Extracto	Volumen [mL]	Peso extracto seco [g]	Concentración [mg/mL]
36 E	10	0,02	2
36 A	5	0,02	4
63 E	10	0,01	1
63 A	5	0,02	4

Donde E corresponde al solvente éter de petróleo y A corresponde al solvente acetato. En adelante, se utilizará la notación de la Tabla 3.2 para referirse a cada uno de los extractos.

3.3. Evaluación de la actividad anticancerígena

Con el fin de obtener información sobre la potencial actividad anticancerígena de las bacterias de la fosa de Atacama, se analizaron los 4 extractos crudos obtenidos (36A, 36E, 63A, 63E). La actividad de cada extracto se evaluó contra la línea celular de tiroide de rata UCHT1 por medio del test *LIVE/DEAD* y microscopía de fluorescencia.

3.3.1. Control

Como control negativo se utilizó el cultivo de la línea celular UCHT1 en solución D con un tiempo de incubación de 1 hr a 37°C. En la Figura 3.5 se muestran los resultados:

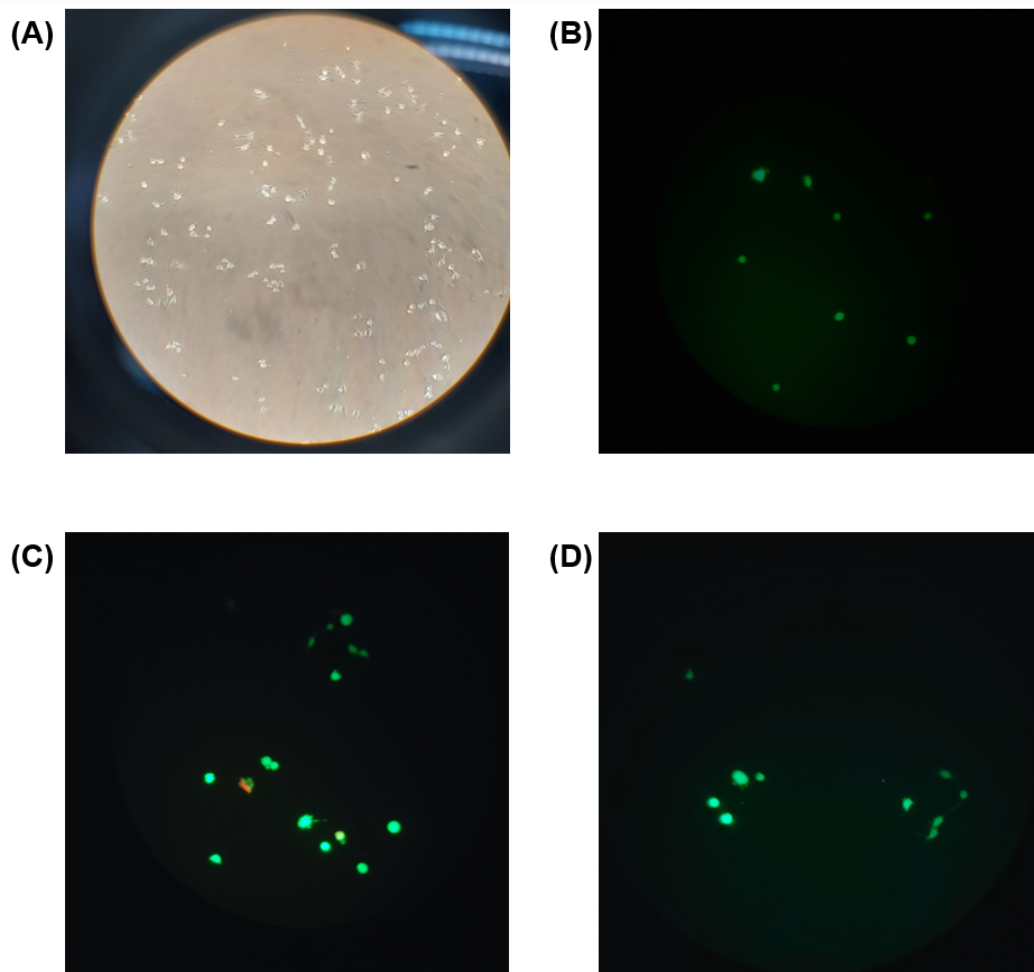


Figura 3.5: Ensayo de control. Cultivo de la línea celular UCHT1 en solución D. (A) Células cancerígenas en medio DMEM/F12, previo a adicionar la solución D. (B)-(D) Células cancerígenas en solución D, luego de 1 hr de incubación. Células viables (verde), células muertas (rojo). Aumento de 10x.

El objetivo del control fue observar crecimiento celular en solución D, ya que al igual que el medio DMEM/F12, corresponde a un medio con nutrientes que favorece el crecimiento de la línea UCHT1 (Caviedes & Stanbury, 1976). Bajo esas condiciones, se esperaría que el porcentaje de células viables sea cercano al 100 %.

En la Figura 3.5.(A), a modo de ejemplo, se muestra el cultivo celular posterior a 48 hrs de incubación, donde se observa que las células se encuentran adheridas a la placa. Para poder realizar este ensayo fue necesario succionar el medio DMEM/F12, lavar y agregar el extracto 36E.

Luego de 1 hr de incubación se añadió la calceína junto con el ioduro de propidio, los que permitieron obtener las imágenes de las Figuras 3.5.(B) - 3.5.(D). Con estas imágenes se hizo un conteo celular, donde se obtuvo que en promedio la cantidad de células viables es 11 de 12 células en total, lo que equivale a un 91,7%. Este resultado se acerca a la condición esperada del 100 % con una diferencia de un 8,3 %, que luego se puede estandarizar en los siguientes ensayos.

3.3.2. Extracto 36E

A continuación, en la Figura 3.6 se muestran los resultados para el bioensayo del extracto 36E en la línea celular UCHT1.

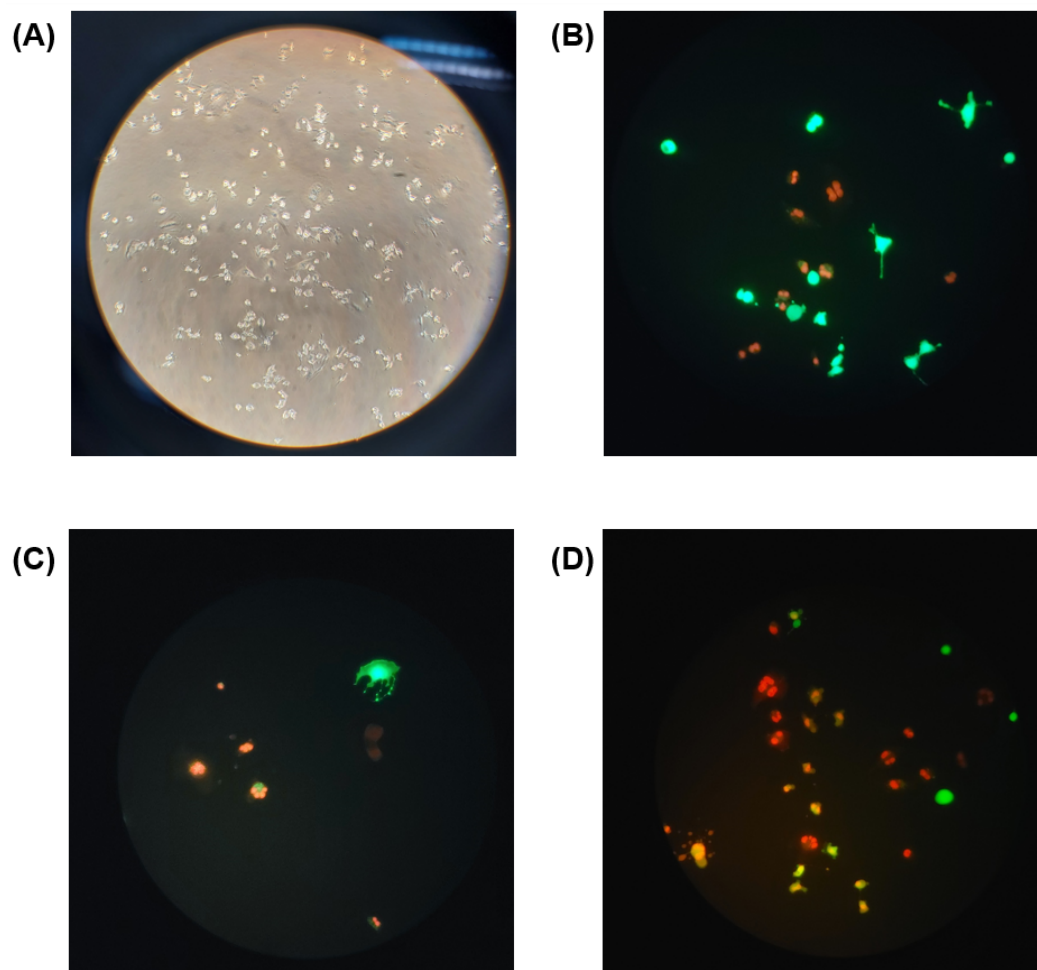


Figura 3.6: Cultivo de la línea celular UCHT1 en Solucion D con extracto 36E. (A) Células cancerígenas en medio DMEM/F12, previo a adicionar el extracto 36E. (B)-(D) Células cancerígenas con extracto 36E, luego de 1 hr de incubación. Células viables (verde), células muertas (rojo). Aumento de 10x.

Siguiendo el mismo procedimiento que en el ensayo de control, se utilizaron las Figuras 3.6.(B) - 3.6.(D) para realizar el conteo celular, donde se obtuvo que en promedio la cantidad de células viables es 7 de 32. Mientras que la cantidad de células muertas es de 25, lo que equivale a un 78,12 %.

3.3.3. Extracto 36A

A continuación, en la Figura 3.7 se muestran los resultados para el bioensayo con el extracto 36A:

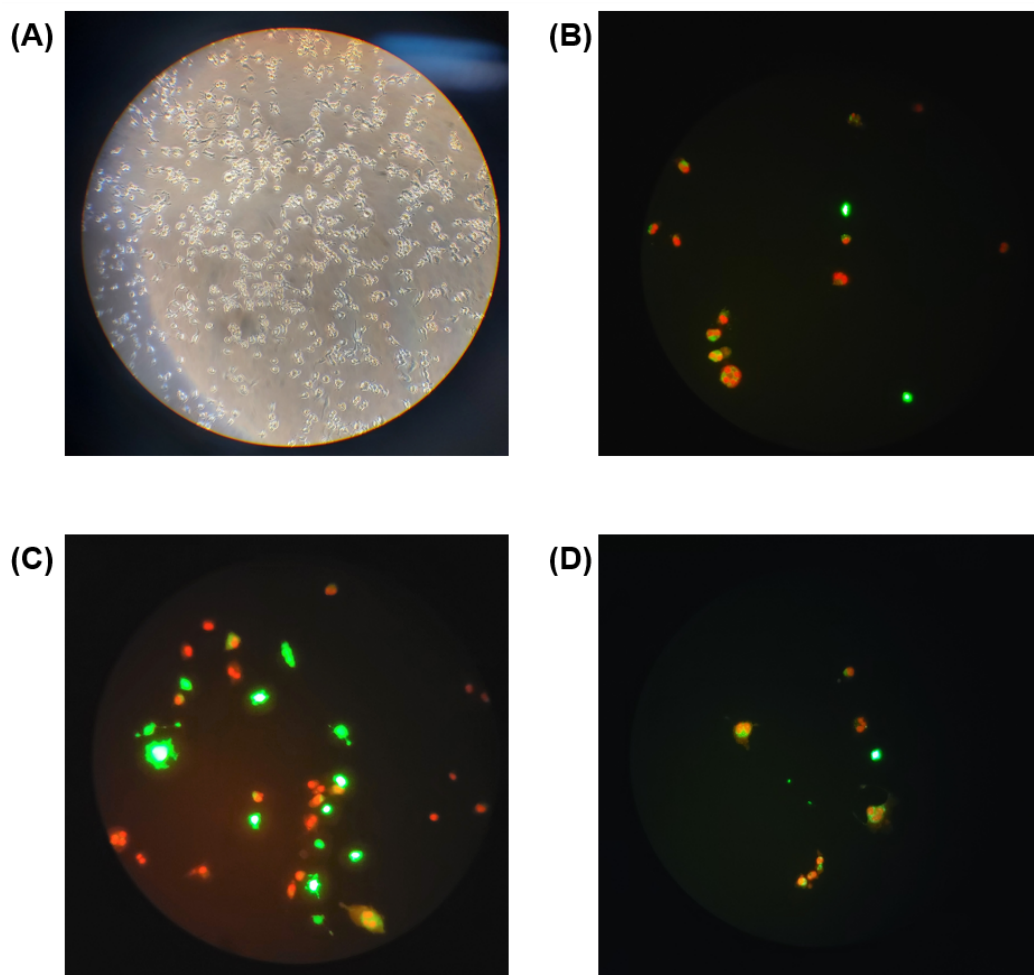


Figura 3.7: Cultivo de la línea celular UCHT1 en Solucion D con extracto 36A. **(A)** Células cancerígenas en medio DMEM/F12, previo a adicionar el extracto 36A. **(B)-(D)** Células cancerígenas con extracto 36A, luego de 1 hr de incubación. Células viables (verde), células muertas (rojo). Aumento de 10x.

A partir de la Figura 3.7 se obtuvo que en promedio el número de células viables es 6 y el número de células muertas es 23, equivalente a un 79,31 %.

3.3.4. Extracto 63E

A continuación, en la Figura 3.8 se muestran los resultados para el bioensayo con el extracto 63E:

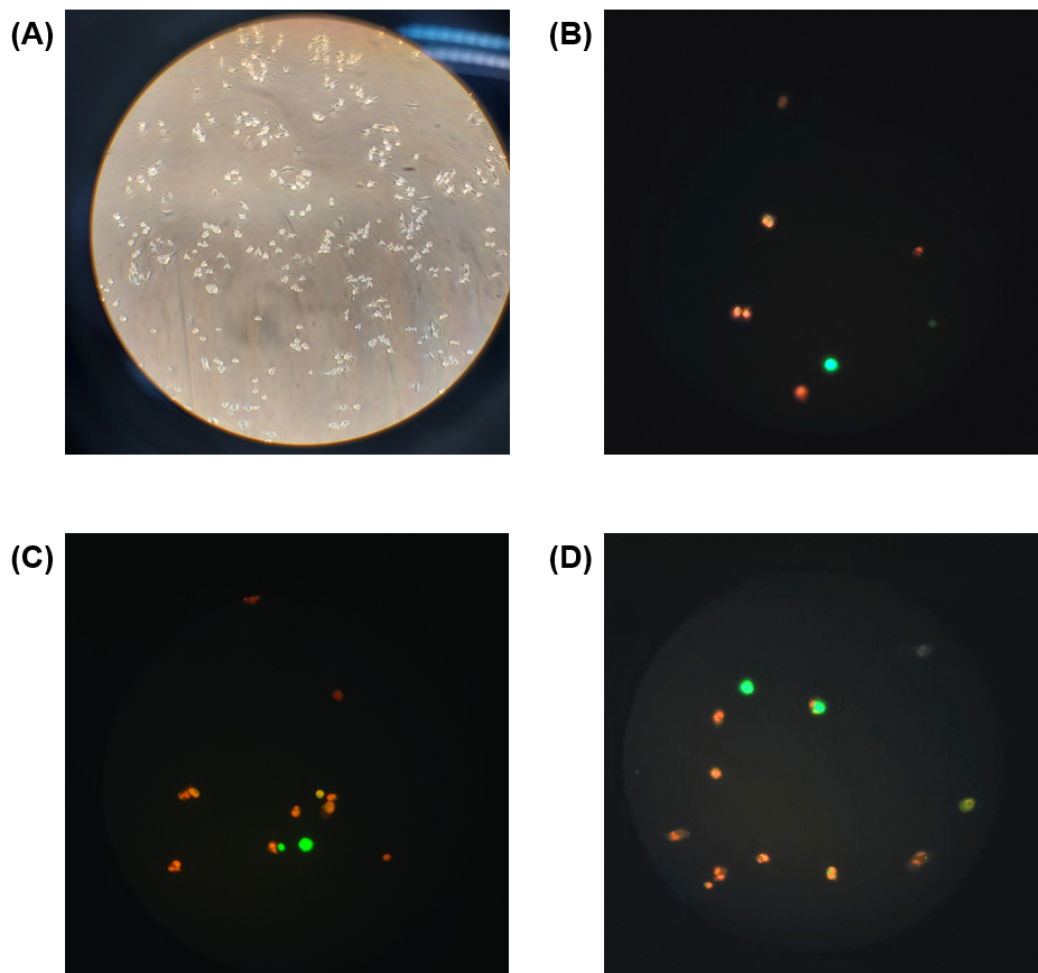


Figura 3.8: Cultivo de la línea celular UCHT1 en Solucion D con extracto 63E. (A) Células cancerígenas en medio DMEM/F12, previo a adicionar el extracto 63E. (B)-(D) Células cancerígenas con extracto 63E, luego de 1 hr de incubación. Células viables (verde), células muertas (rojo). Aumento de 10x.

A partir de la Figura 3.8 se obtuvo que en promedio el número de células viables es 2 y el número de células muertas es 16, equivalente a un 88,89%.

3.3.5. Extracto 63A

A continuación, en la Figura 3.9 se muestran los resultados para el bioensayo con el extracto 63A:

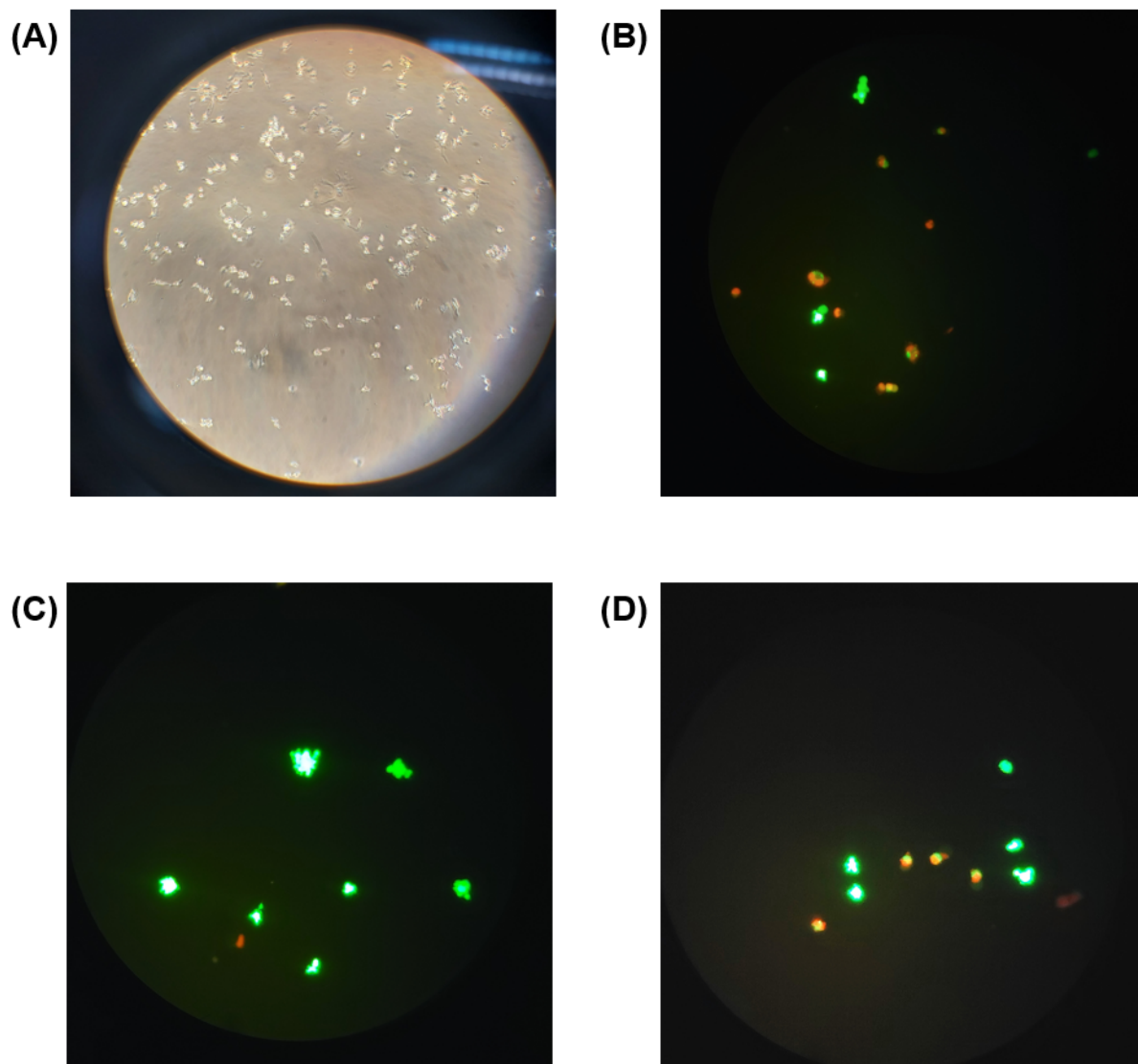


Figura 3.9: Cultivo de la línea celular UCHT1 en Solucion D con extracto 63A. (A) Células cancerígenas en medio DMEM/F12, previo a adicionar el extracto 63A. (B)-(D) Células cancerígenas con extracto 63A, luego de 1 hr de incubación. Células viables (verde), células muertas (rojo). Aumento de 10x.

A partir de la Figura 3.9 se obtuvo que en promedio el número de células viables es 8 y el número de células muertas es 7, equivalente a un 46,6%.

3.3.6. Porcentaje de actividad anticancerígena

Se considera que la actividad anticancerígena se puede medir según el porcentaje de inhibición en el crecimiento celular de la línea celular cancerígena (Balachandran et al., 2014). A partir de los resultados obtenidos por el test *LIVE/DEAD* y microscopía de fluorescencia, se puede graficar la actividad anticancerígena de cada uno de los extractos de las bacterias de la fosa de Atacama.

A continuación, en las Figuras 3.10 - 3.13 se presentan los gráficos para cada cepa.

3.3.6.1. Cepa n°36

La Figura 3.10 muestra el porcentaje de actividad anticancerígena obtenido para la cepa n°36, considerando que para el bioensayo de control hubo un 8,3% de inhibición del crecimiento en la línea celular UCHT1.

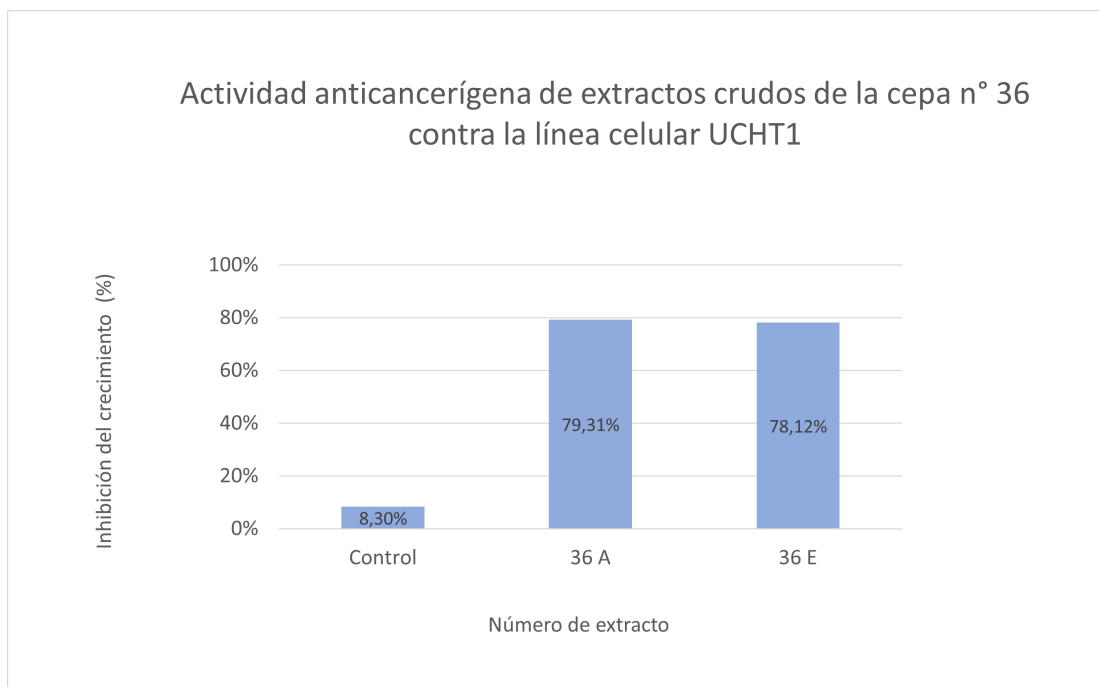


Figura 3.10: Actividad anticancerígena de dos extractos crudos de la cepa n°36 contra la línea celular de cáncer de tiroide de rata UCHT1.

Los porcentajes que se muestran en la Figura 3.10 fueron normalizados por el control, resultando el gráfico de la Figura 3.11.

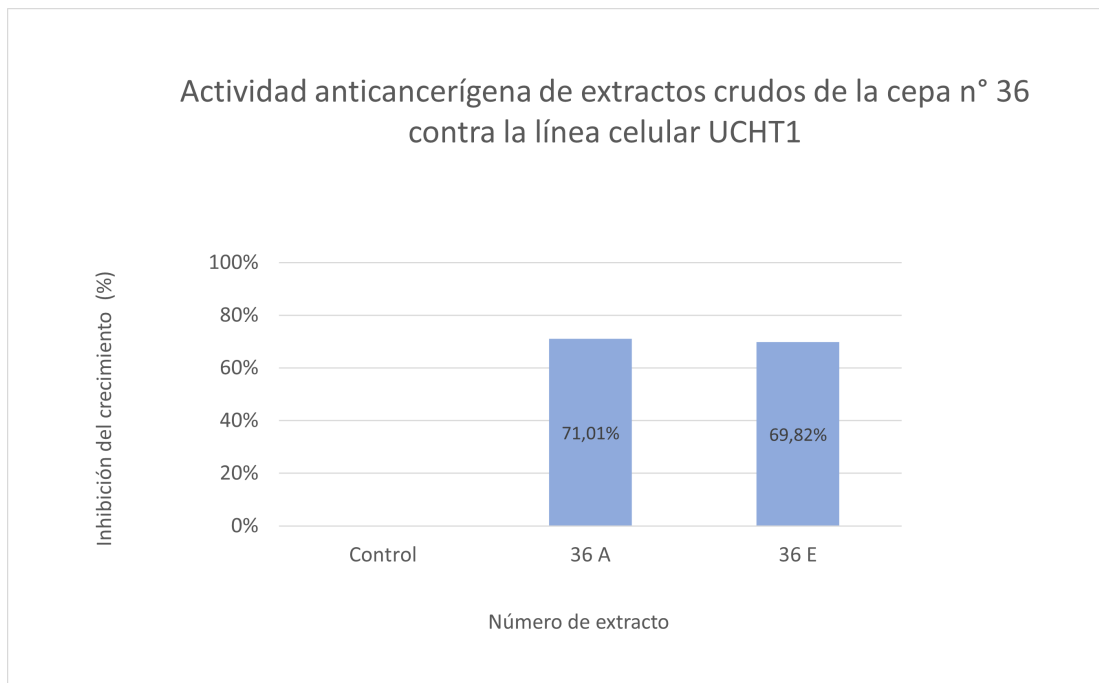


Figura 3.11: Actividad anticancerígena de dos extractos crudos de la cepa n°36 contra la línea celular de cáncer de tiroide de rata UCHT1. Gráfico normalizado por el porcentaje del control.

En este gráfico se ve que para la cepa n°36 se obtiene un porcentaje de inhibición celular del 71,01 % para el extracto 36A y un 69,82 % para el extracto 36E. Dado que en ambos extractos se obtuvo un porcentaje superior al 50 %, se considera que la cepa n°36 sí posee actividad anticancerígena. Si se comparan los porcentajes obtenidos para cada solvente, se tiene que al utilizar como solvente acetato de etilo se obtuvo un aumento de un 1,19 % en la bioactividad. Si bien este aumento es mínimo, sirve como indicador de que el acetato de etilo es mejor para la separación de metabolitos bioactivos para la cepa n°36.

También, se puede hacer una comparación de estos resultados obtenidos con los resultados del estudio realizado por Tenebro et al. (2021), en el que se reporta que los *Streptomyces* marinos alcanzan porcentajes máximos de inhibición entre 71 y 96 % contra la línea de cáncer de ovario humano A2780 a una concentración de 2 [mg/mL]. Si se fija la variable de concentración, se puede comparar este resultado con el porcentaje obtenido para el extracto 36E, lo que implica una mínima diferencia del 1,18 %, por lo que son resultados prometedores que se deberían continuar investigando.

3.3.6.2. Cepa n°63

La Figura 3.12 muestra el porcentaje de actividad anticancerígena obtenido para la cepa n°63. Y en la Figura 3.13 se presentan los porcentajes normalizados por el control.

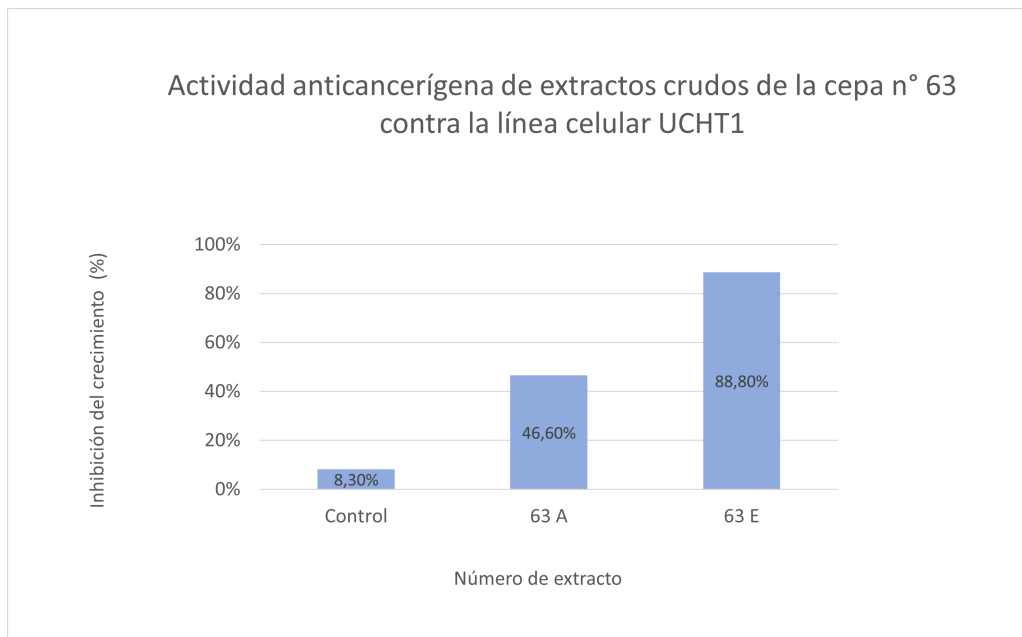


Figura 3.12: Actividad anticancerígena de dos extractos crudos de la cepa n°63 contra la línea celular de cáncer de tiroide de rata UCHT1.

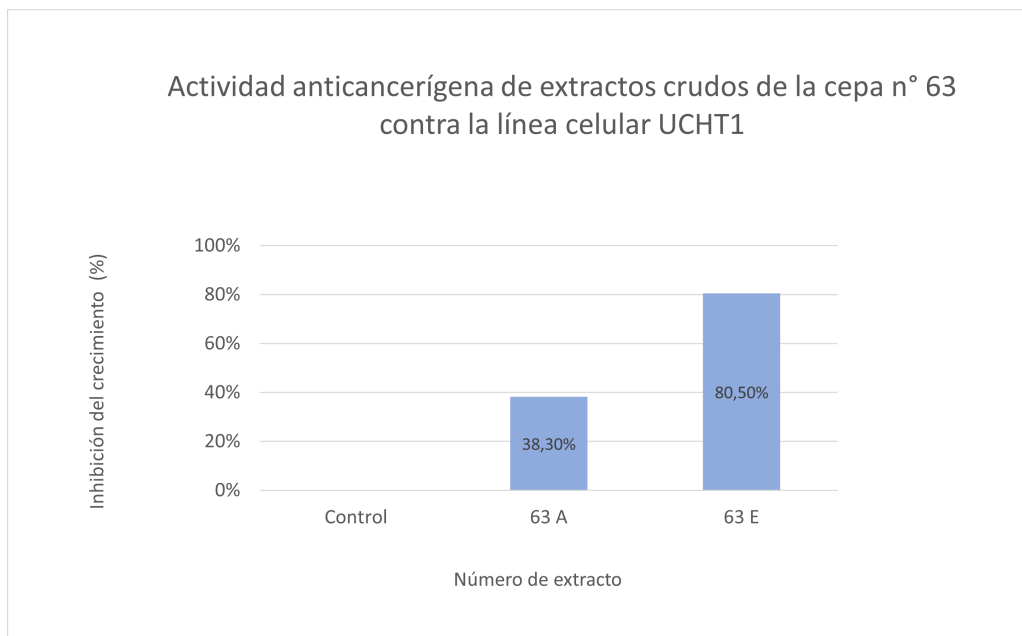


Figura 3.13: Actividad anticancerígena de dos extractos crudos de la cepa n°63 contra la línea celular de cáncer de tiroide de rata UCHT1. Gráfico normalizado por el porcentaje del control.

En la Figura 3.13 se puede ver que para la cepa n°63 se obtiene un porcentaje de inhibición celular del 38,3 % para el extracto 63A. En este caso, se obtuvo un porcentaje inferior al 50 %, por lo que se considera que el extracto en acetato de etilo no posee actividad anticancerígena. Ya que por definición, para que un metabolito sea considerado bioactivo, debe mostrar al menos un 50 % de inhibición del crecimiento celular (Balachandran et al., 2014)

Pese a lo anterior, estos resultados podrían estar subestimados, ya que en el bioensayo realizado se observó que habían células muertas (rojas) en suspensión, las que no formaron parte del conteo celular, puesto que en la metodología implementada se contabilizaron solamente las células que se encontraban adheridas a la placa.

Otro factor que pudo haber afectado esta medición es el tiempo de incubación con el extracto, debido a que en este bioensayo fue de solamente 1 hr, pero en otros estudios el tiempo de incubación que ha demostrado altas actividades es de 24 hrs (Kumar et al., 2021). En futuros ensayos se podría considerar un tiempo de incubación mayor a 1 hr para así verificar si es que hay un aumento en la bioactividad.

Para el caso del extracto 63E se obtuvo que posee un 80,5 % de actividad, lo que corresponde a una diferencia de un 42,2 % con el extracto 63A. Esto indica que la cepa n°63 posee una actividad anticancerígena casi 2 veces mayor al utilizar como solvente el éter de petróleo en lugar de acetato de etilo.

La Figura 3.14 muestra un gráfico donde se comparan los porcentajes de actividad anticancerígena de los 4 extractos con respecto a una viabilidad del 100% en el control.

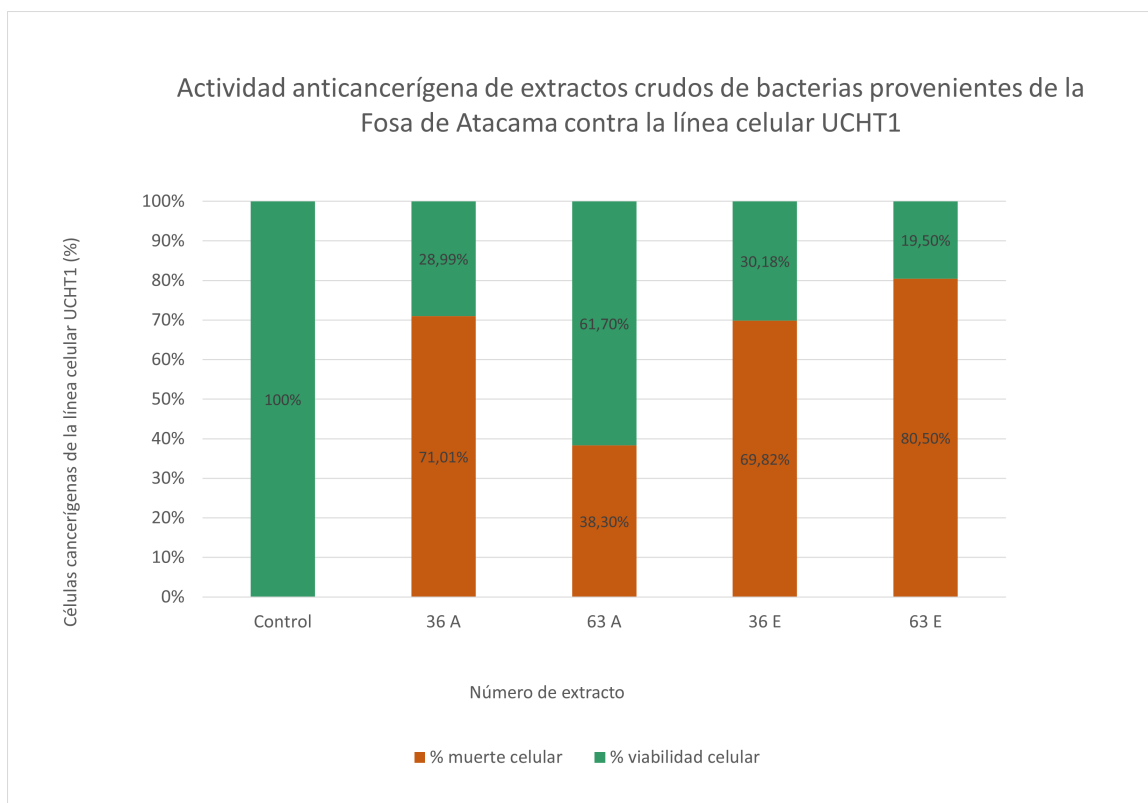


Figura 3.14: Comparación de la actividad anticancerígena de las cepas n°36 y n°63 con respecto al control.

También, se observa que 3 de los 4 extractos estudiados presentaron actividad anticancerígena con un porcentaje mayor al 50%, es por esto que se considera que estos resultados son prometedores y se deberían continuar realizando bioensayos de actividad anticancerígena con estas cepas, considerando todos los factores anteriormente descritos.

3.4. Discusión metodológica

Con respecto a la metodología, una de las limitaciones fue la selección e identificación de las cepas de la fosa de Atacama. Como se trata de muestras que recién están siendo estudiadas en el Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CeBiB), aún no se cuenta con los resultados de la secuenciación del ADN, por lo que no se tiene certeza del género de bacterias utilizadas en este trabajo. Actualmente, solo se puede asegurar que pertenecen al filo Actinobacteria y se esperaría que pertenezcan al género *Streptomyces*, ya que este se considera como el género de mayor número dentro del filo Actinobacteria (Ayuso et al., 2005).

Para contar con antecedentes bibliográficos, se recopilaron algunos estudios realizados entre 2015 y 2021, donde se evaluó la actividad anticancerígena de Actinobacterias. En la Tabla 1.1 se puede ver que el medio más utilizado es ISP2 con un tiempo de incubación de 7 días, una temperatura de 30°C y una velocidad de agitación de 200 RPM. Se considera que esta información es suficiente para iniciar con ensayos preliminares; si se desea tener más información se debería hacer una búsqueda más exhaustiva para probar diferentes condiciones de cultivo en el laboratorio, lo cual no se realizó en este trabajo debido al tiempo acotado.

En el cultivo de células animales cancerígenas, un factor importante a considerar es la contaminación del cultivo por bacterias. En este trabajo se añadió Gentamicina como antibiótico, a pesar de ello, se presentaron contaminaciones en reiteradas ocasiones, lo que afectó significativamente el crecimiento de las células animales y retrasó los experimentos. Para evitar futuras contaminaciones, se deberían preparar las soluciones durante la misma semana en que serán utilizadas, siempre bajo condiciones estériles. Otra opción podría ser cambiar Gentamicina por Estreptomina, ya que esta última es utilizada ampliamente en el estudio de metabolitos bioactivos a partir de *Streptomyces* (Elsayed et al, 2015).

Uno de los métodos más utilizados y más económicos para evaluar la actividad anticancerígena es el ensayo MTT, el que forma un colorante de formazán insoluble, por lo que para solubilizarlo se requiere de agentes solubilizantes (McCauley et al, 2013). Dado que en el laboratorio de la Facultad de Medicina no se disponían de agentes solubilizantes que fueran efectivos, se diseñó una metodología alternativa que utiliza el kit de viabilidad *LIVE/DEAD*.

Con esta nueva metodología propuesta se observó que las células UCHT1 sí reaccionaban a calceína (fluorescencia verde) y yoduro de propidio (fluorescencia roja). Para comenzar, se utilizaron 3 placas de 100 mm, una para el control y 2 para los extractos, pero se observó que el número de placas no era suficiente para evaluar los extractos requeridos. Por lo tanto, en los ensayos siguientes se utilizaron 5 placas de 60 mm para poder evaluar los 4 extractos y el control. Este método permitió obtener imágenes de microscopía fluorescente de alta calidad como las que se observan en las Figuras 3.5 - 3.9, por lo que se logró medir actividad anticancerígena usando *LIVE/DEAD* como un método confiable y efectivo para la medición de bioactividad.

Capítulo 4

Conclusiones

En el presente trabajo se evaluó la presencia de actividad anticancerígena en dos cepas aisladas de la fosa de Atacama contra la línea celular UCHT1. Para lograr esto, se consultó la literatura disponible, donde se encontró que los parámetros óptimos para la producción de metabolitos anticancerígenos en actinomicetos son: medio de cultivo ISP2, una temperatura constante de 30°C, una velocidad de agitación de 200 RPM y un tiempo de incubación de 7 días. Los cultivos de las cepas de la fosa de Atacama (n°36 y n°63) se realizaron de acuerdo a las condiciones anteriores, para luego realizar una extracción de los metabolitos bioactivos utilizando diferentes solventes.

Se obtuvo que los solventes que permiten una mejor separación de fases son el éter de petróleo y el acetato de etilo, logrando la recuperación de 4 extractos. Para medir su actividad se diseñó una metodología alternativa que usa *LIVE/DEAD*, la que permitió obtener imágenes de microscopía fluorescente de alta calidad. Posteriormente, estas imágenes fueron utilizadas para realizar gráficos y obtener los porcentajes de inhibición del crecimiento de la línea celular UCHT1 como indicadores de la actividad anticancerígena de cada cepa.

Como principales resultados de la evaluación de actividad anticancerígena mediante *LIVE/DEAD*, se tiene que en el extracto obtenido a partir del solvente éter se obtuvo un 69,82% de actividad para la cepa n°36 y un 80,5% para la cepa n°63, siendo este último el máximo porcentaje obtenido en todos los bioensayos realizados. Mientras que para los extractos obtenidos a partir de acetato, se obtuvo un 71,01% de actividad anticancerígena para la cepa n°36 y un 38,3% para la cepa n°63.

Dado que este último porcentaje es inferior al 50% se consideró que el extracto 63A no posee actividad anticancerígena. Pese a lo anterior, se considera que estos resultados podrían estar subestimados, ya que en los bioensayos realizados se observó que habían células en suspensión, las que no formaron parte del conteo celular, ya que la metodología propuesta solo consideraba el conteo de células que se encontraban adheridas a la superficie.

Para estudios futuros, se propone realizar cultivos en medio ISP2, hacer pruebas mediante el ensayo de MTT para probar diferentes concentraciones de los extractos, mayor tiempo de exposición y evaluar la actividad anticancerígena contra otra línea celular como la de cáncer de pulmón A549, ya que es una de las líneas celulares que ha sido más estudiada en la búsqueda de nuevos metabolitos bioactivos para uso terapéutico en el cáncer.

Bibliografía

Aguilera, J., Larraín, F. (2018). *Laboratorios Naturales para Chile: Ciencia e innovación con ventaja*. Ediciones UC

Ayuso, A., Clark, D., González, I., Salazar, O., Anderson, A., & Genilloud, O. (2005) A novel actinomycete strain de-replication approach based on the diversity of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic pathways. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(6), 795–806. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1828-7>

Balachandran, C., Sangeetha, B., Durairandiyar, V., Raj, M. K., Ignacimuthu, S., Al-Dhabi, N. A., Balakrishna, K., Parthasarathy, K., Arulmozhi, N. M., & Arasu, M. V. (2014). A flavonoid isolated from *Streptomyces* sp. (ERINLG-4) induces apoptosis in human lung cancer A549 cells through p53 and cytochrome c release caspase dependant pathway. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.09.019>

Berg K., Zhai L., Chen M. et al. (1994) The use of watersoluble formazan complex to quantitate the cell number and mitochondrial function of Leishmania major promastigotes. *Parasitology Research*, 80, 235-239. <https://doi.org/10.1007/BF00932680>

Bode, H. B., Bethe, B., Höfs, R., & Zeeck, A. (2002). Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBiochem : a European journal of chemical biology*, 3(7), 619–627. [https://doi-org/10.1002/1439-7633\(20020703\)3:7<619::AID-CBIC619>3.0.CO;2-9](https://doi-org/10.1002/1439-7633(20020703)3:7<619::AID-CBIC619>3.0.CO;2-9)

Busarakam, K., Bull, A. T., Girard, G., Labeda, D. P., Van Wezel, G. P., & Goodfellow, M. (2014). *Streptomyces leeuwenhoekii* sp. nov., the producer of chaxalactins and chaxamycins, forms a distinct branch in *Streptomyces* gene trees. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105, 849–861. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0139-y>

Caviedes, R., Stanbury, J. (1976). Studies on a Cell Line from a Functional Rat Thyroid Tumor in Continuous Culture, *Endocrinology*, 99(2), 549–554. <https://doi.org/10.1210/endo-99-2-549>

Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica. (2013). Chile laboratorio natural. <https://www.conicyt.cl/explora/explora-presenta-chile-laboratorio-natural/>

- Elsayed, S. S., Trusch, F., Deng, H., Raab, A., Prokes, I., Busarakam, K., Asenjo, J. A., Andrews, B. A., van West, P., Bull, A. T., Goodfellow, M., Yi, Y., Ebel, R., Jaspars, M., & Rateb, M. E. (2015). Chaxapeptin, a Lasso Peptide from Extremotolerant *Streptomyces leeuwenhoekii* Strain C58 from the Hyperarid Atacama Desert. *Journal of Organic Chemistry*, 80, 10252–10260. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b01878>
- Feling, R. H., Buchanan, G. O., Mincer, T. J., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., & Fenical, W. (2003). Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angewandte Chemie*, 42(3), 355–357. <https://doi.org/10.1002/anie.200390115>
- Gao, X., Lu, Y., Xing, Y., Ma, Y., Lu, J., Bao, W., Wang, Y., & Xi, T. (2012). A novel anticancer and antifungus phenazine derivative from a marine actinomycete BM-17. *Microbiological research*, 167(10), 616–622. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.02.008>
- Goodfellow, M., Busarakam, K., Idris, H., Labeda, D. P., Nouioui, I., Brown, R., Kim, B. Y., Del Carmen Montero-Calasanz, M., Andrews, B. A., & Bull, A. T. (2017). *Streptomyces asenjonii* sp. nov., isolated from hyper-arid Atacama Desert soils and emended description of *Streptomyces viridosporus* Pridham et al. 1958. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(9), 1133–1148. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0886-7>
- Kumar, P., Kundu, A., Kumar, M., Solanki, R., Kapur, M. (2019) Exploitation of potential bioactive compounds from two soil derived actinomycetes, *Streptomyces* sp. strain 196 and RI.24. *Microbiol Resresearch*, 229, 126324. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126312>
- Kumar, P., Chauhan, A., Kumar, M., Kuanr, B. K., Kundu, A., Solanki, R., & Kapur, M. K. (2021). In vitro and in silico anticancer potential analysis of *Streptomyces* sp. extract against human lung cancer cell line, A549.3 *Biotech*, 11(6), 254. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02812-w>
- Kupchan, S. M., Tsou, G. & Sigel, C. W.(1973). Datiscacin, a novel cytotoxic cucurbitacin 20-acetate from *Datisca glomerata*. *The Journal of Organic Chemistry*, 38(7), 1420-1421. <https://doi.org/10.1021/jo00947a041>
- Lavilla, I., Pena-Pereira, F., & Bendicho, C. (2009) Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 64(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2008.10.042>
- Lu, S., Wang, J., Sheng, R., Fang, Y., & Guo, R. (2020). Novel Bioactive Polyketides Isolated from Marine Actinomycetes: An Update Review from 2013 to 2019. *Chemistry and Biodiversity*, 17(12), 1612-1872. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000562>
- McCauley, J., Zivanovic, A., & Skropeta, D. (2013). Bioassays for anticancer activities. *Methods in molecular biology*, 1055, 191–205. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-577-4_14

- Microbiale. (2020). Mapa Microbiano de Chile. <https://microbiale.net/es/microbiologia/mapa-microbiano-de-chile/>
- Ministerio del Medio Ambiente. (2020). Sexto Informe Nacional de Biodiversidad de Chile. https://mma.gob.cl/wp-content/uploads/2020/01/6NR_FINAL_ALTA-web.pdf
- Organización Mundial de la Salud. (2021). Cáncer. https://www.who.int/es/health-topics/cancer#tab=tab_1
- Parra-Soto, S., Petermann-Rocha, F., Martínez-Sanguinetti, M., Leiva-Ordeñez, A., Troncoso-Pantoja, C., Ulloa, N., Diaz-Martínez, X., & Celis-Morales, C. (2020). Cáncer en Chile y en el mundo: una mirada actual y su futuro escenario epidemiológico. *Revista médica de Chile*, 148(10), 1489-1495. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872020001001489>
- Prieto, B. (2015). Diferencias en la percepción de la toxicidad del tratamiento quimioterápico en cáncer de mama y su influencia en la calidad de vida relacionada con la salud. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=81536>
- Ramirez-Rodriguez, L., Stepanian-Martinez, B., Morales-Gonzalez, M., Diaz, L. (2018). Optimization of the Cytotoxic Activity of Three *Streptomyces* Strains Isolated from Guaviare River Sediments (Colombia, South America). *BioMed research international*, 2839356. <https://doi.org/10.1155/2018/2839356>
- Rateb, M. E., Houssen, W. E., Harrison, W. T., Deng, H., Okoro, C. K., Asenjo, J. A., Andrews, B. A., Bull, A. T., Goodfellow, M., Ebel, R., & Jaspars, M. (2011). Diverse metabolic profiles of a *Streptomyces* strain isolated from a hyper-arid environment. *Journal of natural products*, 74(9), 1965–1971. <https://doi.org/10.1021/np200470u>
- Raytapadar S., Paul A. (2001). Production of an antifungal antibiotic by *Streptomyces aburaviensis* 1DA-28. *Microbiological Research*, 155(4), 315–323. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(01\)80010-0](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(01)80010-0)
- Romero, F., Espliego, F., Pérez Baz, J., García de Quesada, T., Grávalos, D., de la Calle, F., & Fernández-Puentes, J. L. (1997). Thiocoraline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*. I. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities. *The Journal of antibiotics*, 50(9), 734–737. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.50.734>
- Santhanam, R., Rong, X., Huang, Y., Andrews, B. A., Asenjo, J. A., & Goodfellow, M. (2013). *Streptomyces bullii* sp. nov., isolated from a hyper-arid Atacama Desert soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103, 367–373. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9816-x>
- Sivalingam, P., Hong, K., Pote, J., & Prabakar, K. (2019). Extreme environment *streptomyces*: Potential sources for new antibacterial and anticancer drug leads? *International Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1155/2019/5283948>

- Tanaka, Y., & Omura, S. (1993). Agroactive compounds of microbial origin. *Annual review of Microbiology*, 47, 57–87. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.47.100193.000421>
- Tenebro, C. P., Sabido, E. M., Trono, D. J. V. L., Vicera, C. V. B., Leonida, S. F. L., Maybay, J. J. W. B., Reyes-Salarda, R., Amago, D. S., Aguadera, A. M. V., Octaviano, M. C., Saludes, J. P., & Dalisay, D. S. (2021). Insights into the Variation in Bioactivities of Closely Related Streptomyces Strains from Marine Sediments of the Visayan Sea against ESKAPE and Ovarian Cancer. *Marine drugs*, 19(8), 441. <https://doi.org/10.3390/md19080441>
- TermoFisher. (2022). Kit de citotoxicidad/viabilidad *LIVE/DEAD* para células de mamíferos. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L3224>
- Tesfazghi, S., Eide, J., Dammalapati, A., Korlesky, C., Wyche, T. P., Bugni, T. S., Chen, H., & Jaskula-Sztul, R. (2013). Thiocoraline alters neuroendocrine phenotype and activates the Notch pathway in MTC-TT cell line. *Cancer medicine*, 2(5), 734–743. <https://doi.org/10.1002/cam4.118>
- Tiwari, K., Gupta, R. (2014). Bioactive Metabolites from Rare Actinomycetes, *Studies in Natural Products Chemistry*, 41(14), 419-512. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63294-4.00014-0>
- Zhang, J. & Hu, B. (2013). Liquid-Liquid Extraction (LLE). *Separation and Purification Technologies in Biorefineries*, 61-78. <https://doi.org/10.1002/9781118493441.ch3>

Anexos

Anexo A. Medios de cultivo

El medio de cultivo es un material alimenticio utilizado para el desarrollo de los microorganismos en un ambiente de laboratorio. Este alimento presenta los nutrientes necesarios para permitir el crecimiento de las células en condiciones favorables y específicas (pH, temperatura, etc). En este trabajo se utilizaron medios de cultivo para bacterias y células animales, los que se detallan a continuación.

A.1. Bacterias

A.1.1. Medio marino MB

En la Tabla A.1 se describen los reactivos utilizados para la preparación de 100 mL de medio marino MB a pH 7,6.

Tabla A.1: Reactivos para la preparación de 100 mL de medio MB.

Reactivo	Cantidad [g]
Peptona	0,5
Extracto de levadura	0,1
Citrato férrico	0,01
Cloruro sódico	1,95
Cloruro de magnesio	0,6
Sulfato de magnesio	0,32
Cloruro cálcico	0,18
Cloruro de potasio	0,05
Bicarbonato de sodio	0,016
Bromuro de potasio	0,008
Cloruro de estroncio	0,0034
Ácido bórico	0,0022
Silicato de sodio	0,0004
Fluoruro de sodio	0,0024
Nitrato de amonio	0,0016
Fosfato disódico	0,0008

En el caso de medio líquido solo se agrega 100 mL de agua destilada y se mezclan los reac-

tivos con un agitador magnético. En caso de preparar medio MB sólido además se agregan 0,18 g de Agar.

A.1.2. Medio M2 líquido

En la Tabla A.2 se describen los reactivos utilizados para la preparación de 100 mL de medio M2 a pH 7,1.

Tabla A.2: Reactivos para la preparación de 100 mL de medio M2.

Reactivo	Cantidad [g]
Extracto de levadura	0,5
Glucosa	1
Sodio	1
Monopotasio	0,01
Magnesio	0,005

Mezclar los reactivos en una botella y agregar 100 mL de agua destilada. En el caso de preparar medio M2 sólido se agregan 0,15 g de Agar.

A.2. Células animales

A.2.1. Medio DMEM/F12 base

En la Tabla A.3 se describen los reactivos utilizados para la preparación de 1000 mL de medio DMEM/F12 base.

Tabla A.3: Reactivos para la preparación de 1000 mL de medio DMEM/F12.

Reactivo	Cantidad [g]
DMEM/F12	24
Bicarbonato	1
HEPES	3,57
Glucosa	2,85
Gentamicina	40

Mezclar los reactivos en una botella y agregar 1000 mL de agua destilada. Ajustar a pH 7,4 y filtrar a través de una membrana con tamaño de poro de 0,2 μm .

A.2.2. Medio DMEM/F12 con suero

En la Tabla A.4 se describen los reactivos utilizados para la preparación de medio DMEM suplementado con suero bovino adulto (10 %) y suero bovino fetal (5 %). Filtrar con membrana de poro de 0,2 μm .

Tabla A.4: Reactivos para la preparación de 250 mL de medio DMEM/F12 con suero.

Reactivo	Cantidad [mL]
Suero bovino adulto	25
Suero bovino fetal	12,5
DMEM/F12	212,5

A.2.3. PBS salino

En la Tabla A.5 se describen los reactivos utilizados para la preparación de 1000 mL de solución de PBS salino.

Tabla A.5: Reactivos para la preparación de 1000 mL de PBS salino.

Reactivo	Cantidad [g]
NaCl	8
KCl	0,4
Na_2HPO_4	0,02
KH_2PO_4	0,03

Mezclar los reactivos en una botella y agregar 100 mL de agua destilada. Ajustar a pH 7,4 y filtrar con membrana de poro de 0,2 μ m.

A.2.4. Solución D

En la Tabla A.6 se describen los reactivos utilizados para la preparación de 1000 mL de solución D.

Tabla A.6: Reactivos para la preparación de 1000 mL de solución D.

Reactivo	Cantidad [g]
NaCl	8
KCl	0,4
Na_2HPO_4	0,02
KH_2PO_4	0,03
Glucosa	1,08
Sacarosa	2

Mezclar los reactivos en una botella y agregar 100 mL de agua destilada. Ajustar a pH 7,4 y filtrar con membrana de poro de 0,2 μ m.

A.2.5. Medio de congelación

En la Tabla A.7 se describen los reactivos utilizados para la preparación de medio de congelación. Para lo cual se utiliza suero bovino fetal (20 %) y DMSO (10 %). Filtrar con membrana de poro de 0,2 μm .

Tabla A.7: Reactivos para la preparación de 100 mL de medio de congelación.

Reactivo	Cantidad [mL]
DMEM/F12	70
Suero bovino fetal	20
DMSO	10

A.2.6. Solución D con Tripsina

En la Tabla A.8 se describen los reactivos utilizados para la preparación de solución D con tripsina. Filtrar con membrana de poro de 0,2 μm .

Tabla A.8: Reactivos para la preparación de 100 mL de medio de congelación.

Reactivo	Cantidad
Solución D	100 [mL]
Tripsina	0,2 [g]