



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS**



DIDEMNINAS CITOTÓXICAS CONTRA LA LÍNEA  
LEUCÉMICA K-562 OBTENIDAS DE  
*Distaplia stylifera*  
(Kowalevsky, 1984) TUNICATA: ASCIDIACEA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

José Manuel Mendoza Alcalá

LA PAZ, B.C.S., JUNIO DE 2019





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 12 del mes de Junio del año 2019

El (la) que suscribe Biól. Mar. JOSÉ MANUEL MENDOZA ALCALÁ Alumno (a) del Programa  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro B170750 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DR. MAURICIO MUÑOZ OCHOA

y cede los derechos del trabajo titulado:

"DIDEMNINAS CITOTÓXICAS CONTRA LA LÍNEA LEUCÉMICA K-562

OBTENIDAS DE *Distaplia stylifera* (Kowalevsky, 1874) TUNICATA: ASCIDIACEA"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: mdozzajm@gmail.com - mmunozo@ipn.mx -

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Biól. Mar. JOSÉ MANUEL MENDOZA ALCALÁ

*Nombre y firma del alumno*

**“La ascidia cuando es joven, vaga por el mar  
en busca de una buena roca o arrecife de coral  
al que agarrarse para convertirlo en su casa por  
el resto de su vida. Para llevar a cabo esta tarea  
posee un sistema rudimentario, y cuando encuentra  
el sitio adecuado y echa raíces, ya no necesita más a  
su cerebro, así que ¡se lo come!  
¿a qué nos suena esto? ...  
¡Efectivamente!, ¡a un catedrático-investigador!”.**

**-Dennet, 1995**

**“And by the way. Everything you are about  
to see and read is a fantasy. A dream. Pretend.  
Pass it on!  
Any similarity between characters and events  
depicted in this thesis is not purely coincidental.  
It is ridiculous!  
Nothing in this thesis is true. I made it all up”.**

**-Cicccone, 1992**

Nota para el lector:

Si requiere oficialmente nuestra información,  
aguarde pacientemente por la publicación.

## **Agradecimientos**

Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR), proyecto SIP20170728, SIP20180106 y SIP20195600.

A los integrantes de mi comité tutorial, Dr. Mauricio Muñoz, Dr. Víctor Cruz, M. en C. Elizabeth Rodríguez, por su valiosa guía para llevar a cabo este proyecto.

A la Dra. Rosana Rocha por su impecable enseñanza que llevó a fascinarme de la taxonomía y sistemática; a la Dra. Lilian Palomino y M. en C. Joyce Teixeira por su paciente consejo ante mi torpe inducción al tema.

Al Dr. Raúl Flores por aceptar involucrarlo de lleno en este proyecto, su importante aportación, y por su amable bienvenida a su institución.

A Luis Pérez por compartirme con tanta paciencia cada singular detalle en el cultivo celular y por su agradable compañía.

A los Dres. José Guerrero y Juan Monribot por su importante colaboración.

Al Dr. David Siqueiros por su ejemplo ético, representar una guía en la praxis científica, por influenciar la formación de mi identidad filosófica y educir mi intelecto y cultura.

## Índice general

I. Índice de figuras y tablas.....	1
II. Resumen.....	2
III. Abstract.....	3
IV. Glosario.....	4
V. Abreviaciones.....	5
1. Introducción.....	6
2. Antecedentes.....	8
3. Justificación.....	12
4. Objetivos.....	13
5. Hipótesis.....	13
6. Metodología.....	14
6.1. <i>Material biológico y trabajo de campo</i> .....	14
6.2. <i>Descripción taxonómica</i> .....	16
6.3. <i>Trabajo experimental</i> .....	17
6.3.1. <i>Obtención del extracto crudo</i> .....	17
6.3.2. <i>Fraccionamiento guiado por bioensayos</i> .....	17
6.3.3. <i>Ensayos de actividad biológica y perfil químico</i> .....	20
6.3.4. <i>Cultivo de la línea celular K-562</i> .....	22
6.3.5. <i>Evaluación de la actividad citotóxica, ensayo del MTT</i> .....	22
6.3.6. <i>Identificación de didemninas mediante cromatografía en capa fina</i> .....	23
6.3.7. <i>Re-extracción y semipurificación de los compuestos más activos</i> .....	23
6.3.8. <i>Caracterización química</i> .....	24
7. Resultados y Discusión.....	25
8. Conclusión.....	46
9. Recomendaciones.....	47
10. Literatura citada.....	49

## I. Índice de figuras y tablas

Figura 1. Estructura química de didemninas A, B y C.....	10
Figura 2. Lugar de recolecta de <i>Distaplia stylifera</i> .....	14
Figura 3. Colonias de <i>D. stylifera</i> .....	15
Figura 4. Taxonomía de <i>D. stylifera</i> .....	16
Figura 5. Diagrama de extracción y fraccionamiento biodirigido de <i>D. stylifera</i> .....	19
Figura 6. Concentración letal media contra <i>Artemia franciscana</i> (ESL1-ESL4).....	25
Figura 7. Concentración letal media contra <i>A. franciscana</i> (F1-F14).....	26
Figura 8. Actividad hemolítica.....	27
Figura 9. Citotoxicidad contra K-562.....	38
Figura 10. Identificación de didemninas.....	40
Figura 11. Identificación de didemninas en las fracciones re-extraídas.....	41
Figura 12. Estructura química de didemnina A.....	42
Tabla 1. Perfil químico de <i>D. stylifera</i> .....	30
Tabla 2. Alcaloides con actividad biológica aislados de ascidias.....	35
Tabla 3. Aminoácidos citotóxicos aislados de ascidias.....	37
Tabla 4. Compuestos anticancerosos aprobados aislados de ascidias.....	39
Tabla 5. Mecanismos de acción de péptidos aislados de ascidias.....	44

## II. Resumen

*Distaplia stylifera* es una especie de ascidia colonial abundante en la Bahía de La Paz, BCS, México, considerada exótica para esta región geográfica. Debido a que carece de protección física, su éxito reproductivo permite suponer que produce metabolitos secundarios citotóxicos del tipo didemninas (depsipéptidos) como principal mecanismo de defensa. Aunado a lo anterior, se ha propuesto que estos compuestos poseen actividad anticancerosa y antitumoral; por lo que la hipótesis del presente trabajo propone que los compuestos anticancerosos de *D. stylifera* serán péptidos del tipo didemninas reportadas en otras especies de ascidias. Para contrastar esta hipótesis, a partir de 10 kg de ascidias recolectadas en marinas establecidas en la bahía de La Paz, se obtuvo un extracto etanólico; este fue fraccionado mediante técnicas cromatográficas guiadas por la evidencia de compuestos aminados con toxicidad aguda contra *Artemia franciscana* y con actividad hemolítica en eritrocitos, estos fueron evaluados para determinar su actividad citotóxica contra la línea K-562 de leucemia mieloide crónica mediante el ensayo de MTT. Los compuestos fueron identificados utilizando cromatografía en capa fina y espectrometría de masas. Las fracciones F1, F7 y F10 mostraron la mayor actividad citotóxica, alcanzando las  $CI_{50}$  de 52.1, 51.9 y 48.9  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. La masa molecular y el factor de retención coinciden con los registrados en la literatura para la didemnina A, lo que permite concluir que este compuesto presente en las fracciones más activas es el responsable de la actividad citotóxica contra la línea K-562.

### III. Abstract

*Distaplia stylifera* is a species of abundant colonial ascidians in Bahía de La Paz, BCS, México, considered exotic for this geographical region. Because the lack of physical protection, its reproductive success suggests production of deterrent secondary cytotoxic metabolites such as didemnins (depsipeptides) as the main defense mechanism. In addition, it has been proposed that these compounds possess anticancerous and antitumoral activities; therefore, the hypothesis of the present work proposes that the anticancerous compounds of *D. stylifera* will be didemnin-like peptides as reported for other species of ascidians. To test this hypothesis, from 10 Kg of ascidians collected in docks established in Bahía de La Paz, an ethanolic extract was obtained; this was fractionated by chromatographic techniques guided by evidence of amino compounds with acute toxicity against *Artemia franciscana* and hemolytic activity in erythrocytes. These were assessed for cytotoxic activity against K-562 line of chronic myeloid leukemia through the MTT assay. Compounds were identified by thin layer chromatography and mass spectrometry. Fractions F1, F7 and F10 showed the highest cytotoxic activity, reaching IC<sub>50</sub> of 52.1, 51.9 and 48.9 µg mL<sup>-1</sup> respectively. Molecular mass and retention factor coincide with those in literature for didemnin A, which allows us to conclude that this compound present in the most active fractions is responsible for the cytotoxic activity against K-562 line.

#### IV. Glosario

**Aductos:** Producto formado por la unión de dos moléculas sin que se produzcan cambios estructurales.

**Anticancerígeno:** Compuesto químico que previene o retrasa la aparición del cáncer.

**Anticanceroso:** Compuesto químico que combate el cáncer.

**Bentónico:** Objetos vivos o inertes que viven en relación con el fondo en un cuerpo de agua.

**Depsipéptido:** Compuestos comúnmente cíclicos formados por cadenas de aminoácidos en donde, al menos, uno de sus grupos éster está sustituido por un grupo amida.

**Epizoica:** Materia u organismos que viven en la superficie de un animal.

**Espícula:** Cuerpo u órgano pequeño que sirve por lo general para sostener los tejidos de algunos animales.

**Factor de retención (FR):** Distancia que recorre cada uno de los compuestos en cromatografía en capa fina entre la distancia que recorre el sistema de solventes en el que se desarrolló la placa.

**Probit:** Este modelo utiliza la inversa de la función de probabilidad acumulada, transformando el porcentaje de respuesta a una unidad de probabilidad que se conoce como "probit", facilitando la interpretación de curvas dosis-respuesta y permite conocer con mayor precisión las dosis que producen respuestas en porcentajes bajos de la población o en porcentajes cercanos a 100%.

**Sésil:** Organismo que crece adherido a un substrato y del cual no se separa.

**Valva:** Cada una de las piezas que forman la concha de moluscos bivalvos y braquiópodos.

## **V. Abreviaciones**

**CCF:** Cromatografía en capa fina.

**CI<sub>50</sub>:** Concentración inhibitoria media.

**CL<sub>50</sub>:** Concentración letal media.

**DCM:** Diclorometano.

**DPPH:** Radical libre 2, 2- Difenil-1-picrilhidrazilo.

**EC:** Extracto crudo.

**FDA:** Administración de fármacos y alimentos.

**FR:** Factor de retención.

**Hex:** Hexano.

**HPLC-*Ms*:** Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas.

***m/z*:** Masa relativa de una molécula.

**MeOH:** Metanol

**MTT:** Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

**RMN:** Resonancia magnética nuclear.

**RPMI:** Medio de cultivo celular desarrollado en 1966 en el Roswell Park Memorial Institute.

## 1. Introducción

Todos los seres vivos a través de su historia evolutiva han desarrollado diversas estrategias de defensa, las cuales son utilizadas para protegerse de los depredadores y de las condiciones ambientales adversas (Curtis & Schnek, 2006). Varias de estas especies están representadas por organismos sésiles y habitan ambientes bentónicos rocosos que en el mar resultan ser limitados, debido a esto deben competir por el espacio, evitar la epibiosis y la depredación aumentando las estrategias de defensa basadas principalmente en la síntesis de metabolitos secundarios, lo que les permite vivir y desarrollarse. En los extractos de diversos grupos de invertebrados marinos han sido identificadas propiedades citotóxicas, antitumorales y antivirales. Un gran porcentaje de los compuestos responsables de tales actividades han sido extraídos de esponjas, briozoos, moluscos y ascidias. La mayoría de las especies de ascidias carecen de protección física, y aunque algunas poseen en su túnica varios tipos de espículas, no se ha comprobado que la presencia de estas ahuyente a los depredadores. Debido a esto, sintetizan metabolitos secundarios derivados de nitrógeno como heterociclos aromáticos, péptidos, alcaloides y aminoácidos; y compuestos no nitrogenados en menor cantidad como lactonas, terpenoides y quinonas. También se ha registrado alta concentración de vanadio y algunas especies llegan a contener ácido sulfúrico, el cual es repelente para muchos organismos marinos y puede desempeñar un papel defensivo. Según Ogi *et al.* (2009) estas sustancias son las responsables de la actividad antimicrobiana, antifúngica y citotóxica contra líneas cancerosas (Stoecker, 1980; Lindquist & Hay, 1992; Núñez-Pons, *et al.*, 2012).

En particular, las ascidias coloniales representan una fuente de nuevas sustancias químicas con estructuras únicas y con potencial como agentes biológicos. Aunado a esto, son un grupo taxonómico del cual se conoce su riqueza en cuanto a sus componentes químicos y que a menudo son abundantes en arrecifes tropicales en donde la depredación es intensa, por lo que un número importante de productos naturales bioactivos han sido obtenidos a partir de estas. Algunos de los compuestos como Ecteinascidina 743 (alcaloide) y deshidrodidemnina B (depsipéptido) extraídos

de ascidias han sido aprobados para el tratamiento de sarcoma en tejidos blandos, cáncer de ovario y mieloma múltiple, además de encontrarse actualmente bajo investigación clínica para conocer su efectividad en otros tipos de cáncer (Dunn *et al.*, 1982; Lindquist & Hay, 1992; Martínez-García *et al.*, 2007; Ogi *et al.*, 2009; Valdés-Iglesias *et al.*, 2010; Aiello *et al.*, 2011; Yamazaki *et al.*, 2012; Núñez-Pons *et al.*, 2012).

Las investigaciones sobre metabolitos secundarios con aplicación médica extraídos a partir de ascidias comenzaron en la década de los ochenta con los reportes de Rinehart *et al.* (1980), sobresaliendo el descubrimiento de las didemninas, un grupo de compuestos peptídicos con amplio espectro de actividades biológicas. Actualmente en Europa se han llevado a cabo la mayoría de las investigaciones respecto a este grupo de tunicados, destacándose los reportes de la empresa española PharmaMar, la cual fue la primera en colocar en el mercado un producto marino para el tratamiento contra cáncer (Ecteinascidina 743), dando una alternativa para el tratamiento de sarcoma en tejidos blandos y cáncer de ovario, por lo que hoy en día es considerada la empresa líder a nivel mundial respecto a los productos de origen marino (Zubia *et al.*, 2003; PharmaMar, 2019).

En México, aunque se conoce la gran abundancia de ascidias, actualmente no se cuenta con algún reporte en literatura derivado de investigaciones mexicanas en las que se explore la actividad biológica de metabolitos extraídos a partir de estos organismos. Esto quizá se debe a la escasa información taxonómica de las especies que se distribuyen en aguas mexicanas, por lo que el relativo poco interés de la comunidad científica pueda ser atribuido principalmente a esta gran limitante. Sin embargo, los recientes reportes taxonómicos de Moreno (2013) y Palomino-Álvarez *et al.* (2019) en el noroeste del Pacífico mexicano y sur del Golfo de México, respectivamente, han generado la base teórica para abordar problemas de investigación enfocados en el estudio de productos bioactivos. Tal es el caso del presente proyecto donde se pretende explorar el potencial citotóxico de la ascidia colonial *Distaplia stylifera*, la cual prolifera en grandes cantidades en la bahía de La Paz, BCS, México.

## 2. Antecedentes

Las ascidias son organismos que solo desarrollan una notocorda en el estadio larval, esta es considerada el primordio de la columna vertebral en los cordados superiores, y la cual se absorbe cuando las ascidias pasan al estadio adulto. Además, a diferencia del resto de los cordados, poseen una estructura llamada endostilo, la cual es la encargada de producir la túnica que cubre al organismo, hecha de un tipo de celulosa y donde precisamente se secretan los metabolitos secundarios que cumplen con el papel de defensa (Guerrero-Arenas & González-Rodríguez, 2011). Algunos de estos metabolitos aislados a partir de ascidias han demostrado tener potencial biológico con aplicación médica. Hernández *et al.* (2013), elaboraron una lista de 17 fármacos de origen marino que se encontraban en fases clínicas para ser utilizados en el tratamiento contra cáncer; entre estos sólo dos han sido comercializados. El fármaco ecteinascidina-743, genéricamente llamado Yondelis fue aislado de la ascidia *Ecteinascidia turbinata* Herdman, 1880, fue aprobada para el tratamiento de sarcoma de tejido blandos y cáncer de ovario en casi 80 países de Europa, Norteamérica, Asia, y América del sur, además, su evaluación continúa en ensayos clínicos de fase II para tratar el cáncer de mama, de próstata, de pulmón y tumores pediátricos. Actualmente se produce de manera sintética y se conoce ejerce su actividad en las células tumorales a través de la interacción con el complejo de transcripción y bloqueando la reparación del ADN. Por otro lado, el compuesto w-Conotoxina MVIIA comercialmente llamado Ziconotide, fue derivado del veneno del caracol marino *Conus magus* Linnaeus, 1758, y es utilizado como tranquilizante de dolor de enfermos con cáncer y SIDA. Su mecanismo de acción se deriva del bloqueo selectivo de los canales del calcio neuronales sensibles al voltaje de tipo N, lo que inhibe la actividad de un subconjunto de neuronas, incluidos los nociceptores primarios sensibles al dolor (Miljanich, 2004; PharmaMar, 2019).

En el campo de investigación de cáncer, los compuestos de origen marino con actividad toxicológica han desempeñado un papel preponderante, y en concreto, algunos de los metabolitos secundarios sintetizados por las ascidias han entrado en las fases clínicas I y II como agentes antitumorales. Las ecteinascidinas 729, 743, 745, 759a, 759b, y 770 son alcaloides aislados de la ascidia *Ecteinascidia turbinata*. Particularmente, Yondelis ha mostrado la actividad antitumoral más potente, fue descrito por primera vez en 1969 y su estructura química fue asignada por Rinehart en 1993; su actividad se demostró en diversos melanomas, leucemias y cáncer de mama. Actualmente su estudio se encuentra en fases clínicas para el tratamiento de cáncer de pulmón a concentraciones muy bajas, exhibiendo un modo de acción único. Este compuesto puede ser considerado como el modelo a seguir de los agentes antitumorales de origen marino, debido a que actualmente es la única molécula en uso como un agente antitumoral y que es idéntica al compuesto aislado originalmente a partir del organismo marino del que se extrajo. Esta molécula fue aprobada en la Unión Europea en 2007 para el tratamiento contra sarcoma en tejidos blandos, y en otros países para el tratamiento de cáncer de ovario (Rinehart, 1990; Sakai *et al.*, 1992; Rinehart, 2000; Schwartzmann *et al.*, 2001; Zubia *et al.*, 2003; Valdés-Iglesias, 2010; Newman & Cragg, 2014).

Las didemninas (Fig. 1), son un grupo de péptidos reportados por vez primera en la ascidia colonial *Trididemnum solidum* (Didemnidae), estos presentan propiedades inhibitorias contra los virus *Herpes simplex*, viruela, influenza y toxicidad potente contra células tumorales del riñón de monos (Rinehart, 1980). La actividad antiviral y antitumoral del extracto de esta ascidia fue seguida a través de su purificación, aislando los componentes denominados como didemninas A, B y C, los cuales inhibieron el crecimiento de virus ARN y ADN y la síntesis de proteínas y ADN con un menor efecto sobre el ARN; además, son altamente tóxicos contra las líneas celulares leucémicas L1210 y P388, y de melanoma B16 de ratones (Rinehart, 1981). Específicamente, la didemnina A demostró ser un prometedor agente antiviral, mientras que la didemnina B es un depsipéptido cíclico mayormente activo y abundante, esta se ha establecido como un potente agente citotóxico contra células

L1210, modelos de tumores humanos *in vitro*, así como en tumores de ratones. Sin embargo, los efectos neuromusculares y cardiotoxicos que provocan su uso llevaron a la suspensión de los tratamientos clínicos. Actualmente las didemninas se observan en ensayos clínicos contra algunos tipos de cáncer (tumores hematológicos como linfoma de células T y mieloma múltiple refractario) (Rinehart, 1989, 1990; Hochster *et al.*, 1990; Schwartzmann *et al.*, 2001; Zubia *et al.*, 2003; PharmaMar, 2019).

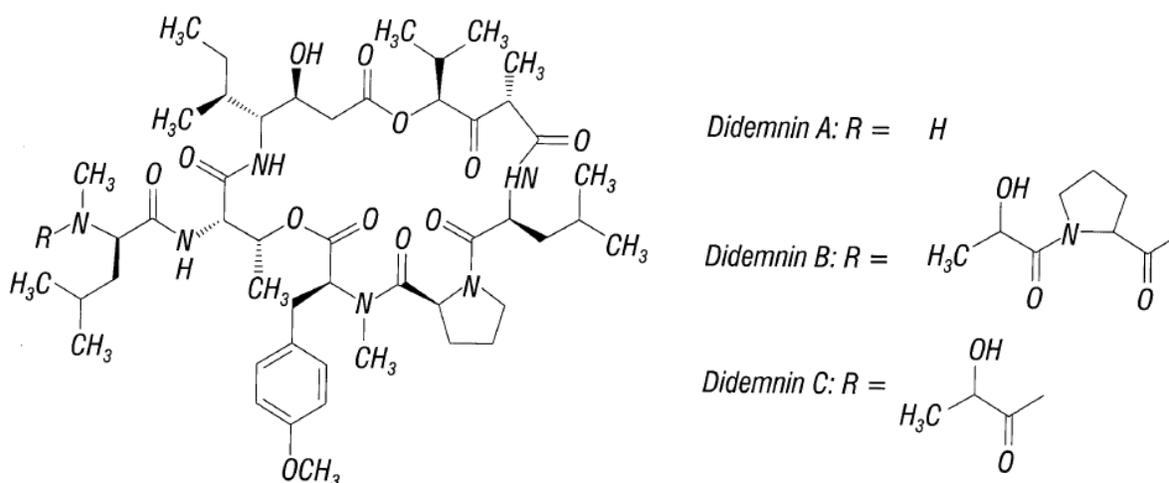


Figura 1. Estructura química de didemninas A, B y C. Tomada de Qian *et al.* (2014).

Por otro lado, la deshidrodidemnina B, un depsipéptido cíclico molecularmente similar a los diferentes tipos de didemninas, fue aislado de la ascidia *Aplidium albicans* y más tarde llamado comercialmente Aplidin; se demostró que tiene una alta actividad citotóxica contra diferentes tipos de tumores de rápida proliferación, líneas de células de leucemia (L1210), melanoma B16 y carcinoma pulmonar de Lewis. También es efectivo contra el cáncer de próstata, sin embargo, la cardiotoxicidad causada en los pacientes paralizó tal estudio, y fue hasta 2016 fue aprobado en Suiza para tratar mieloma múltiple. Este compuesto ha recibido designación de fármaco huérfano por la Agencia Europea de Medicamentos (AEM) y la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos de América (FDA). Su mecanismo de acción consiste en la unión específica con el factor eEF1A2 actuando sobre la función no canónica de esta proteína, lo que provoca en último término la muerte de las células tumorales a

través de la apoptosis (Hochster *et al.*, 1990; Rinehart, 2000; Schwartzmann *et al.*, 2001; Zubia *et al.*, 2003; PharmaMar 2016 y 2019).

Recientemente, Moreno (2013) estableció la taxonomía y biogeografía de ascidias en el Noroeste del Pacífico mexicano, determinó 15 especies nuevas y reportó la presencia de otras cuantas distribuidas en isla San Pedro Mártir, bahía de La Paz y bahía Magdalena; en especies del género *Distaplia* solamente se han reportado actividades antibacteriana y antiincrustante; tal es el caso de la ascidia *Distaplia nathensis*, la cual demostró tener potencial contra patógenos humanos y bacterias marinas (Murugan & Ramasamy, 2003).

*Distaplia stylifera* Kowalevsky, 1874, es una especie de ascidia colonial muy abundante en la bahía de La Paz, BCS. Se ha observado que crece en grandes cantidades incrustándose tanto en sustratos naturales como artificiales, incluyendo sogas, cadenas y plataformas de plástico; se distribuye en el Indopacífico desde el sur de Australia hasta Filipinas y en el Atlántico occidental desde el sur de Brasil hasta Carolina del Norte en los Estados Unidos Americanos (GBIF, 2018). Aunque el género *Distaplia* ha sido reportado en las costas del Pacífico Oriental, *D. stylifera* no se ha registrado oficialmente en esta región geográfica, por lo que este reporte podría tratarse de una reciente invasión dentro del Golfo de California; a este fenómeno se le atribuyen problemas de colonización en maricultivos de bivalvos, cascos de barcos y plataformas de muelles comerciales, hechos que generan pérdidas económicas en las industrias mencionadas (Ramírez, 2018).

### 3. Justificación

La necesidad de desarrollar fármacos para controlar ciertas enfermedades mediante nuevas alternativas más rápidas y eficaces ha impulsado la exploración de los océanos por parte de numerosos científicos. Sin embargo, los criterios para avanzar en las pruebas clínicas antes de entrar al mercado son cada vez más estrictos, y solo algunos han alcanzado fases avanzadas (Rinehart, 2000); tal es el caso de los fármacos anticancerosos para los que la principal desventaja es la falta de especificidad contra las células objetivo, y su agresividad.

En la última década, las ascidias han sido reconocidas por representar una rica fuente de nuevos metabolitos secundarios bioactivos y confirman las observaciones de que el suborden Tunicata o Urochordata es de especial interés tanto para la química y la investigación de compuestos con bioactividad, debido a que los mecanismos de acción de los fármacos aprobados han resultado interactuar específicamente con factores génicos de las células objetivo, y minimizando la agresividad contra células saludables (Lindquist & Hay, 1992; Baslow, 1977; Rinehart, 2000; PharmaMar, 2019). El reporte reciente de especies nuevas de ascidias, así como el esclarecimiento taxonómico del grupo, abre el camino a investigaciones relacionadas con la actividad biológica en el grupo de interés. Con base a las propiedades farmacéuticas reportadas para diferentes especies de ascidias alrededor del mundo, podemos inferir propiedades similares dentro de las mismas familias y géneros. Específicamente, la gran abundancia de *D. stylifera* en esta región, la necesidad de darle un uso y manejo adecuado debido a su repercusión en las industrias y su probable potencial biotecnológico, hacen de esta especie y del grupo taxonómico en general un amplio abanico de oportunidades para el planteamiento de nuevos proyectos con enfoque farmacológico y biomédico.

## 4. Objetivos

### General

Evaluar la actividad citotóxica de compuestos extraídos de especímenes de ascidia *Distaplia stylifera* contra una línea celular de leucemia mieloide crónica (K-562).

### Particulares

1. Obtener y fraccionar el extracto etanólico crudo de *Distaplia stylifera* mediante diversas técnicas cromatográficas.
2. Seleccionar y evaluar fracciones con actividad citotóxica a través de un fraccionamiento biodirigido.
3. Evaluar la actividad citotóxica contra leucemia mieloide crónica (K-562) mediante el ensayo del MTT.
4. Aislar fracciones y/o compuestos activos y caracterizarlos mediante técnicas espectroscópicas y de análisis químico.

## 5. Hipótesis

Los compuestos con actividad citotóxica extraídos de *Distaplia stylifera* son péptidos del tipo didemninas, como las reportadas para otras especies de ascidias. Por lo que se espera que muestren actividad citotóxica contra leucemia mieloide crónica (K-562).

## 6. Metodología

### 6.1. Material biológico y trabajo de campo

Se recolectaron 10 Kg de *Distaplia stylifera* mediante buceo libre y manual en las marinas La Paz ( $24^{\circ}09'17.2''\text{N}$   $110^{\circ}19'33.8''\text{O}$ ) y La Costa ( $24^{\circ}09'12.7''\text{N}$   $110^{\circ}19'38.2''\text{O}$ ), ambas situadas en la bahía de La Paz, BCS, México (Fig. 2). Durante la recolecta se tomaron fotografías en vivo de los organismos para su futura identificación y descripción taxonómica (Fig. 3).

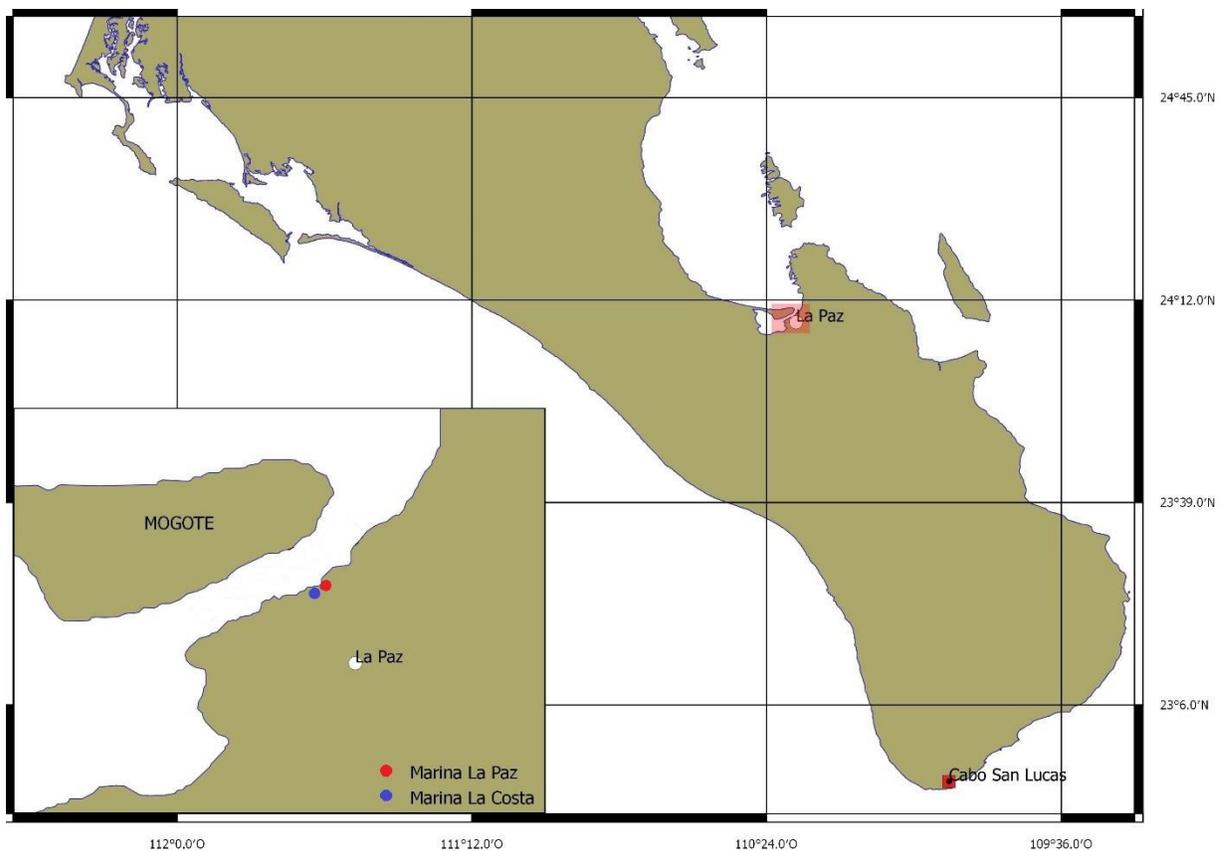


Figura 2. Lugar de recolecta de *D. stylifera*. Marinas La Paz y La Costa en la bahía de La Paz, BCS, México.

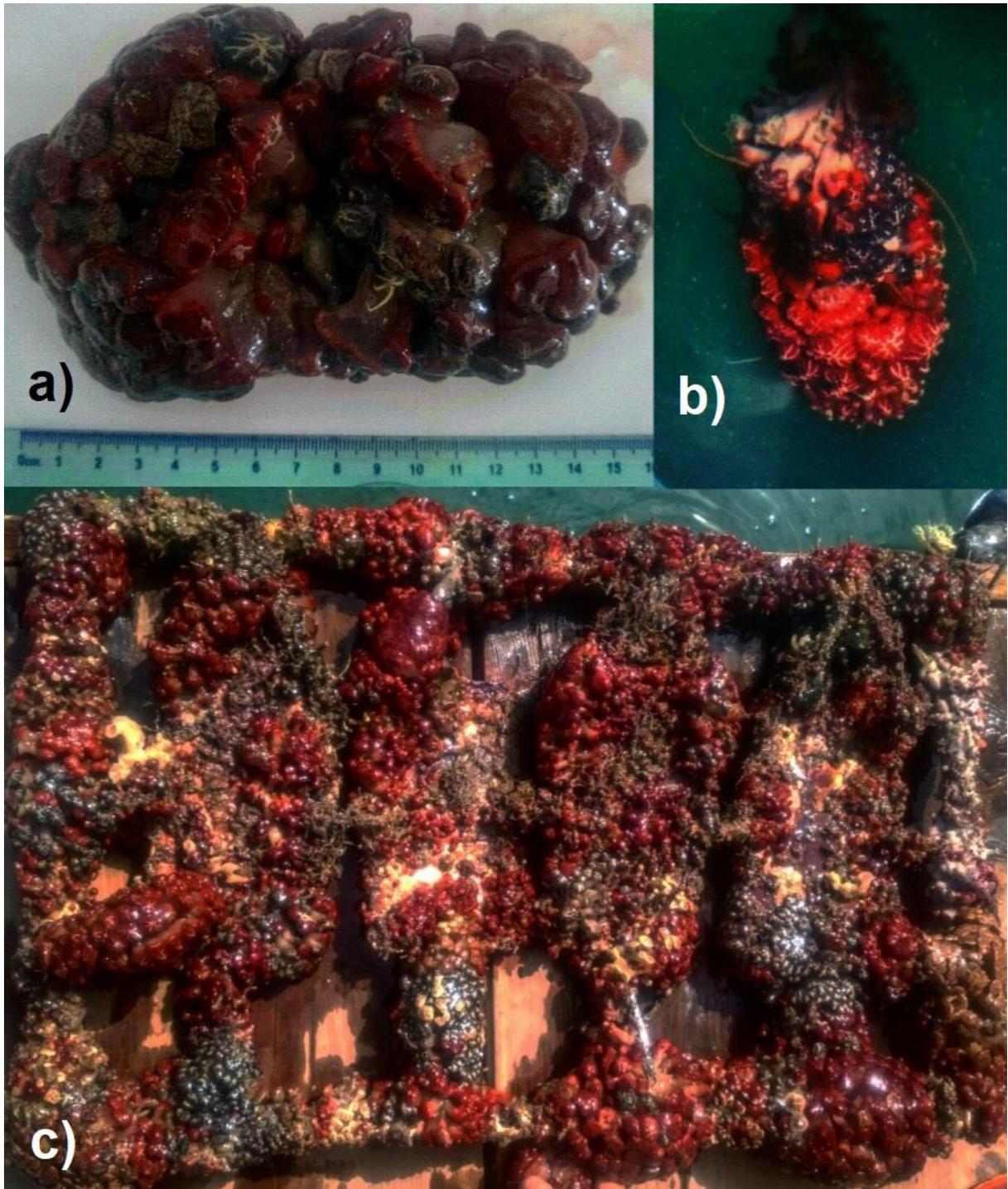


Figura 3. Colonias de *Distaplia stylifera* en laboratorio (a), medio marino (b) y ancladas a plataforma de plástico (c).

## 6.2. Descripción taxonómica

Actualmente *D. stylifera* está clasificada dentro del Subfilo Urochordata por la presencia de una notocorda en estadio larval; a la Clase Ascidiacea por ser organismos sésiles del Subfilum; la Familia Holozoidae y Género *Distaplia*. Las colonias mejor desarrolladas tienen forma de hongo y consisten en una cabeza ancha montada en un pedúnculo grueso (Fig. 4a). Los zooides o individuos están dispuestos en la parte central de la superficie de la cabeza, acomodados en varios sistemas pequeños y de manera irregular (Name, 1945) (Fig. 4b). Aunque en algunas ocasiones la descripción de la larva es importante para la identificación a nivel especie, para *D. stylifera* no se cuenta con un informe detallado (Fig. 4c).

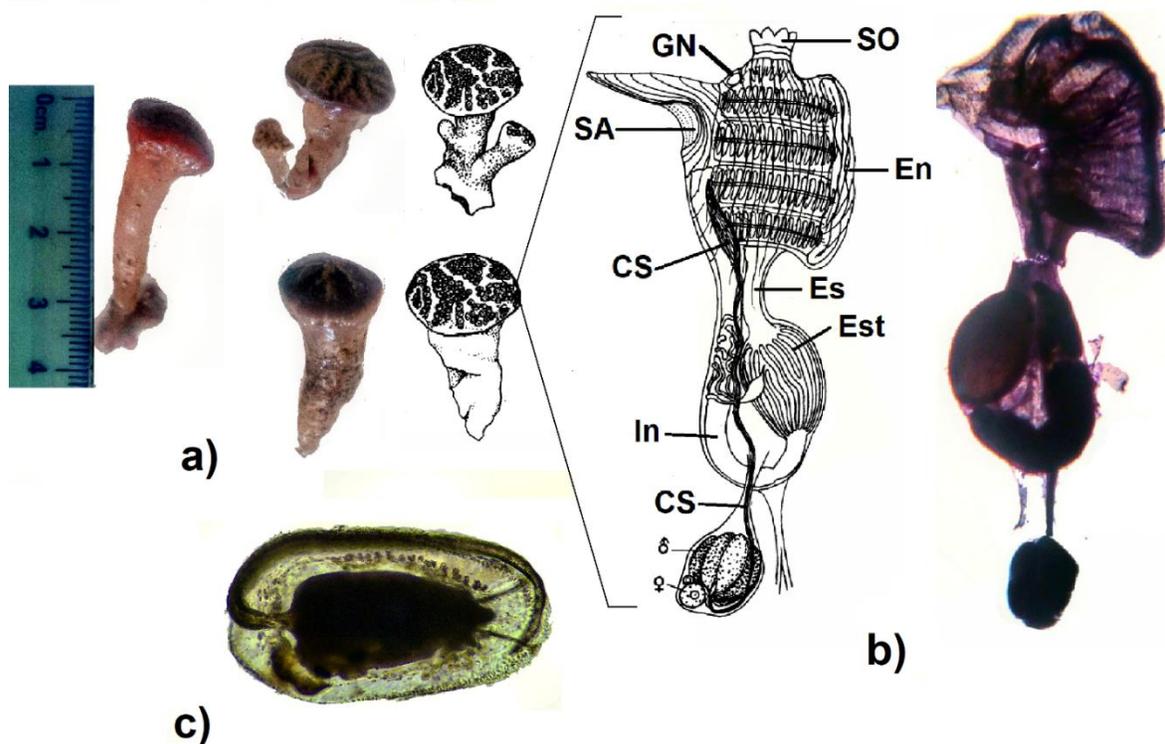


Figura 4. Taxonomía de *Distaplia stylifera*; a) Colonia; b) Zoide; c) Larva; SO: Sifón Oral, En: Endostilo, Es: Esófago, Est: Estómago, CS: Conducto seminal, In: Intestino, SA: Sifón atrial, GN: Ganglio neural. Tomada de Name (1945), modificada por Mendoza, 2019.

### 6.3. Trabajo experimental

#### 6.3.1. Obtención del extracto

Los especímenes se enjuagaron con agua destilada para eliminar la mayor cantidad de materia epizoica, enseguida se eliminó la mayor cantidad de agua y fueron congelados hasta el momento de la obtención del extracto en crudo (EC). Para esto, aún congelados los organismos fueron cortados en trozos y colocados en recipientes ámbar para evitar la descomposición por efecto de la luz. Para preservar los organismos y eliminar la humedad fueron cubiertos con etanol puro destilado y se dejaron reposar a temperatura ambiente (27° C aproximadamente) y en la oscuridad. Al tercer día se decantó el etanol separándolo de los organismos, la solución obtenida se concentró con un rotavapor Yamato a 40°C y presión reducida hasta el secado completo, para de esta forma obtener el EC etanólico. Este fue fraccionado mediante diversas técnicas cromatográficas y bajo la guía de ensayos de actividad biológica (Fig. 5).

#### 6.3.2. Fraccionamiento guiado por bioensayos

El extracto etanólico fue fraccionado por medio de extracción sólido/líquido (ESL1); para ello se disolvieron 100g del EC en etanol destilado y se absorbió en 300g de sílica gel. Por medio de lavados, la muestra fue separada de la matriz con diferentes disolventes: diclorometano (DCM), acetona y agua, obteniendo de esta manera cuatro fracciones principales: una constituida por compuestos pocos polares obtenida con el DCM (ESL1F1), la segunda por compuestos medianamente polares obtenida con acetona (ESL1F2), la tercera (acuosa) por compuestos no extraídos en las fracciones anteriores (ESL1F3) y la cuarta con los compuestos que no se solubilizaron en agua separados por precipitación (ESL1F4). Todas las fracciones fueron concentradas en rotavapor a 40°C y presión reducida hasta el secado completo.

Las fracciones (ESL1F1 a ESL1F4) y el EC fueron procesados mediante un fraccionamiento guiado por los ensayos de toxicidad aguda en *Artemia franciscana* y

actividad hemolítica contra eritrocitos de sangre de bovino; adicionalmente se determinó el perfil químico por medio de ensayo autográfico (ver sección 6.5 para mayor detalle). La fracción ESL1F3 al resultar ser la más activa fue fraccionada mediante una extracción liquido-liquido (ELL1), en donde 10 g de la muestra previamente secada en rotavapor, se solubilizó en 50 mL de agua destilada y se colocó en un embudo de decantación. Se agregaron tres volúmenes de 50 mL de DCM, y entre cada volumen se agitó moderadamente, enseguida se colocó el embudo en posición vertical y se dejó en reposo hasta percibir una separación definida de las fases orgánica y acuosa. La fase de DCM (ELL1F1) se recolectó hasta que se observó que la extracción fuera exhaustiva, así la fase acuosa fue nuevamente extraída, repitiendo el proceso anterior utilizando n-butanol como fase orgánica (ELL1F2). Las dos fases orgánicas y la acuosa (ELL1F3) se concentraron a presión reducida en un rotavapor. Estas últimas tres fracciones fueron analizadas para determinar la presencia de aminoácidos por medio de ensayo autográfico (ver sección 6.5 para mayor detalle).

La fracción ELL1F3 que resultó tener evidencia de compuestos aminoácidos fue seleccionada para un tercer fraccionamiento en columna cromatográfica (CC1) con sílica gel fase normal y un gradiente de polaridad en las siguientes proporciones: Hex 100%, DCM 100%, DCM-MeOH 95:5, 9:1, 8:2, 7:3, 1:1, MeOH 100% y MeOH-Agua 1:1.

Para dar seguimiento a los compuestos, cada fracción obtenida durante los fraccionamientos fue analizada por medio de cromatografía en capa fina (CCF) utilizando placas de sílica gel fase normal, las cuales fueron desarrolladas en cámaras de saturación utilizando como eluyente una mezcla de DCM-MeOH a una relación 9:1 y reveladas con una solución de vainillina al 0.25% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10%. Las 14 fracciones obtenidas a partir de este fraccionamiento (CC1F1 a CC1F14) fueron evaluadas para confirmar su toxicidad por medio del ensayo letalidad en *A. franciscana*, y las que resultaron activas fueron seleccionadas para evaluar su actividad citotóxica contra la línea K-562 (leucemia mieloide crónica humana) mediante el ensayo de viabilidad del MTT (Fig. 5).

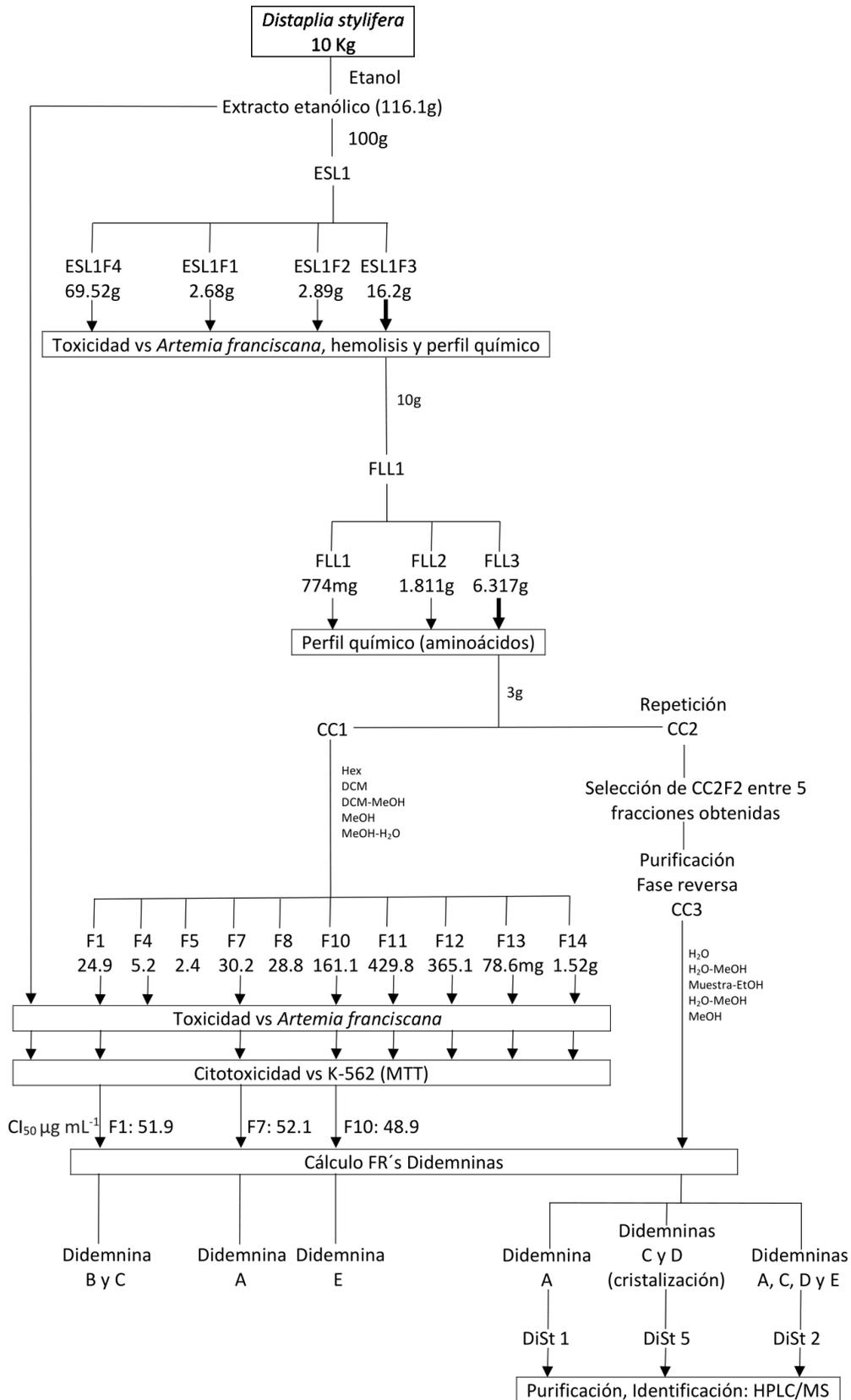


Figura 5. Diagrama de extracción y fraccionamiento biodirigido de *D. stylifera*

### 6.3.3. Ensayos de actividad biológica y perfil químico

Actualmente la prueba de letalidad en nauplios de *A. franciscana* Linnaeus, 1758, es uno de los ensayos más empleados para la búsqueda de compuestos bioactivos con actividad anticancerosa y ha sido considerado uno de los más seguros, prácticos y económicos para determinar la bioactividad de productos marinos. Los resultados de toxicidad en *A. franciscana* han sido considerados bastante similares a los obtenidos en ensayos para determinar diferentes actividades: anticancerosa, antitumoral, antiproliferativa y hasta larvicida contra especies de mosquitos como *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus*. Kurniatanty *et al.* (2015), al igual que el Instituto Nacional del Cáncer de los EUA (Anderson *et al.*, 1991), han encontrado una relación significativa existente entre la prueba de letalidad en artemia y la citotoxicidad en líneas celulares de carcinoma humano y la inhibición *in vitro* de líneas celulares de tumores sólidos humanos (Ara *et al.*, 1999; Hira *et al.*, 2010; Laali *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2015). El Taxol, es un fármaco antitumoral aprobado por agencias internacionales responsables del uso y comercialización de medicamentos, entre ellas la FDA de los Estados Unidos de América para tratar carcinomas de mama, ovario y pulmón, originalmente fue aislado de la conífera *Taxus brevifolia* Nuttall, 1849 y se descubrió gracias al empleo de este bioensayo (Peteros & Uy, 2010; Kurniatanty *et al.*, 2015).

Tanto el EC como las fracciones (ESL1F1 a ESL1F4) fueron evaluadas mediante el ensayo de letalidad aguda en *Artemia franciscana* establecido por McLaughlin y Lingling (1998), a diferentes concentraciones (10, 100 y 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y por triplicado en microplacas de 96 pozos, tomando como control negativo una solución de dimetilsulfóxido al 5% en agua marina sintética, en la cual se diluyeron las muestras, y al fármaco Taxol como control positivo. Al transcurrir 24 h en incubación a 28°C se contaron los organismos vivos en cada pocillo y se calculó el porcentaje de mortalidad, con estos datos se realizó un análisis estadístico con la función probit para obtener la concentración letal media ( $\text{CL}_{50}$ ) de cada una de las fracciones, dato que es comúnmente utilizado para comparar la actividad citotóxica de diversos productos naturales (Mendoza, 2008).

También se evaluó la actividad hemolítica siguiendo la metodología de Olezek & Bialy (2006), en placas de agar sangre preparadas con eritrocitos de sangre bovina obtenidas a través de un laboratorio clínico. Se prepararon discos de papel filtro de 6.4 mm de diámetro impregnados con 2 mg de cada muestra a evaluar y se colocaron sobre las placas de agar sangre por triplicado. Después de 24 h a temperatura ambiente (27°C aproximadamente) y posteriormente se revisaron visualmente y se registraron los halos de hemólisis. Se consideró como control negativo al disolvente de las muestras y como control positivo un extracto estandarizado de agave, debido a su potente actividad hemolítica.

El perfil químico se obtuvo con base en la técnica de CCF descrita por Khandelwal (2008) y Kokate (2014) para determinar el tipo de compuestos que se encuentran en las fracciones y en el EC. Las placas cromatográficas fueron elaboradas como se mencionó, pero en esta ocasión fueron expuestas a distintos reveladores: reactivo de Dragendorff (Sigma-Aldrich) para determinar alcaloides; reactivo de Lieberman-Burchard para esteroides insaturados, triterpenos insaturados y saturados; solución de cloruro de hierro ( $\text{FeCl}_3$ ) en n-butanol ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ ) y ácido clorhídrico (HCl) al 5% para fenoles, taninos pirogálicos y taninos catecólicos; solución de cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) en etanol al 1% para flavonoides; solución de hidróxido de potasio (KOH) en etanol al 10% para cumarinas, antraquinonas y antronas; solución de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) en etanol al 10% para saponinas y solución de ninhidrina para aminoácidos. La evidencia de este último grupo de compuestos fue necesaria para la selección de aquellas fracciones que probablemente estén constituidas por los péptidos del tipo didemnina.

Posteriormente las placas fueron analizadas a simple vista y con luz ultravioleta a 250 y 360 nm, donde las reacciones colorimétricas fueron interpretadas como presencia o ausencia de los grupos químicos mencionados.

#### 6.3.4. Cultivo de la línea celular K-562

La línea celular K-562 fue cultivada a partir de una línea cultivo criogenizada (-20°C, en suero fetal bovino (SFB) y dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%) perteneciente al laboratorio 103 de inmunología de la ESM-IPN y basándonos en la metodología de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, 2018). Este fue reactivado en una botella de cultivo celular con 5 mL de medio de cultivo RPMI 1640 (con rojo fenol) con glutamina 1%, SFB 10% y solución antibiótica-antimicótica 1%. La reproducción de las células fue monitoreada con la ayuda de un microscopio invertido, realizando recambios de medio de cultivo cuando se observaba un viraje y finalmente la cosecha se llevaba a cabo cuando la cantidad de células calculadas eran suficientes para el ensayo citotóxico. El cálculo de la cantidad de células se llevó a cabo centrifugando el cultivo celular en tubos Falcon a 1500 rpm durante 5 min. El sobrenadante se decantó y al botón celular fue resuspendido en 1mL de medio de cultivo. A partir de esta suspensión se determinó la viabilidad de las células tomando 5  $\mu$ L y agregándole 45  $\mu$ L de una solución de azul tripano al 2%. De esta suspensión, 10  $\mu$ L fueron colocados en una cámara de Neubauer para el conteo celular; el resultado se expresó en número de células por mililitro preparado.

#### 6.3.5. Evaluación de la actividad citotóxica contra leucemia mieloide crónica (K-562). Ensayo del MTT

Este ensayo consistió en la exposición de las células cosechadas a las fracciones seleccionadas mediante el ensayo contra *A. franciscana* en microplacas de cultivo de fondo plano de 96 pozos; se evaluaron seis concentraciones diferentes (0.01, 0.1, 1, 10, 50 y 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) por triplicado y a tres tiempos de incubación (24, 48 y 72 horas) a 37.2°C y con 3% de CO<sub>2</sub>. Como control positivo se utilizó Tritón al 0.3% en RPMI 1640. Una vez concluidos los tiempos en exposición, se agregó a cada uno de los pozos una solución de MTT al 2.5% en buffer fosfato salino, el cual es soluble y fácilmente metabolizado por las células. Después se incubaron cuatro horas

en donde se lleva a cabo la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul (formazan), lo que permite determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células expuestas. Al concluir este lapso, las microplacas son centrifugadas a 3000 rpm por 5 min para asentar las células viables al fondo de los pozos, después se retiró el sobrenadante y se agregó DMSO para disolver el formazán, de esta manera fue cuantificado por medio de la lectura de su densidad óptica en un espectrofotómetro a 540 nm. Los valores de viabilidad celular obtenidos son proporcionales a la intensidad de coloración del formazan, estos fueron transformados a valores de letalidad y analizados mediante el análisis estadístico probit para obtener la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) de cada una de las fracciones evaluadas (Mosmann, 1983; Denizot & Lang, 1986). Estos ensayos se realizaron tres veces en tres eventos independientes.

#### *6.3.6. Identificación de didemninas mediante cromatografía en capa fina*

Las fracciones (F1, F7 y F10) que resultaron con mayor actividad en el ensayo de citotoxicidad fueron analizadas mediante CCF basándonos en la metodología de Schainber descrita en 1939 (Scott, 1995), y desarrolladas con el sistema de disolventes DCM-MeOH 9:1 para determinar los factores de retención (FR) de los compuestos presentes; esto con la finalidad de compararlos con los FR específicos de algunas didemninas reportados en literatura (Wagman & Cooper, 1988).

#### *6.3.7. Re-extracción y semipurificación de los compuestos más activos*

Debido a la poca cantidad de los compuestos presentes en las fracciones más activas en el ensayo de citotoxicidad, se realizó un nuevo fraccionamiento en columna cromatográfica (CC2) a partir del resto de la fracción FLL1F3. Para la semipurificación de los compuestos de interés presentes en la fracción CC2F2, 130 mg fueron procesados mediante columna cromatográfica (CC3) empacada con sílica gel fase

reversa desarrollada con la ayuda de una bomba peristáltica; esta consistió en equilibrar la sílica dentro de la columna con agua destilada y agua-MeOH 9:1. Posteriormente se procedió a agregar la muestra diluida en etanol-agua y se continuó con la elución con agua-MeOH 9:1 y agua-etanol 8:2, terminando con MeOH 100%. De esta manera se obtuvieron las fracciones etiquetadas como DiSt1, DiSt2 y DiSt5 donde se re-extrajeron los compuestos presentes en las fracciones más activas. Por último, los compuestos presentes en la fracción DiSt5 fueron cristalizados para aumentar su pureza, para esto se disolvió la fracción en MeOH-EtOH 9:1 a 50°C, se dejó enfriar y en reposo para que se llevará a cabo la evaporación del disolvente a temperatura ambiente por un lapso de 24 h. Los cristales obtenidos fueron separados por filtración simple y tres lavados con DCM.

#### 6.3.8. *Caracterización química*

Las fracciones activas contra la línea celular K-562 (DiSt 1, DiSt 2 y DiSt 5) fueron fraccionadas con la finalidad de conocer el tiempo de retención en el que se separan y la masa de los compuestos mayoritarios, con ayuda del HPLC-Ms Altech con detector ultravioleta-visible y un espectrofotómetro de absorción atómica marca Buck Scientific modelo 210 VPG. Para ello se inyectaron en el HPLC 2  $\mu\text{L}$  de cada muestra ajustadas a una concentración de 12  $\text{mg mL}^{-1}$  en una solución de ácido fórmico al 0.1% en MeOH. Posteriormente se calculó el peso molecular de las didemninias A, B, C y el de sus probables aductos (iones formados) y, por último, se realizó la búsqueda selectiva de posibles fórmulas químicas mediante el software y base de datos ChemSpider.

## 7. Resultados y Discusión

### *Letalidad aguda contra Artemia franciscana*

La toxicidad aguda mostrada por el EC y las cuatro fracciones ESL1F1 a ESL1F4 de *D. stylifera* se encuentra por debajo de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , alcanzando la mayor actividad a la  $CL_{50}$  de  $12.6 \mu\text{g mL}^{-1}$  mostrada por la fracción ESL1F4 (Fig. 6). De acuerdo con Peteros y Uy (2010), valores de  $CL_{50}$  por debajo de  $100 \text{ ppm}$  o  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en el ensayo en *A. franciscana* indican presencia de un potente agente citotóxico o probable insecticida, lo cual justifica futuras investigaciones sobre el extracto de interés. Además, de acuerdo con Cepleanu *et al.* (1994), el fármaco anticanceroso comercialmente conocido como Taxol es el más utilizado actualmente para el tratamiento de estos padecimientos, fue descubierto a través del mismo ensayo y mostró una  $CL_{50}$  de  $4.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Por lo que podemos sugerir una actividad anti-proliferativa muy prometedora, tomando en cuenta que las fracciones evaluadas no son compuestos purificados.

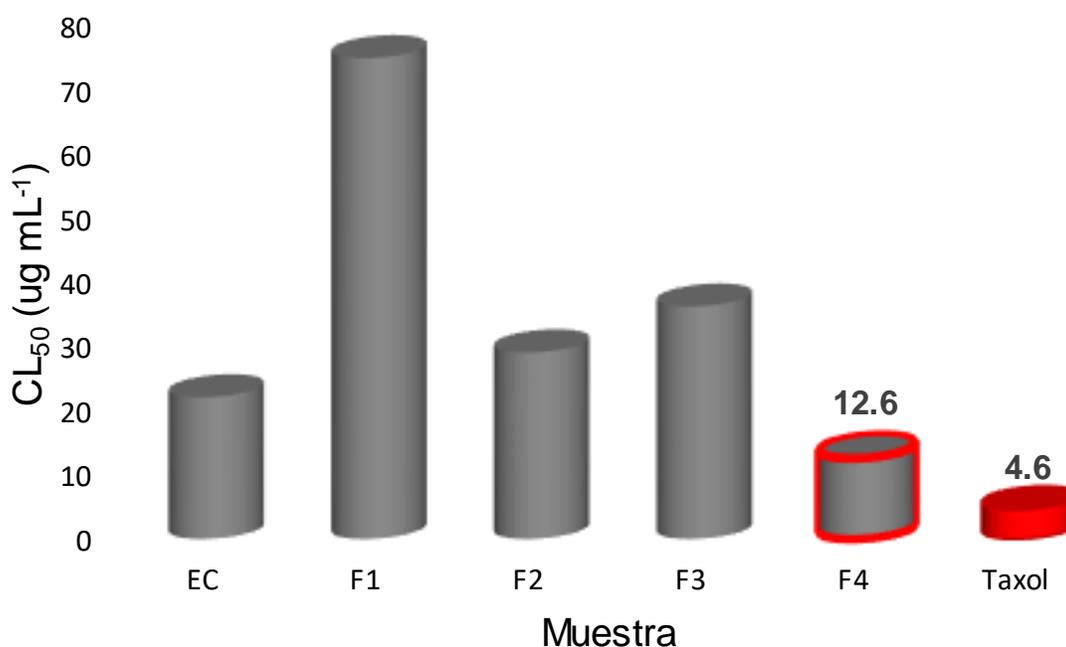


Figura 6. Concentración letal media ( $CL_{50}$ ) contra *A. franciscana* mostrada por el extracto crudo (EC), las fracciones ESL1F1 a ESL1F4 de *D. stylifera* y el fármaco Taxol.

Al evaluar las fracciones obtenidas a partir de la fracción ESL1F4, la actividad toxicológica contra *A. franciscana* aumentó y se obtuvo una  $CL_{50}$  de  $8.6 \mu\text{g mL}^{-1}$  mostrada por la fracción F10, mucho más parecida a la del Taxol. Las fracciones F1, F7, F10 a F14 y el EC resultaron ser las más activas (menos de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Fig. 7), por lo que fueron seleccionadas para ser evaluadas contra la línea celular de leucemia mieloide crónica K-562 mediante el ensayo de viabilidad MTT.

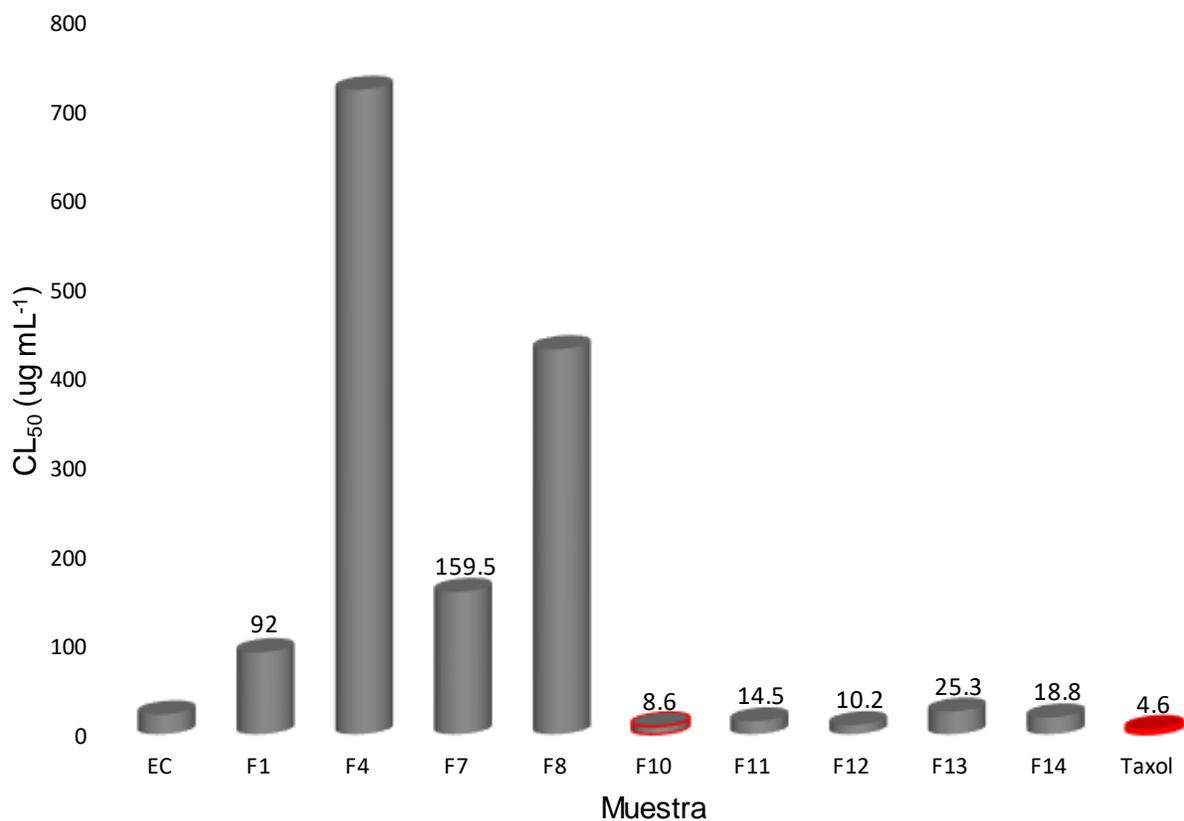


Figura 7. Concentración letal media ( $CL_{50}$ ) contra *A. franciscana* mostrada por el extracto crudo (EC), las fracciones 1-14 obtenidas a partir de la CC1 y el fármaco Taxol.

## Actividad Hemolítica

El EC y las fracciones ESL1F1 a ESL1F4 de *D. stylifera* no mostraron una clara actividad hemolítica dentro de las 24 horas en evaluación. La fracción ESL1F4 mostró un halo de hemólisis poco definido, por lo que no se pudo confirmar tal actividad (Fig. 8). Es probable que el tiempo de evaluación no haya sido suficiente y que la actividad de los compuestos se vea reflejada hasta las 48 o 72 horas, o incluso que la difusión en el medio de agar sangre no haya sido adecuada como para observar halos de hemólisis bien definidos, esto menciona Ruiz *et al.* (2009) al comprobar mejores resultados en el ensayo de difusión por medio de pozos en comparación a aquel donde se emplean sensi-discos, además de mencionar que los halos de hemólisis se observan a partir de las 48 de evaluación. Sin embargo, estos resultados pueden ser reflejo de la posible especificidad citotóxica de los compuestos evaluados frente a ciertos tipos de células, porque como se muestra en el siguiente apartado la fracción ESL1F4, esta contiene de entre varios compuestos, a las denominadas saponinas, las cuales de acuerdo con Voutquenne (2001) presentan una potente actividad hemolítica independientemente del tipo de ensayo empleado, por lo que la actividad debió ser evidente en la fracción evaluada. Debido a esto, se sugiere repetir el ensayo dejando un mayor tiempo para la difusión de los componentes y emplear el ensayo por medio de pozos.

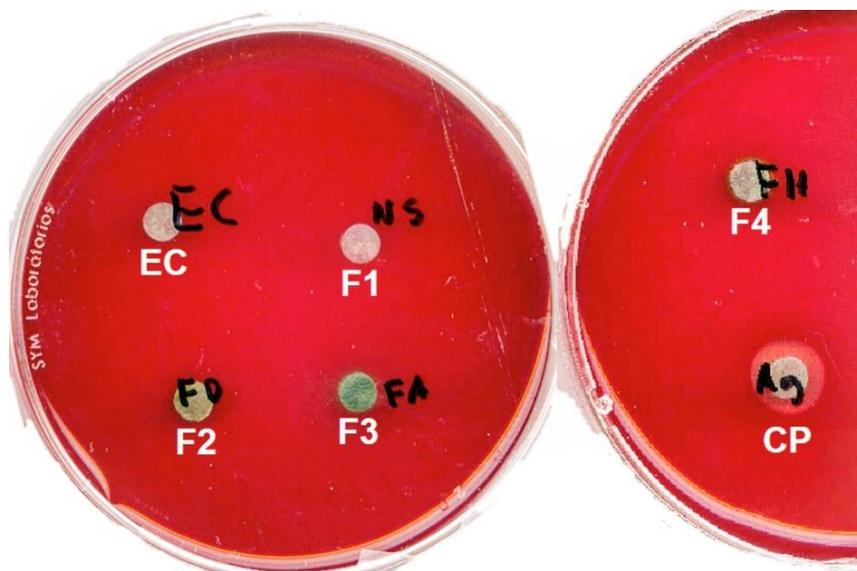


Figura 8. Actividad hemolítica mostrada por el EC, fracciones ESL1F1 a ESL1F4 de *D. stylifera* y el control positivo (CP) perteneciente al EC de agave

### *Perfil químico*

Las fracciones ESL1F1 a ESL1F4 de *D. stylifera* mostraron un perfil químico compuesto principalmente por triterpenos insaturados y fenoles (fracciones ESL1F2 a ESL1F4), también hubo evidencia de alcaloides, flavonoides, antronas, saponinas y aminoácidos (Tabla 1). Es importante resaltar que la fracción acuosa (ESL1F4) fue la más activa en el ensayo de letalidad aguda contra *A. franciscana* y la única que mostró la presencia de aminoácidos, probablemente péptidos del tipo didemninas, razón por la que se seleccionó para su fraccionamiento.

Los reportes en literatura respecto a los compuestos aislados a partir de ascidias indican que estos pueden ser agrupados en metabolitos nitrogenados y los no nitrogenados, además de que el género *Aplidium* ha sido el más estudiado. En el grupo de los compuestos no nitrogenados predomina la presencia de meroterpenoides (terpenos parciales) y sus derivados lineales o cíclicos. Dentro de los reportes destacan cuatro meroterpenoides aislados de la ascidia *Aplidium conicum*, los cuales mostraron una actividad moderada pero selectiva contra la línea tumoral P-388 de linfoma murino ( $CI_{50}=5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Garrido *et al.* 2002 mencionan que estos compuestos son por lo general muy inestables, lo cual limita su evaluación mediante ensayos farmacológicos. Chan *et al.* (2011) aisló meroterpenoides de la ascidia *A. scabellum*, los cuales mostraron actividad inhibitoria *in vitro* de la producción de superóxido por neutrófilos humanos, alcanzando  $CI_{50}$  de 21, 125, 92 y  $0.2 \mu\text{M}$ , esta capacidad moderadamente potente y selectiva de inhibir el proceso respiratorio de los neutrófilos sugiere que estos compuestos podrían ser utilizados para el desarrollo de agentes anti-inflamatorios. Por otro lado, las rossinonas A y B, son dos meroterpenoides aislados de ascidias del género *Aplidium*, Appleton *et al.* (2009) demostró que estos compuestos tienen actividad antiinflamatoria *in vitro* inhibiendo la producción de superóxido por parte de neutrófilos de sangre humana, además de exhibir actividad antibacteriana contra la bacteria Gram-positiva *Bacillus subtilis* y el hongo *Trichophyton mentagrophytes*, y actividad antiviral selectiva contra el virus HSV-1, causante de herpes simple. De los dos meroterpenoides, el denominado como

rossinona B mostró una potente actividad antiproliferativa contra la línea de leucemia murina P388 con una  $CI_{50}$  de 0.39  $\mu$ M. De acuerdo con la literatura este tipo de compuestos abarcan también actividades antiproliferativa, inductora de la apoptosis y la antiparasitaria, incluyendo la malaria (Appleton *et al.*, 2009).

Aunque la evidencia en el perfil químico de *D. stylifera* mostró principalmente la presencia de triterpenos, la evidencia en literatura sobre este tipo de compuestos en ascidias es nula, por lo que es probable que los compuestos observados se traten de meroterpenoides, los cuales son conocidos por ser derivados de terpenos complejos y ser muy inestables (Garrido *et al.*, 2002). Esto nos da una idea de que algunos de los compuestos presentes en las fracciones que mostraron una mayor citotoxicidad posiblemente sean de naturaleza terpénica, según lo muestran las evidencias bibliográficas.

Tabla 1. Compuestos químicos presentes en el EC y las fracciones ESL1F1 a ESL1F4 de *D. stylifera*.

Compuestos	Alcaloides	Triterpenos y/o esteroides			Fenoles y taninos			Flavonoides			Cumarinas			Saponinas	Aminoácidos
		Esteroides insaturados	Triterpenos insaturados	Esteroides o triterpenos saturados	Fenoles	Taninos pirogálicos	Taninos catecólicos	Flavonoides	Cumarinas	Antraquinonas	Antronas				
Muestra															
Extracto Crudo	+		+++		+++				++					++	++
F1 (No Soluble)															+
F2 (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	+		+++		+++				++					++	++
F3 (C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O)	+		+++		+++				++					++	++
F4 (H <sub>2</sub> O)			+						++					++	+

Los fenoles fueron otro grupo de compuestos no nitrogenados que destacaron en el perfil de *D. stylifera*. En literatura, los reportes de compuesto fenólicos son escasos y se limitan a mencionar la cantidad en porcentaje que contienen algunas especies. Algunos ejemplos mencionan que la especie *Ascidia sydneiensis* contiene un 8.59% y *Didemnum psammathodes* un 13.9% de su peso total (Packiam *et al.*, 2015 y Shanmuga *et al.*, 2016). En general, estos compuestos son reconocidos por su capacidad para secuestrar radicales libres, lo que les atribuye un potencial antioxidante. Además, a los compuestos fenólicos se les atribuye un amplio espectro de actividades bioquímicas incluyendo la antimutagénica, anticarcinómica, así como la habilidad de modificar la expresión génica. Packiam *et al.*, (2015) reporta la presencia de compuestos fenólicos como ácido gálico, ácido ferúlico y ácido cafeico en el extracto de la ascidia *Microcosmus exasperatus*, y de los cuales su actividad antioxidante está ampliamente reportada en literatura.

Aunado, los flavonoides son un grupo de compuestos polifenólicos, los cuales también han sido ampliamente reportados en organismos marinos. En la especie *A. sydneiensis* representan un 49.81% (Packiam *et al.*, 2015), en *Ecteinascidia venui* un 45.82% (Sankaravadivu *et al.* 2013) y en *D. psammathodes* un 86.13% de su biomasa corporal (Sankaravadivu *et al.* 2017). Las propiedades de estos compuestos van desde el secuestro de radicales libres (DPPH) alcanzando una máxima actividad a los 1600  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , inhibición de enzimas hidrolíticas y oxidativas, además de la capacidad anti-inflamatoria (Sankaravadivu *et al.* 2017).

Aunque los reportes de los compuestos fenólicos aislados a partir de ascidias son escasos, resulta interesante el gran contenido de estos respecto al peso total de los organismos. Al ser de los más evidentes en *D. stylifera* resulta interesante su futura evaluación principalmente para determinar su potencial antioxidante y por consiguiente su probable uso como compuestos anticancerígenos.

También de naturaleza no nitrogenada, las antronas son un grupo de compuestos cetónicos escasamente reportados en organismos marinos. Dentro de las ascidias solamente existe un ejemplo documentado, la albopunctatona es una antrona-

antraquinona aislada de *D. albopunctatum* y que fue recolectada en Australia; esta mostró actividad antiprotozoaria contra el parásito *Plasmodium falciparum* responsable de la malaria, alcanzando una  $CI_{50}$  de 4.4  $\mu$ M, además de que fue evaluado contra diversas células saludables y cancerosas, mostrando una especificidad contra el parásito de interés (Carrol *et al.* 2012). Este compuesto al tener naturaleza de antraquinona además de las propiedades de las antronas, se le ha atribuido actividad insecticida contra los mosquitos *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus*, además de poseer toxicidad selectiva al no dañar organismos. Esto representó la base para investigaciones recientes para controlar el principal vector del virus del zika y otros patógenos humanos (Arumugan *et al.* 2018).

Aunque la evidencia de antronas en *D. stylifera* fue escasa, la investigación de este grupo de compuestos presentes en ascidias es importante, debido a que pueden tener una gran actividad con aplicación médica y biocida para el control de plagas. Además, este ejemplo es una evidencia de la tendencia del esfuerzo de investigación para aislar ciertos grupos químicos a partir de especies de ascidias, dejando de lado el descubrimiento de moléculas con naturaleza y bioactividades poco estudiadas.

Los reportes de saponinas aisladas a partir de ascidias son escasos o prácticamente nulos, Sankaravadivu *et al.* (2017) estimó la cantidad de estos compuestos en el extracto de *D. psammathodes* en una cantidad de 12.01  $\mu$ g  $Kg^{-1}$ , sin embargo, la actividad biológica de los mismos no fue evaluada. Como se mencionó anteriormente, las saponinas son agentes conocidos por su potente actividad hemolítica y citotóxica, sin embargo, al no observarse cierta actividad en los ensayos realizados es probable que la cantidad de saponinas en *D. stylifera* y en otras especies de ascidias sea irrelevante, por lo que su estudio se ha visto escasamente reportado.

Contrariamente, la química de ascidias está conformada principalmente por metabolitos nitrogenados, los cuales pueden ser divididos en dos grupos dependiendo de su base estructural: péptidos y alcaloides policíclicos aromáticos. En los últimos 25 años se han generado una cantidad impresionante de alcaloides aislados a partir de ascidias. Muchos de estos compuestos han presentado importantes actividades con

aplicación biomédicas, dentro de las cuales la citotoxicidad es la más frecuente (Menna *et al.*, 2011). Desafortunadamente, la ecología química de estos organismos no ha recibido la atención suficiente y varios aspectos de los procesos químicos que dan origen a estos compuestos alcaloides siguen sin ser entendidos. Entre los aspectos desconocidos se encuentra la presencia de simbioses involucrados (principalmente de naturaleza bacteriana), los cuales están comúnmente relacionados con las ascidias y de los cuales se desconoce el papel que juegan en el metabolismo secundario; además, el propósito de la producción de estos compuestos por parte de las ascidias en la naturaleza también sigue sin conocerse (Ueki *et al.*, 2018). Estos alcaloides incluyen una gran variedad de estructuras, abarcando desde piridoacridinas, alcaloides derivados de la tirosina y protoalcaloides simples (Menna *et al.* 2011), los ejemplos más relevantes en la literatura se concentraron en la tabla 2.

Los alcaloides del tipo tetrahidroisoquinolina no son comunes en especies de ascidias, los únicos representantes de esta clase son las ecteinascidinas, aislados por primera vez de la ascidia del caribe *Ecteinascidia turbinata*, los cuales son probablemente los agentes anticancerosos más eficientes hasta la fecha encontrados en un organismo marino. Sin lugar a duda, el compuesto líder Yondelis o trabectedina ET-743 fue el primer producto natural marino a la venta en el mercado para el tratamiento de pacientes con sarcoma en tejidos blandos. Además de la actividad biológica, este compuesto demostró tener una estructura molecular extraordinaria, lo que lo convirtió en objetivo clave para la síntesis de químicos orgánicos que permitieron una serie de metodologías sintéticas y semisintéticas para la preparación de una gran variedad de ecteinascidinas. Inicialmente estos alcaloides resultaron tener citotoxicidad contra células leucémicas L1210 ( $CI_{50}$  de  $0.5 \text{ ng mL}^{-1}$ ) y después mostraron un fuerte efecto antitumoral *in vivo* en varios modelos murinos de linfoma P388, melanoma B16, sarcoma de ovario M5076, carcinoma de Lewis, carcinoma de pulmón humano 1X-1 y xenoinjertos de carcinoma mamario humano MX-1. Además de ser aprobado para el tratamiento de sarcoma, la trabectedina está en modificación para el tratamiento de cánceres pediátricos, de ovario, próstata, pulmón y mama (Menna *et al.* 2011).

En la literatura científica los alcaloides son las moléculas más frecuentemente reportadas y su evidencia como agentes citotóxicos es bastante amplia, aunque como anteriormente se mencionó, el origen de estos compuestos es poco conocido. Las evidencias apuntan a que estos compuestos bioactivos son producto de la simbiosis con bacterias, razón por la cual el aislamiento y caracterización de los alcaloides presentes en *D. stylifera* resulta importante, ya que es probable que algunos de los compuestos con mayor actividad citotóxica reportados en este estudio sean de naturaleza alcaloide. Además, estudiar el contenido bacteriano de esta especie y los alcaloides que producen es necesaria para esclarecer su relación y la producción de tales compuestos para su aplicación biotecnológica.

Tabla 2. Tipos de alcaloides con actividad biológica aislados de especies de ascidias (Menna *et al.* 2011).

<b>Tipo</b>	<b>Características</b>	<b>Actividad</b>	<b>Especie</b>	<b>Compuesto</b>
Piridoacridinas	Tetra o pentacíclos aromáticos con base estructural de pirido(k,l)acridina	Citotóxica, antiviral, antifúngica, antibacteriana, antitumoral y antiparasitaria	<i>Aplidium pantherinum</i>	Pantherinina
A base de B-carbolina	Derivados del triptófano	Antitumoral	<i>Eudistoma</i> , <i>Ritterella</i> , <i>Pseudodistoma</i> , <i>Didemnum</i> , <i>Synoicum</i> y <i>Lissoclinum</i>	Fármacos Eneidyne
A base de indol	Derivados del indol	Inhibitoria de varias quinasas, agregaciones plaquetarias y de contracciones del músculo liso, favorecen la detención del ciclo celular, la apoptosis e invierten la resistencia de algunas líneas cancerosas a múltiples fármacos.	Familia Polycitoridae	Indolcarbazoles del tipo de las estaurosporinas
Derivados de la tirosina	Vía para generar dopamina	Citotóxica, inhibidores selectivos de genes de transporte, invierten la resistencia de algunas líneas cancerosas a múltiples fármacos, antibiótica, inmunomoduladora y la antioxidante, además de la inhibición de la integrasa del HIV-1, la cual provee la integración del ADN viral dentro del ADN de la célula hospedera.	<i>Botryllus</i> y <i>Didemnum</i>	Lamelarines y botrylamidas
Tetrahidroisoquinolinas	Primer producto de origen marino a la venta en el mercado para el tratamiento de sarcoma en tejidos blandos	Anticancerosa,	<i>Ecteinascidia turbinata</i>	Ecteinascidinas, Fármaco Yondelis (ET-743)
Derivados de la lisina	Bi y tricíclicos	Inhibitoria del crecimiento de leucemia en modelos murinos y líneas de tumores sólidos humanos (<math> < 9 \mu\text{g mL}^{-1}</math>), antifúngica y antibacteriana contra Gram-positivas.	<i>Pseudodistoma kanoko</i>	Pseudodistomidas
Protoalcaloides	Aminas simples. El nitrógeno no forma parte del anillo heterocíclico	Antibacteriana y citotóxica	<i>Clavelina</i> y <i>Pseudodistoma</i>	2-aminoalkanoles lineares y sus derivados insaturados y/o acetilados
Diméricos esteroidales	Consisten en dos esteroides C27 altamente oxigenados	Potentes inhibidores del crecimiento de células cancerosas (DE <sub>50</sub> = 0.001-0.1 pM)	<i>Ritterella tokioka</i>	Ritterazinas

Los aminoácidos también son un grupo de metabolitos nitrogenados documentados ampliamente en la literatura, al igual que en los alcaloides, la citotoxicidad es una de las propiedades que más se le atribuyen a este tipo de compuestos. Al ser un grupo bastante diverso, la tendencia indica que los péptidos conformados por no más de una docena de aminoácidos han resultado ser los más bioactivos. En la tabla 3 se presentan algunos de los más sobresalientes en la literatura, donde la evaluación de la citotoxicidad de cada uno de los metabolitos se llevó a cabo *in vitro*, lo que nos permite comparar la mayor citotoxicidad obtenida en este trabajo mostrada por la fracción F10 alcanzando una  $CI_{50}$  de  $48.8 \mu\text{g mL}^{-1}$  a las 72 horas en evaluación (Fig. 9). En dicha tabla se aprecia una escala de concentraciones de citotoxicidad desde los  $0.99\text{-}1.7 \text{ ng mL}^{-1}$  hasta los  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; es relevante señalar que los compuestos que en la fracción 10 aún no están purificados, por lo que es probable que esta actividad pueda mejorar si se lleva a cabo un proceso de purificación. Además, los compuestos que muestran una mayor actividad a concentraciones tan bajas de nanogramos por mililitro han resultado ser muy potentes, sin embargo, su selectividad contra ciertas células es mínima. En contraste, otros compuestos del tipo bistratamidas cuya actividad es moderada, su selectividad contra las células cancerosas resulta muy efectiva (Degnan *et al.* 1987), característica clave para el avance en las fases clínicas. Es probable que los compuestos presentes en la fracción F10 al mostrar una actividad moderada puedan mostrar una selectividad contra la línea K-562, característica que resulta importante evaluar para esclarecer el potencial de estos.

Franchi y Ballarin (2017), mencionan que las ascidias producen moléculas con actividad antibacteriana que en su mayoría son péptidos sintetizados por los hemocitos. En la especie *H. roretzi*, las halociaminas A y B producidas por hemocitos han demostrado tener actividad citotóxica relacionada principalmente con la presencia de anillos de difenol. Arizza *et al.* (2011) y Parimello *et al.* (2001), demostraron que los hemocitos de ascidias *Ciona intestinalis*, *S. plicata* y *Botryllus schlosseri* ejercen actividad citotóxica contra la línea K-562, además de observar que los compuestos responsables probablemente son lisinas, polifenoles y quinonas, los cuales se observaron tanto en el contenido de estas células como también liberados en medios

de cultivos para propiciar la lisis de las células objetivo. Estos reportes al ser los únicos donde se encontró evidencia citotóxica contra la misma línea celular empleada en este proyecto, abren a discusión el origen de los metabolitos identificados en *D. stylifera*, puesto que existe la probabilidad de que estos sean parte del contenido peptídico de los hemocitos. El estudio en particular de estas células inmunológicas podría ayudarnos a conocer qué tipo de estrategia utilizan para llevar a cabo la defensa contra material ajeno y las moléculas que sintetizan.

Tabla 3. Aminoácidos citotóxicos aislados de ascidias

<b>Aminoácido</b>	<b>Citotoxicidad</b>	<b>Línea</b>	<b>Enfermedad</b>	<b>Especie</b>	<b>Referencia</b>
Tamandarinas A y B (depsipéptidos)	CI <sub>50</sub> = 1.79 ng mL <sup>-1</sup> CI <sub>50</sub> = 0.99 ng mL <sup>-1</sup>	BX-PC3 DU145 UMSCC10b	Carcinoma de páncreas Carcinoma de próstata Carcinoma de cabeza y cuello	Género <i>Didemnum</i>	Vervoort y Fenical, 2000
Apliamidas A – E y Apliamina A	CI <sub>50</sub> = 8.3-22.8 μM CI <sub>50</sub> = 7.8-22.8 μM	K-562 A549	Leucemia mieloide crónica Tumor de pulmón humano	<i>Aplidium sp.</i>	Hyung <i>et al.</i> 2015
Comoramidas A y B (hexapéptidos) Mayotamidas A y B (heptapéptidos)	CI <sub>50</sub> = 5-10 μg mL <sup>-1</sup>	A549 HT29 y MEL-28	Carcinoma de pulmón humano Adenocarcinoma colorectal Melanoma	<i>Didemnum molle</i>	Rudi <i>et al.</i> 1998
5 péptidos sin nombrar	CI <sub>100</sub> = 10 μg mL <sup>-1</sup> CI <sub>80</sub> = 10 μg mL <sup>-1</sup>	HeLa P-388	Cáncer cérvico uterino Linfoma murino	<i>Leptoclinides dubius</i>	García <i>et al.</i> 1996
Bistratamida A y B (hexapéptidos cíclicos)	CI <sub>50</sub> = 50 μg mL <sup>-1</sup> Actividad selectiva	T24	Carcinoma de vejiga humana	<i>Lissoclinum bistratum</i>	Degnan <i>et al.</i> 1987
<b>Fracción F10</b>	<b>CI<sub>50</sub> = 48,8 μg mL<sup>-1</sup></b>	<b>K-562</b>	<b>Leucemia mieloide crónica</b>	<b><i>Distaplia stylifera</i></b>	<b>En este estudio</b>

### Actividad citotóxica contra leucemia mieloide crónica (K-562)

Todas las muestras seleccionadas por su toxicidad contra *A. franciscana* también resultaron activas contra la línea leucémica K-562 a 24, 48 y 72 h. Como se planteó en la hipótesis de este proyecto, *D. stylifera* contiene compuestos citotóxicos al igual que otras especies de ascidias emparentadas taxonómicamente. Además, estos mostraron una tendencia a mejorar su eficacia conforme avanzó el tiempo en evaluación, ya que se necesita una menor concentración de las fracciones para efectuar la citotoxicidad del 50% de las células en un lapso mayor a 24 h. La actividad se observó en la disminución del MTT metabolizado a formazan por las células viables, y que fue cuantificado con el espectrofotómetro.

Las fracciones más activas fueron la F7, F1 y F10, alcanzando una mayor citotoxicidad a las 72 h de evaluación. Específicamente la fracción F10 mostró el mejor resultado en  $CI_{50}$  con un valor de  $48.8 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 9).

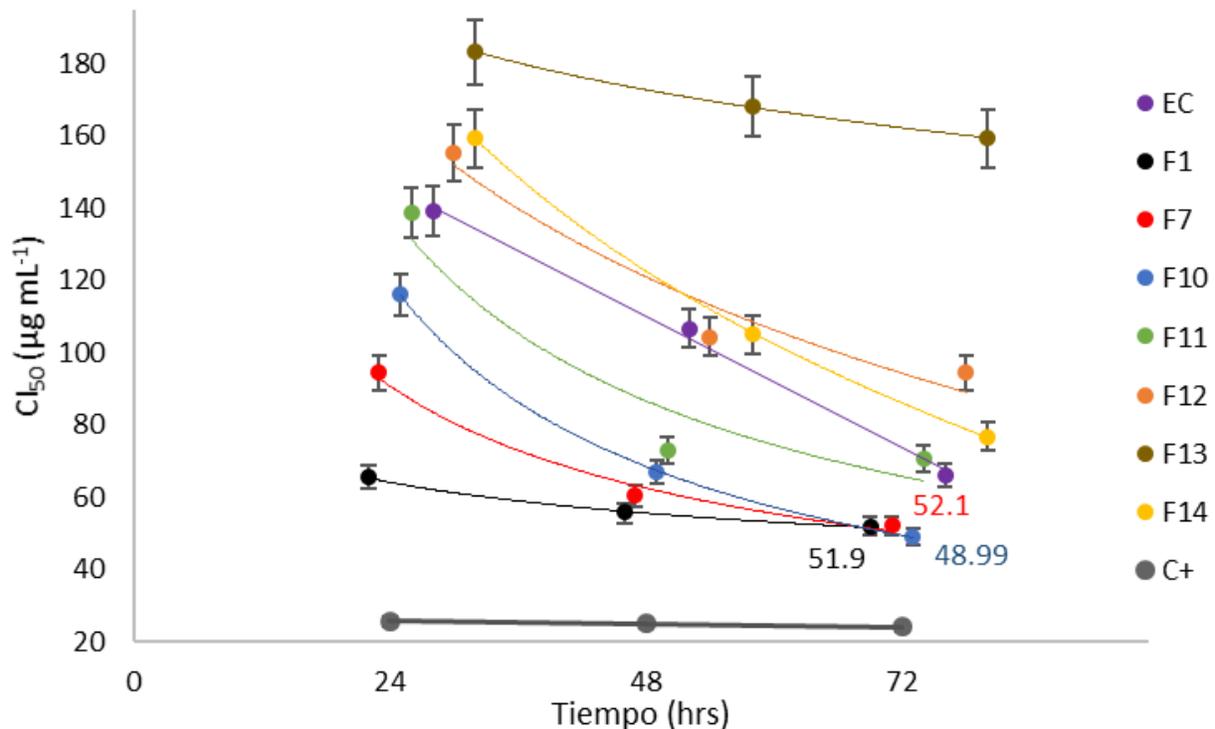


Figura 9. Citotoxicidad contra K-562 de las fracciones F1, F7, F10 a F14 y EC de *Distaplia stylifera*. n=3

Algunas  $CI_{50}$  de compuestos citotóxicos extraídos de ascidias han sido aprobados en el mercado (ecteinascidina y aplidina); el resto se halla actualmente en investigación preclínicas y clínicas para el tratamiento de diversos tipos de cáncer. En la tabla 4 es posible observar una escala de concentraciones de citotoxicidad, la cual toma valores desde los 0.2-0.5 hasta los  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Buss y Butler, 2010); en comparación con la mayor citotoxicidad obtenida por la fracción F10 ( $48.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), esta puede resultar poco potente, sin embargo, los compuestos que se encuentran en esta fracción aún no están purificados, por lo que es probable que esta actividad pueda mejorar.

Esta comparación entre diferentes compuestos puede resultar arbitraria, puesto que cada compuesto tiene un mecanismo de acción específico y actúa de una manera diferente dependiendo de las características de cada línea celular evaluada.

Tabla 4. Compuestos aislados de ascidias aprobados y en fases clínicas para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.

<b>Compuesto</b>	<b><math>CI_{50}</math></b>	<b>Línea</b>	<b>Enfermedad</b>	<b>Especie</b>	<b>Fase clínica</b>
Ecteinascidina 743	$<1 \mu\text{g mL}^{-1}$	Varias	Sarcoma en tejidos blandos Cáncer de Ovario	<i>Ecteinascidia turbinata</i>	Aprobado
Aplidin (Deshidrodidemnina B)	$0.2-0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$	Varias	Mieloma múltiple	<i>Aplidium albicans</i>	Aprobado
Ascididemina	$0.39 \mu\text{g mL}^{-1}$	L1210	Leucemia murina	<i>Didemnum sp.</i> <i>Eudistoma sp.</i>	Preclínico
Vitilevuamida	$2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$	C6	Glioblastoma murino	<i>Didemnum cuculiferum</i>	Preclínico
Didemnina B	$11 \mu\text{g mL}^{-1}$	L1210	Leucemia murina	<i>Trididemnum sp.</i>	Preclínico
Diazonamida A	$15 \mu\text{g mL}^{-1}$	HCT-116	Cáncer de Colon	<i>Diazona angulata</i>	III: Comparación con el tratamiento convencional
<b>Fracción 10</b>	<b><math>48,8 \mu\text{g mL}^{-1}</math></b>	<b>K-562</b>	<b>Leucemia mieloide crónica</b>	<b><i>Distaplia stylifera</i></b>	<b>En este estudio</b>

Fuente: Buss & Butler, 2010

### Identificación de didemninas por medio de factores de retención

Se respalda la hipótesis de este estudio al encontrar que los compuestos citotóxicos son las didemninas A, B, C y E presentes en las fracciones más activas F1, F7 y F10, o al menos bastante similares a estos, debido a que los FR's obtenidos en cromatografía en capa fina (0.49, 0.62, 0.68 y 0.17 respectivamente) son muy similares a los registrados en la literatura (Wagman & Cooper, 1988).

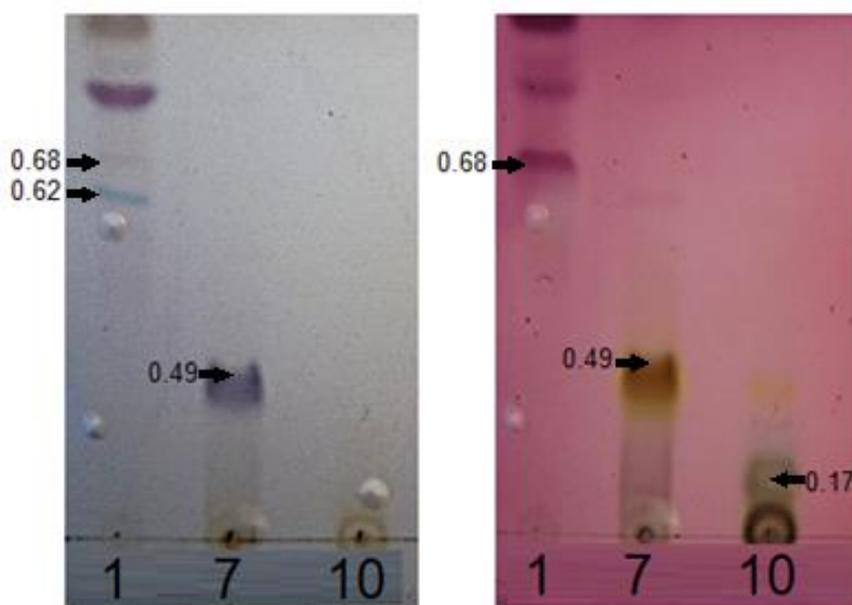


Figura 10. Didemninas identificadas en las fracciones F1, F7 y F10 de *Distaplia stylifera* mediante el cálculo de FR en CCF fase normal (DCM-MeOH 9:1) y reveladas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% en agua con vainillina.

Los compuestos presentes en las fracciones más activas en el ensayo de citotoxicidad que fueron re-extraídos y semipurificados en las fracciones DiSt1, DiSt2 y DiSt5 también fueron identificados como las didemnina A (0.49) presente en las fracciones DiSt1 y DiSt2, la didemnina E (0.17) en la DiSt2 y las didemninas C (0.69) y D (0.05) presentes en la fracción DiSt2 y DiSt5. La didemnina D no había sido observada anteriormente y la didemnina B identificada en las fracciones anteriores no se observó en las fracciones re-extraídas (Fig. 11).

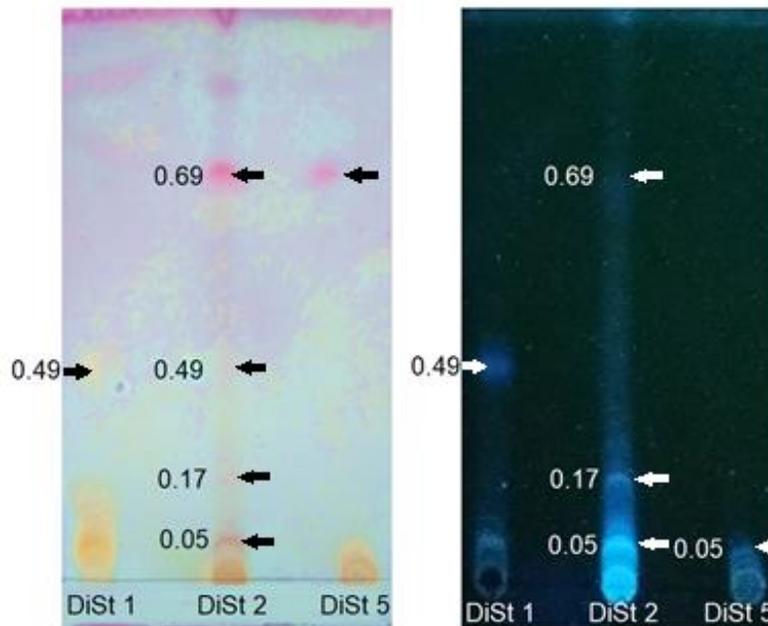


Figura 11. Didemninas identificadas en las fracciones re-extraídas DiSt1, DiSt2 y DiSt3 de *Distaplia stylifera* mediante el cálculo de FR en CCF fase normal (DCM-MeOH 9:1) y reveladas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% en agua con vainillina. Izquierda: a simple vista, Derecha: vista con UV a 365 nm.

### *Identificación de los compuestos activos*

En las fracciones DiSt1, DiSt2 y DiSt5 purificadas mediante HPLC y analizadas mediante espectrometría de masas se encontró evidencia que da mayor respaldo a la hipótesis propuesta en este estudio; la presencia de dos aductos calculados previamente para la didemnina A en las fracciones DiSt1 y DiSt2 en el tiempo de retención 6.0. Estos aductos corresponden a aquellos conformados por la molécula original del compuesto y los iones  $[M+2H]^{2+}$  y  $[M+Na]^+$ , sumando una  $m/z$  de 472.2908 y 965.5504 respectivamente. La masa del aducto formado con el ion de sodio es prácticamente la masa de la didemnina A reportada en literatura más la masa de la molécula del sodio (PubChem, 2019). Además, la fórmula química de este compuesto obtenida con base a su peso molecular fue C<sub>49</sub>H<sub>72</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub>Na, la cual corresponde a la fórmula química de la didemnina A más la molécula de sodio que se une para conformar el aducto. Este compuesto identificado por medio de factores de retención y espectrometría de masas debe ser purificado y elucidado estructuralmente por medio

de RMN para que la presencia de este sea confirmada. Sin embargo, las evidencias mostradas en este trabajo son suficientes para atribuir la actividad citotóxica a la didemnina A (Fig. 12) presente en la fracción F10 evaluada contra la línea celular y que resultó ser la más potente. De igual manera, la purificación de este compuesto es necesaria para su futura evaluación citotóxica y específicamente para confirmar su actividad contra la línea leucémica K-562.

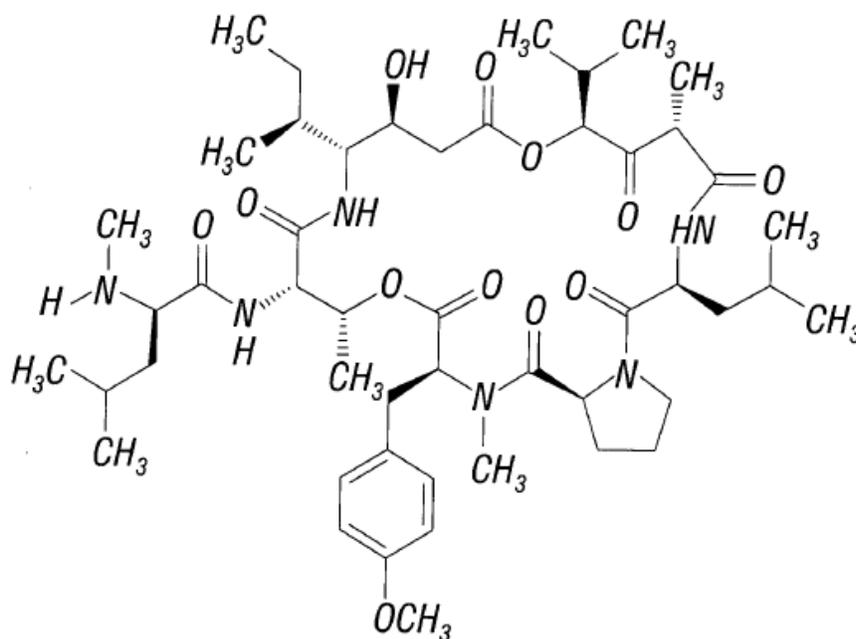


Figura 12. Estructura química de la didemnina A. Tomada de Qian *et al.* (2014).

Como complemento a esta actividad, Rinehart *et al.* (1980) descubrieron una nueva clase de depsipéptidos dentro de la familia de ascidias Didemnidae; entre estos compuestos, la didemnina A mostró actividad inhibitoria del virus Coxsackie responsable de varias enfermedades, del rinovirus equino y de *H. simplex* tipo 1 y 2. Investigaciones posteriores demostraron la selectividad de este compuesto debido a que inhibía los virus del herpes sin afectar las células infectadas por el mismo, además de mostrar una potente actividad antitumoral contra la línea L1210 de leucemia murina. Sin embargo, debido a la escasez de la muestra este compuesto no pudo ser evaluado para determinar las dosis optimas de actividad antitumoral en un modelo *in vivo*. Al seguir analizando este grupo de compuestos aislando más cantidad de compuesto a

partir de la ascidia *Trididemnum solidum* se determinó que las didemninas B y C son simples derivados de la didemnina A, y que la actividad biológica puede ser drásticamente alterada con ligeros cambios químicos, principalmente en la cadena lateral de aminoácidos que define cada una de las didemninas, lo cual resultaría importante para el desarrollo de un agente terapéutico útil (Rinehart *et al.*, 1981). La didemnina B, por ejemplo, tiene atribuidas una mayor cantidad de actividades biológicas y por lo general es más potente comparándola con la didemnina A, por lo que continuaron las evaluaciones de la didemnina B en el Instituto Nacional del Cáncer de los EUA. Lamentablemente los estudios de toxicidad en ratones, ratas y perros mostraron dosis de toxicidad poco favorables y en la fase clínica I de prueba en humanos se observaron efectos secundarios como náuseas severas y la reducción del funcionamiento del hígado, por lo que los tratamientos e investigaciones fueron descartados (Rinehart *et al.*, 1988). Considerando que a partir de 100 g de extracto de *D. stylifera* se obtuvieron alrededor de 50 mg de didemnina A con un cierto grado de pureza, resulta importante estimar los rendimientos que se podrían obtener de este recurso marino para fomentar futuras investigaciones y el manejo adecuado del mismo.

Aunque en literatura se menciona que ambos compuestos didemnina A y B presentan mecanismos de acción similares inhibiendo la síntesis de ADN o proteínas en una cantidad significativamente mayor que la inhibición de ARN, estos procesos no se han esclarecido especialmente para la didemnina A (Li *et al.*, 1984). Se conoce que la naturaleza rígida del macrociclo de las didemninas es modificada cuando se unen macromoléculas en la cadena de aminoácidos lateral; esta rigidez se ha observado en el enlace que conforma la didemnina A con un simple protón de hidrógeno, lo cual la hace significativamente más rígida a comparación de la didemnina B que resulta ser más flexible; esta característica es uno de los factores por el que la didemnina B es un agente más activo y potente. Al ser compuestos muy similares se podría suponer que los mecanismos de acción comparten esta misma característica, sin embargo, de acuerdo con la literatura esto no es así (Bilayet *et al.* 1996), y aunque el mecanismo de acción de la didemnina B y su derivado deshidrodidemnina B (Aplidina) ya están

descritos a detalle (PharmaMar, 2019), resultaría erróneo inducir un posible mecanismo de acción de la didemnina A, a partir de sus derivados.

Respecto a los mecanismos de acción citotóxicos llevados a cabo por péptidos marino se conocen los que involucran el proceso apoptótico, los que afectan el equilibrio entre la tubulina y los microtúbulos celulares y los que inhiben la angiogénesis (Zheng *et al.*, 2011). Aunque estas clasificaciones resultan ser generalizadas, resulta importante conocerlas para enfocar futuras investigaciones que tengan como objetivo determinar el mecanismo preciso por el cual se lleva el proceso de citotoxicidad. En la tabla 5 se presentan algunos mecanismos de acción determinados en péptidos extraídos a partir de ascidias; en ella destacan los mecanismos de acción mediante la inhibición de los procesos entre la tubulina y los microtúbulos y la estimulación de la apoptosis, aunque este último es poco conocido.

Tabla 5. Mecanismos de acción de péptidos aislados de ascidias.

<b>Péptido</b>	<b>Tipo</b>	<b>Especie</b>	<b>Mecanismo de acción</b>
Cycloxazolina	Depsipéptido	<i>Lissoclinum bistratum</i>	Apoptosis, pero no esclarecido
Aplidin (Deshidrodidemnina B)	Depsipéptido	<i>Aplidium albicans</i>	Activación de la fosforilación de las quinasas JNK y p38 MAPK
Virenamidas A-C	Tripéptidos lineales	<i>Diplosoma virens</i>	Apoptosis, pero no esclarecido
Vitilevuamida	Bicíclico	<i>Didemnum cuculiferum</i> y <i>Polysyncranton lithostrotum</i>	Inhibición de la polimerización de la tubulina
Didemnina B	Depsipéptido	<i>Trididemnun solidum</i>	Apoptosis, pero no esclarecido
Diazonomida	Macrocíclico	<i>Diazona angulata</i>	Inhibición de la polimerización de la tubulina

Fuente: Zheng *et al.*, 2011

En relación con los compuestos presentes en la fracción DiSt 5 que no coincidieron con ninguna de las didemninas buscadas, estos fueron fraccionados en HPLC a un TR de 0.39 y 1.21 y m/z de 279.1552 y 166.0863 respectivamente. Además, el espectrómetro confirma la presencia de moléculas de nitrógeno en ambos compuestos y del segundo de ellos se obtuvo la fórmula química de C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>2</sub>. Es probable que estos compuestos al parecer mayoritarios en algunas de las fracciones

más activas sean de naturaleza alcaloide; como se mencionó anteriormente la amplia evidencia en literatura y el potencial biológico de este grupo de metabolitos nitrogenados hacen del mismo un tópico de investigación digno de exploración, debido a su alto potencial biotecnológico y su probable abundancia en *D. stylifera*.

La posible presencia de la didemnina C (FR=0.68) en la fracción DiSt5 fue la razón de su selección para analizarla mediante espectrometría de masas, debido a que este compuesto estuvo presente en una de las fracciones más activa y resultó re-extraído aparentemente con una purificación mayor en esta fracción. Sin embargo, al no obtener evidencia de la didemnina C en ninguna de las muestras analizadas en espectrometría, podemos pensar que los compuestos en la fracción DiSt5 son la didemnina E no observada en las fracciones evaluadas, o uno muy similar a la didemnina C. La purificación y elucidación estructural de este compuesto es necesaria para determinar de qué tipo de didemnina se trata.

## 8. Conclusión

La información obtenida en este estudio nos indica que los metabolitos secundarios extraídos de ascidia colonial *Distaplia stylifera* responsables de la actividad citotóxica moderada contra la línea K-562, son péptidos con estructuras moleculares que los definen dentro de las didemninas, grupo reportado ampliamente en varias especies de ascidias. Aunque la evidencia más contundente fue la identificación de la didemnina A en las fracciones con mayor actividad citotóxica, no se descarta la presencia de otros compuestos similares que probablemente aún no se han reportado. La purificación y el análisis de este compuesto y los que no fueron identificados, mediante resonancia magnética nuclear son necesarios para contrastar de una manera más rigurosa la hipótesis propuesta y de esta manera confirmar la presencia del compuesto identificado y la descripción de aquellos que aún no cuentan con reportes en la literatura.

Debido al enfoque de este estudio, los resultados obtenidos representan información contundente para continuar con la evaluación de la molécula identificada y/o similares, y determinar el potencial anticanceroso contra la línea K-562 u otras líneas tumorales que representen un problema de investigación de interés nacional o internacional.

Este proyecto implica el primer reporte por parte de investigaciones mexicanas de metabolitos citotóxicos extraídos a partir de una especie de ascidia, donde la actividad anticancerosa de las didemninas aisladas a partir de *D. stylifera* contra la línea K-562 propone nuevos agentes con potencial farmacológico y promueve su futura evaluación con la perspectiva de alcanzar su aplicación a nivel médico.

## 9. Recomendaciones

Dependiendo del enfoque de interés, el alcance de la nueva información generada en este estudio y su uso como premisa en futuras investigaciones es bastante amplio.

Debido a la importancia que tiene la presencia de metabolitos citotóxicos en esta especie de ascidia, se recomienda generar nuevas preguntas de investigación relacionadas con: 1) la ecología del organismo y su impacto socioeconómico en los maricultivos de la región, 2) el esclarecimiento del sistema inmune que presenta la especie y su relación con su éxito reproductivo para poder colonizar ambientes completamente diferentes al de su origen, y 3) con el manejo adecuado y su aprovechamiento con el propósito de obtener beneficios y minimizar el impacto.

Puntualmente, resulta importante conocer el origen biosintético de los metabolitos en la especie y el grupo de las ascidias, con el fin de esclarecer la función que tienen en cuestiones ecológicas y evolutivas. Debido a la repercusión que causa *D. stylifera* en varias industrias como la naviera y maricultivos al incrustarse en plataformas que son utilizadas en estas actividades, ha causado un interés en investigadores y empresas para manejar este recurso de una manera adecuada y minimizar el impacto económico que genera en La Paz, BCS. Partiendo de esto, la generación de conocimiento respecto a las interacciones ecológicas de esta ascidia con organismos de interés comercial es importantes para buscar solucionar las problemáticas actuales. Tal es el caso de la infestación de *D. stylifera* en los maricultivos de hachas *Atrina spp.*, lo cual ha generado pérdidas económicas en varias empresas por alrededor de una década. Aunque los estudios actuales se han visto limitados principalmente por la identificación taxonómica de *D. stylifera* y otras ascidias presentes en la región, es importante continuar con los esfuerzos de investigación para determinar las interacciones ecológicas que genera esta especie reconocida como “invasora” especialmente con las hachas. Aunque el impacto hacia los maricultivos se ha visto de manera negativa, es necesario conocer si la interacción ascidia-bivalvo es de tipo parasitaria o contrariamente esto genere beneficios mutuos para ambos organismos; de esta manera se puede proponer un manejo adecuado y justificar

investigaciones que tengan como propósito la explotación biotecnológica de este recurso marino que resulta bastante abundante al menos para esta región geográfica.

En cuestiones evolutivas, las ascidias como cordados primitivos son un excelente grupo taxonómico para la investigación del origen y evolución del sistema inmune de los vertebrados. Aunque se ha determinado que estos organismos tienen únicamente inmunidad innata que carece de recombinación somática y memoria inmune a largo plazo, estos representan modelos de estudio para determinar los eventos de evolución que ocurrieron en la transición de organismos invertebrados a vertebrados, destacándose por el surgimiento de los linfocitos y la diversificación de los receptores hacia una recombinación somática (Guerrero-Arenas & González-Rodríguez, 2011; Franchi & Ballarin, 2017). Además, aunque en la actualidad se carece de evidencias contundentes sobre la evolución de este grupo taxonómico aparte del registro fósil y características taxonómicas, la investigación sobre los hemocitos contribuirá a esclarecer los aspectos sin resolver respecto a la ontogenia y las vías de diferenciación de tales células, y de esta manera entender mejor la biología del sistema inmune de las ascidias y su papel en el origen y evolución de todos los cordados superiores (Franchi & Ballarin, 2017).

Por último, como se mencionó, el contenido bacteriano en simbiosis con las ascidias es clave para entender la naturaleza de los metabolitos citotóxicos producidos. Por lo que se recomienda analizar el contenido bacteriano de *D. stylifera* y la producción de metabolitos bioactivos por parte de las cepas cultivables. Además de enfocar la evaluación a los compuestos de naturaleza alcaloide, debido a que, de acuerdo con la literatura, son los que han demostrado un mayor potencial citotóxico y selectivo (Menna *et al.*, 2011), características necesarias para ser candidatos a evaluación en fases clínicas avanzadas. No sin dejar de lado la importancia que tiene el generar conocimiento respecto a la simbiosis ascidia-bacterias en el esclarecimiento de la ecología química del grupo taxonómico de las ascidias.

## 10. Literatura Citada

- Aiello A., E. Fattorusso, C. Imperatore, C. Irace, P. Luciano, M. Menna, R. Santamarina & R. Vitalone. 2011. Zorrimidazolone, a Bioactive Alkaloid from the Non-Indigenous Mediterranean Stolidobranch *Polyandrocarpa zorritensis*. *Marine Drugs*, 9: 1157-1165.
- Anderson, J., C. Goetz & J. McLaughlin. 1991. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical analysis*, 2: 107-111.
- Appleton, D., C. Chuen & M. Berridge. 2009. Rossinones A and B from the antarctic ascidian *Aplidium* species. *J. Org. Chem*, 74: 9194-9198.
- Ara, J., V. Sultana & R. Qasim. 1999. Cytotoxic activity of marine macro-algae on *Artemia salina* (Brine shrimp). *Phytotherapy Research*, 13: 304-307.
- Arizza, V., D. Parrinello & M. Cammarata. 2011. A lytic mechanism base on soluble lectins is exerted by *Ciona intestinalis* hemocytes gainst K562 cell line. *Fish & Shellfish Immunology*, 30: 1014-1023.
- Arumugam, V., M. Venkatesan, & K. Sengodan. 2018. Tunicates as a biocontrol tool for larvicides acute toxicity of Zica virus vector *Aedes aegypti*. *Environmental Sciences*, 14: 1-11.
- ATCC, 2018 <<https://www.atcc.org/products/all/CCL-243.aspx#culturemethod>>  
Consulta: septiembre, 2018.
- Baslow, H. 1977. *Marine Pharmacology*. Ed. Robert E. Krieger Publishing Company. USA. 327p.
- Bilayet, M., D. Helm & J. Antel. 1996. Crystal and molecular structure of didemnina A, and antiviral depsipeptide. *International Journal of Peptide & Protein Research*, 47: 20-27.
- Buss, A. & M. Butler. 2010. *Natural product chemistry for drug discovery*. Royal Society of Chemistry. UK. 440p.

- Carrol, A., B. Nash, S. Duffy & M. Avery. 2012. Albopunctatone, an antiplasmodial anthrone-anthraquinone from the Australian ascidian *Didemnum albopunctatum*. *Journal of Natural Products*, 75: 1206-1209.
- Cepleanu, F., M. Hamburger, B. Sordat, J. Msonthi, M. Gupta, M. Saadou & K. Hostettmann. 1994. *Int. J. Pharmacog*, 32: 294-307.
- Chan, S., A. Norrie & A. Januario. 2011. Anti-inflammatory and antimalarial meroterpenoids from the New Zealand ascidian *Aplidium scabellum*. *The Journal of Organic Chemistry*, 76: 9151-9156.
- Curtis, H. & A. Schnek. 2006. *Invitación a la biología*. Ed. Médica Panamericana. Argentina. 768 p.
- Degnan, B., C. Hawkins & M. Lavin. 1987. Novel cytotoxic compounds from the ascidian *Lissoclinum bistratum*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 32: 1354-1356.
- Denizot, F. & R. Lang. 1986. Rapid colorimetric assays for cell growth and survival. *J. Immunol Methods*, 89: 271-277.
- Dunn, W., W. Carrier & J. Regan. 1982. Effects of an extract from the sea squirt *Ecteinascidia turbinata* on DNA synthesis and excision repair in human fibroblast. *Toxicol*, 20: 703-708.
- Franchi, N. & L. Ballarin. 2017. Immunity in protochordates: The tunicate perspective. *Frontiers in Immunology*, 8: 674.
- García, A., M. Vázquez & E. Quiñoa. 1996. New amino acid derivatives from the marine ascidian *Leptoclinides dubius*. *J. Nat. Prod*, 59: 782-785.
- Garrido, L., E. Zubia, M. Ortega & J. Salvá. 2002. New meroterpenoids from the ascidian *Aplidium conicum*. *J. Nat. Prod*, 65: 1328-1331.
- GBIF, 2018 <<https://www.gbif.org/species/2331279>> Consulta: diciembre, 2018.
- Guerrero-Arenas, R. & K. A. González-Rodríguez. 2011. Algunas consideraciones sobre el origen y evolución de los cordados. *Ciencia Ergo Sum*, 19: 34-42.
- Hernández, D., E. Sánchez & E. Márquez. 2013. Combatiendo el cáncer con productos de origen marino. *Revista Digital Universitaria*, 14: 1-9.
- Hira, A., V. Sultana, J. Ara & S. Haque. 2010. *In vitro* cytotoxicity of seaweed from Karachi coasts on brine shrimp. *Pak. J. Bot*, 42: 3555-3560.

- Hochster, H., R. Oratz, D. Ettinger, & E. Borden. 1990. A phase II study of Didemnin B (NSC 325319) in advanced malignant melanoma: An Eastern cooperative oncology group study (PB687). *Investigational New Drugs*, 16: 259-263.
- Hyung, T., K. Chang-Kwon & L. So-Hyoung. 2015. Amino acid-derives metabolites from the ascidian *Aplidium* sp. *Marine Drugs*, 13: 3836-3848.
- Khandelwal, K. 2008. *Practical pharmacognosy*. Ed. Nirali Prakashan. India. 223p.
- Kokate, C. 2014. *Practical pharmacognosy*. Ed. Delhi. India. 222p.
- Kurniatanty, I., M. Tan, T. Ruml & S. Sumarsono. 2015. Potential cell proliferation inhibitor isolated from Indonesian brown algae. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7: 140-143.
- Laali, J., L. Nisha. & P. Tav. 2013. Effect of two seaweed *Chaetomorpha antennina* (Bory de Saint-Vincent) Kutzing and *Sargassum wightii* Greville as larvicida against mosquito vector *Culex quinquefasciatus*. *International Journal Of Biology, Pharmacy And Allied Sciences*. 2013: 705-711.
- Li, L., L. Timmins & T. Wallace. 1984. Mechanism of action of didemnin B, a depsipeptide from the sea. *Cancer Letters*, 23: 279-288.
- Lindquist, N. & M. Hay. 1992. Defense of ascidians and their conspicuous larvae: Adult vs Larval chemical defenses. *Ecological Monographs*, 64:547-568.
- Martínez-García, M., A. Díaz-Valdez, N. Ramos-Espla, P. Salvador, E. López & J. Anton. 2007. Cytotoxicity of the Ascidian *Cystodytes dellechiajei* Against Tumor Cells and Study of the Involvement of Associated Microbiota in the Production of Cytotoxic Compounds. *Marine Drugs*, 5: 52-70.
- McLaughlin, J. & L. Lingling. 1998. The use of of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*, 32: 513-524.
- Mendoza, N. 2008. *Farmacología médica*. Ed. Médica Panamericana. México. 1000p.
- Menna, M., E. Fattorusso & C. Imperatore. 2011. Alkaloids from marine ascidians. *Molecules*, 16: 8694-8732.
- Miljanich, G. P. 2004. Ziconotide, neural calcium channel blocker for treating severe chronic pain. *Current Medicinal Chemistry*, 11: 3029-3040.

- Moreno, B. 2013. Taxonomía y biogeografía de ascidias (Tunicata: Ascidae) asociadas a mantos de rodolitos y bosques de sargazo en el Noroeste de Pacífico Mexicano. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S. 212p.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol Methods*, 65: 55-63.
- Murugan, A. & M. Ramasamy. 2003. Biofouling deterrent activity of the natural product from ascidian *Distaplia nathensis*. *Indian Journal of Marine Sciences*, 32: 162-164.
- Name, W. 1945. *The north and southern American ascidians*. Bulletin of the American museum of natural history. USA. 520 p.
- Newman, D. & G. Cragg. 2014. Marine-sourced anti-cancer and cancer pain control agents in clinical and late preclinical development. *Mar. Drugs*, 12: 255-278.
- Núñez-Pons, L., M. Carbone, J. Vázquez, J. Rodríguez, R. Nieto, M. Varela, M. Gavagnin & C. Avila. 2012. Natural Products from Antarctic Colonial Ascidians of the Genera *Aplidium* and *Synoicum*: Variability and Defensive Role. *Marine Drugs*, 10: 1741-1764.
- Ogi, T., P. Margiastuti, Y. Teruya, J. Taira, K. Suenaga & K. Ueda. 2009. Isolation of C11 Cyclopentenones from Two Didemnid Species *Lissoclinum* sp. and *Diplosoma* sp. *Marine Drugs*, 7: 816-832.
- Olezek, W. & Z. Bialy. 2006. Chromatographic determination of plant saponins. *Journal of Chromatography*, 1112: 78-91.
- Packiam, C., R. Margret & V. Meenakshi. 2015. Spectrophotometric studies of a simple ascidian *Ascidia sydneiensis*. *Acta Chimica & Pharmaceutica Indica*, 5: 68-72.
- Palomino-Álvarez, L., R. Moreira & N. Simoes. 2019. Checklist of ascidians (Chordata, Tunicata) from the southern Gulf of Mexico. *ZooKeys*, 832: 1-33.
- Parimello, N., M. Cammarata & M. Vazzana. 2001. Immunological activity of ascidian hemocytes. *Animal Biology*, 26: 395-401.

- Peteros, N. & M. Uy. 2010. Antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of four Philippine medicinal plants. *Journal Of Medicinal Plants Research*, 4: 407-414.
- PharmaMar, 2016  
<[https://www.pharmamar.com/wpcontent/uploads/2017/10/NdP\\_Aplidin-dossier-de-registro-Suiza.pdf](https://www.pharmamar.com/wpcontent/uploads/2017/10/NdP_Aplidin-dossier-de-registro-Suiza.pdf)> Consulta: octubre, 2017.
- PharmaMar, 2019 <<http://pharmamar.com/sobre-pharmamar/>> Consulta: abril, 2019.
- PubChem, 2019 <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Didemnin-A>> Consulta: mayo, 2019.
- Qian, P., Y. Xu, & P. Lai. 2014. Didemnin biosynthetic gene cluster in *Tistrella mobilis*. *Patent Application Publication*, 14: 1-16.
- Ramírez, S. 2018. Impactos económicos de la presencia del tunicado en la pesquería de callo de hacha en la Ensenada de La Paz durante la temporada de pesca 2018. *Gef Invasoras*, 1: 1-20.
- Rinehart, K. 1989. Biologically active marine natural products. *Pure & Appl. Chem.* 61: 525-528.
- Rinehart, K. 2000. Antitumor compounds from tunicates. *John Wiley & Sons, Inc.* 12: 1-27.
- Rinehart, K., J. Gloer & C. Cook. 1980. Structures of the Didemnins, antiviral a citotoxic depsipeptides from a Caribbean tunicate. *J. Am. Chem. Soc.* 103: 1857-1859.
- Rinehart, K., J. Gloer, R. Hughes, H. Renis, P. McGovren, E. Swynenberg, D. Stringfellow, S. Kuentzel & L. Li. 1981. Didemnins: Antiviral and antitumor depsipeptides from a Caribbean tunicate. *Science*. 212: 933-935.
- Rinehart, K., R. Sakai, T. Holt, N. Fregeau, T. Perun, D. Seigler, G. Wilson & L. Shield. 1990. Biologically active natural products. *Pure & Appl. Chem*, 62: 1277-1280.
- Rinehart, K., V. Kishore, K. Bible & R. Sakai. 1988. Didemnins and tunichlorin: novel natural products from the marine tunicate *Trididemnum solidum*. *Journal of Natural Products*, 51: 1-21.

- Rudi, A., M. Akin, & E. Gaydou. 1988. Four new cytotoxic cyclic hexa- and heptapeptides from the marine ascidian *Didemnum molle*. *Tetrahedron*, 54: 13203-13210.
- Ruíz, M., P. Silva & A. Laciár. 2009. Comparison of microplate, agar drop and well diffusion plate methods for evaluating hemolytic activity of *Listeria monocytogenes*. *African Journal of Microbiology Research*, 3: 319-324.
- Sakai, R., K. Rinehart, K. Guan & A. Wang. 1992. Additional antitumor ecteinascidins from Caribbean tunicate: Crystal structures and activities in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 89: 11456-11460.
- Sankaravadivu, S., H. Kohila & D. Shanmuga. 2017. Estimation of heavy metals and chemical constituents in a colonial ascidian *Didemnum psammathodes*. *International Journal of Science, Engineering and Management*, 2: 17-21.
- Sankaravadivu, S., R. Jothibai & V. Meenakshi. 2013. Spectrophotometric studies of a colonial ascidian *Ecteinascidian venue*, 3: 159-163.
- Schwartzmann, G., A. da Rocha, R. Berlinck & J. Jimeno. 2001. Marine organisms as a source of new anticancer agents. *Lancet Oncol*, 2: 221-225.
- Scott, 1995. *Techniques and practice of chromatography*. CRC Press. USA. 403p.
- Shanmuga, D., S. Sanka & H. Kohila. 2016. In vitro antioxidant and spectrophotometric studies of a colonial ascidian *Didemnum psammathodes*. *International Journal of Pharmaceutical Chemistry*, 6: 192-196.
- Stoecker, D. 1980. Chemical defenses of ascidians against predators. *Ecology*, 61: 1327-1334.
- Ueki, T., M. Fujie, Romaidi & N. Satoh. 2018. Symbiotic bacteria associated with ascidian vanadium accumulation identified by 16S rRNA amplicon sequencing. *Marine Genomics*, xx: xx-xx.
- Valdés-Iglesias, O., R. Pérez-Gil e Y. Colom. 2010. Actividad antitumoral de los organismos marinos. *Medio Ambiente y Desarrollo*. 19: 1-6.
- Vervoort, H. & W. Fenical. 2000. Tamandarins A and B: New cytotoxic depsipeptides from a Brazilian ascidian of the family Didemnidae. *J. Org. Chem*, 65: 782-792.

- Voutquenne, L. 2001. Saponins and hemolytic activity. Saponins and glycosides from five species of Sapindaceae. *Annales Pharmaceutiques francaises*, 59: 407-414.
- Wagman, G. & R. Cooper. 1988. Natural Products Isolation: Separations methods for antimicrobials, antivirals and enzyme inhibitors. *Elsevier*. Netherlands. 618 p.
- Yamazaki, H., D. Wewengkang, T. Nishikawa, H. Rotinsuku, R. Mangindaau & M. Namikoshi. 2012. Two New Tryptamine Derivatives, Leptoclinidamide and (-)-Leptoclinidamine B, from an Indonesian Ascidian *Leptoclinides dubius*. *Marine Drugs*, 10: 349-357.
- Yu, K., C. Wong, & I. Jantan. 2015. Larvicidal activity, inhibition effect on development, hispathological alteration and morphological aberration induced by seaweed extracts in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal Of Tropical Medicine*, 7: 1-7.
- Zheng, L., Y. Wang & J. Sheng. 2011. Antitumor peptides from marine organism. *Marine Drugs*, 9: 1840-1859.
- Zubia, E., M. Ortega y J. Salvá. 2003. Potencialidad antitumoral de productos naturales marinos de ascidias del Estrecho de Gibraltar: Una panorámica. *Ciencias Marinas*, 29: 251-260.