



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Doctorado en Biotecnología
Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Título de la tesis:

“Producción de extractos de bacterias pigmentadas provenientes de la Antártida. Análisis de su posible aplicación como agentes anti-proliferativos en líneas celulares derivadas de tumores humanos”

Licenciado en Bioquímica Diego Alem Magister en Biotecnología

Tutor: Dr. Wilner Martínez López

Co-tutora: Dra. Susana Castro Sowinski

Tribunal:

Dra. Mariela Bollati, Dra. María Ana Duhagón, Dr. Raúl Platero



AGRADECIMIENTOS

- Tutores: Wilner y Susana. IIBCE Y FCIEN.
- A la ANII, que financió esta tesis, BECA POS_NAC_2016_1_130494
- Al tribunal, Dra. Mariela Bollati, Dra. María Ana Duhagón, Dr. Raúl Platero.
- Dra. Verónica Saravia, Departamento de Bioingeniería, FIng.
- Dr. Danilo Davyt Laboratorio de Química Farmacéutica, FQuim.
- Pao, Silvina y Lucia. Ricardo. Al DGen. Juan, la Sección Bioquímica y Biología Molecular de FCien. Federico y Gustavo del Servicio Citometría. Silvia Olivera, Gabriel Otero y el NMBC.
- Mis viejos José y Graciela, a mis hermanos Fernando y Analaura, Meli mi compañera, familia. Los Simios Salames. Esparta. Peñarol.

Tener de amigos a mis hermanos, tener de hermanos a mis amigos

“CON CIENCIA GRANDE NO HAY PAÍS PEQUEÑO”

Clemente Estable

ABREVIACIONES

% R	Porcentaje de rendimiento
°C	Grado Celsius
µg/mL	Micro gramo mililitro
µM	Micro molar
ABAC	Asociación Banco Argentino de Células
Abs	Absorbancia
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CCU	Cáncer de cuello uterino
CDDP	Cis-diaminadichloroplatinum (II)
CHLCC	Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer
CI50	Concentración inhibitoria 50 que reduce la viabilidad en un 50%
CO ₂	Dióxido de carbono
CPT	Camptotecina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica

EC	Extracto crudo
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid (ácido etilendiaminotetraacético)
EM	Extracto metanólico
EMs	Extractos metanólicos
EMT	Transición epitelio-mesénquima
FAE	Fracción acetato de etilo
FBN	Frecuencia de las células bi nucleadas
FDA	Food & Drug Administration
FIGO	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
FMN	Frecuencia de micronúcleos
g	Gramo
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
HDAC6	Deacetilasa de histona 6
HEX	Hexano
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IARC	Del inglés International Agency for Research on Cancer, Agencia Internacional de Investigación en Cáncer
IDN	Índice de División Nuclear
ISUP	Del inglés International Society of Urological Pathology, Sociedad

	Internacional de Urología Patológica
IP	Ioduro de propidio
KCl	Cloruro de potasio
Kg	Kilogramo
L	Litro
m/z	Relación masa carga
MeOH	Metanol
mg/L	Miligramo por litro
Mi	Número de micronúcleos
microARN	Micro ácido ribonucleico mensajero
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MMR	Del inglés Miss Match Repair, reparación por mal apareamiento de bases
MS	Del inglés Mass Spectrometry, espectrometría de masas
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NaCl	Cloruro de sodio
NER	Del inglés Nucleotide Excision Repair, reparación por escisión de nucleótidos
nm	Nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Tampón fosfato salino

pH	Medida de acidez o alcalinidad de una solución
ppa	Puro para análisis
PUMBGM	Papiloma urotelial maligno de bajo grado de de malignad
PVP	Del inglés Purple violet pigment, Pigmento purpura violeta
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
RZ	Resazurina
SFB	Suero fetal bovino
SRB	Sulforodamina B
SSC	Side scatter
TNM	Del inglés “Tumor, Nodes and Metastasis”
Tpr	Triptófano
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
TSB	Del inglés Tryptic Soy Broth, Caldo trípico de soja
UFC/mL	Unidades formadoras de colonias por mililitro
U Abs	Unidades de absorbancia
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VPH	Virus del papiloma humano

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Incidencia del cáncer de vejiga en Uruguay entre 2012 y 2016.....	18
Tabla 2. Incidencia del CCU en Uruguay entre 2012 y 2016.	21
Tabla 3. Lista de bacterias evaluadas.	33
Tabla 4. Extractos metanólicos de bacterias antárticas.	48
Tabla 5. Producciones de biomasa y violaceína por UV13, utilizando diferentes posibles inductores de la producción de violaceína..	62
Tabla 6. Concentraciones inhibitorias medias de la violaceína y el cisplatino, así como sus combinaciones, sobre las células T24.	78
Tabla 7. Concentraciones inhibitorias medias de la violaceína y el cisplatino, así como sus combinaciones sobre células 253 J.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mapa indicativo del lugar que ocupa el cáncer como causa de muerte para menores de 70 años	17
Figura 2. Esquema indicativo de las clasificaciones de cáncer de vejiga.	20
Figura 3. Esquema del cáncer de cuello uterino.....	23
Figura 4. Colores de los pigmentos y espectros de absorción de los EMs.....	49
Figura 5. Actividad antiproliferativa de los EMs por 24 h en la línea T24, evaluados mediante MTT.	50
Figura 6. Estudio de la combinación de los EMs combinados con CDDP 15 μ M.	51
Figura 7. Purificación del pigmento en columna de sílica.	52
Figura 8. Efecto de la FAE en la línea T24 por 24 h evaluada mediante ensayo de RZ.	53
Figura 9. Espectro de masas de ls FAE.	54
Figura 10. Espectro ^1H -RMN en DMSO- d_6 de la violaceína.....	55
Figura 11. Efecto de la temperatura en la producción de biomasa y pigmento.....	59
Figura 12. Efecto de la concentración de TSB en la producción de biomasa y violaceína.	60
Figura 13. Imagen representativa del experimento de optimización en tubos con distintos medio de cultivo.	61
Figura 14. Producción de violaceína en matraz agitado (50 mL de medio de cultivo en matraz de 250 mL).....	64
Figura 15. Producción del pigmento de UV13 en un biorreactor agitado de 5 L.....	65
Figura 16. Efecto anti-proliferativo y sensibilizador al cisplatino en células HeLa evaluadas por el método RZ.....	67

Figura 17. Ensayo de micronúcleos en células Hela tratadas con violaceína o violaceína + CDDP.....	68
Figura 18. Ensayo de micronúcleos en células HeLa tratadas con violaceína y/o CDDP en presencia de cafeína (4 mM).....	69
Figura 19.Efecto anti-proliferativo determinado por el ensayo de RZ en la línea T24.....	76
Figura 20. Efecto anti-proliferativo determinado por el ensayo de RZ en la línea 253 J.....	77
Figura 21. Efecto de la violaceína sobre la frecuencia de micronúcleos y de células binucleadas para la línea celular T24.....	80
Figura 22. Frecuencia de micronúcleos y células binucleadas en células 253J tratadas con cisplatino y/o violaceína.....	81
Figura 23. Estudio del efecto de la violaceína y el cisplatino en el daño primario en el ADN...	82
Figura 24. Estudio de la alteración del ciclo celular en la línea T24.....	83
Figura 25. Estudio de la alteración del ciclo celular en la línea 253 J.	84
Figura 26. Estudio de la apoptosis en la línea T24 a las 12 h.....	85
Figura 27. Estudio de la apoptosis inducida en la línea celular 253 J a las 12 h.....	85
Figura 28. Estudio de la apoptosis en la línea celular T24 a las 24 h.....	91
Figura 29. Estudio de inducción de células apoptóticas en la línea 253J a las 24 h.....	86
Figura 30. Ensayo de inhibición de cierre de herida de la violaceína en las líneas celulares...	88
Figura 31. Efecto de la violaceína sobre esferoides de las líneas T24 y 253 J.....	89

INDICE

1 RESUMEN.....	15
2 INTRODUCCIÓN	17
Incidencia de Cáncer.....	17
Cáncer de vejiga.....	18
Cáncer de cuello uterino.....	21
Apoptosis, mecanismo de muerte celular.....	24
Productos antitumorales naturales.....	25
Uso de bacterias para terapia anti-neoplásica:	25
Características relevantes de las bacterias antárticas	25
Actividad antiproliferativa de pigmentos bacterianos.....	27
Quimioterapia basada en cisplatino.....	27
Sensibilización química al cisplatino	28
3 HIPÓTESIS	30
4 OBJETIVOS	31
4.1 Objetivo general.....	31
4.2 Objetivos específicos.....	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS	32
5.1 Estrategia experimental para el cumplimiento del primer objetivo.....	32
5.1.1 Obtención de los extractos alcohólicos enriquecidos en pigmentos	32

5.1.2 Espectros de absorción UV	33
5.1.3 Cultivos celulares	34
5.1.4 Determinación de la actividad antiproliferativa	34
5.1.5 Purificación del extracto metanólico producido por UV13 (EMUV13)	35
5.1.6 Identificación del pigmento.....	36
5.2 Estrategia experimental para el cumplimiento del segundo objetivo	36
5.2.1 Optimización de la producción del pigmento.....	36
5.2.2 Crecimiento de UV13 y producción del pigmento en matraces (escalado)	37
5.2.3 Producción del pigmento en biorreactor (escalado).....	38
5.2.4 Extracción, purificación e identificación química del pigmento.....	39
5.2.5 Actividad antiproliferativa y quimio-sensibilizadora del pigmento en línea de cáncer de cuello uterino HeLa.....	39
5.2.6 Ensayo de micronúcleos.....	40
5.3 Estrategia experimental para el cumplimiento del tercer objetivo	42
5.3.1 Cultivos celulares	42
5.3.2 Ensayo de micronúcleos.....	42
5.4.3 Ensayo Cometa.....	42
5.3.4 Estudio del ciclo celular	43
5.3.5 Estudio de la apoptosis.....	44
5.3.6 Ensayo de cierre de herida	45
5.3.7 Evaluación de la viabilidad cultivos independientes de sustrato (esferoides multicelulares)	45

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
CAPITULO I.....	47
6.1 Búsqueda de compuestos anti-proliferativos partiendo de extractos metanólicos de pigmentos producidos por bacterias antárticas.....	47
6.1.1 Obtención de los extractos de bacterias antárticas	47
6.1.2 Espectros de absorción UV	48
6.1.3 Actividad antiproliferativa	50
6.1.4 Purificación del pigmento presente en EMUV13.....	51
DISCUSIÓN CAPITULO I	56
CAPITULO II	57
6.2 Optimización de la producción y purificación de la violaceína. Escalado.....	57
6.2.1 Producción de pigmento en diferentes condiciones de crecimiento.....	58
6.2.2 Producción de pigmento en matraces agitados.....	63
6.2.3 Producción de pigmento en un biorreactor.....	64
6.2.4 Purificación e identificación del pigmento purpura	65
6.2.5 Actividad antiproliferativa y sensibilizadora al cisplatino de la violaceína	66
6.2.6 Genotoxicidad	67
DISCUSIÓN CAPITULO II	70
Optimización de la producción del extracto y purificación de la violaceína	70
CAPITULO III.....	75
6.3 Evaluación de la actividad antiproliferativa de la violaceína en líneas de cáncer de vejiga .	75
6.3.1 Actividad antiproliferativa y actividad sensibilizadora del cisplatino.	75

6.3.2 Estudio del efecto genotóxico de la violaceína	79
6.3.3 Ensayo Cometa.....	81
6.3.4 Estudio del efecto de la violaceína sobre el ciclo celular	83
6.3.5 Estudio de la inducción de la apoptosis por la violaceína	84
6.3.6 Estudio del efecto de la violaceína sobre el cierre de herida.....	87
6.3.6 Estudio del efecto sobre el crecimiento independiente de sustrato de la violaceína	88
DISCUSIÓN CAPÍTULO III.....	89
7 DISCUSIÓN GENERAL	94
8 CONCLUSIONES	97
9 PERSPECTIVAS	98
10 BIBLIOGRAFÍA.....	99
11 ANEXO 1 Análisis de Ciclo Celular.....	113
12 ANEXO 2 Cálculo de costo de producción de violaceína, a partir de un aislamiento antártico UV13 al 16/05/2020.....	117

1 RESUMEN

El cáncer es un problema de salud mundial, siendo un grupo de enfermedades crónicas caracterizadas por el crecimiento incontrolado y la propagación (invasión y metástasis) de células anormales. El cáncer de vejiga es el cuarto tipo de tumor diagnosticado en hombres, con una incidencia de 17,68 cada 100.000 hombres, mientras que en mujeres la incidencia es de 3,66. Por otro lado, el cáncer de cuello uterino afecta por año en Uruguay a 14,4 de cada 100.000 mujeres. En sus estados avanzados, ambos tipos de tumores se tratan con cisplatino. Lamentablemente, las terapias antineoplásicas actuales producen importantes efectos secundarios, y en algunos casos, efectos refractarios. Por ello es necesaria la búsqueda de nuevos compuestos antitumorales. En el ambiente extremo antártico (bajas temperaturas y elevada irradiación UV), existen microorganismos que han sido capaces de adaptarse a este medio ambiente, produciendo pigmentos como forma de protección a la alta irradiación UV, de los cuales poco conocemos. En tal sentido, el presente trabajo propone la utilización de extractos de bacterias antárticas, con el fin de estudiar sus posibles propiedades anti-proliferativas sobre líneas derivadas de tumores humanos. Por tanto, se evaluaron las actividades anti-proliferativas y sensibilizadoras de extractos metanólicos de seis bacterias antárticas pigmentadas y resistentes al UV previamente identificadas, sobre una línea celular derivada de cáncer de vejiga denominada T24 en ausencia o presencia del cisplatino. El extracto metanólico de color púrpura, fue obtenido de un microorganismo identificado tentativamente como *Janthinobacterium* sp. (aislamiento UV13), el cual presentó actividad anti-proliferativa y potencialmente sensibilizadora al cisplatino. Luego, se optimizó la producción y purificación del pigmento. Para ello se analizó el efecto de la temperatura y la composición del medio de crecimiento en la producción del pigmento logrando el mayor rendimiento a 20 °C en medio de caldo de soja trípico suplementado con 3,6 g/L de glucosa, incrementando posteriormente su producción mediante el empleo de un biorreactor de 5 L, obteniéndose 77 mg/L de pigmento crudo. El pigmento se purificó por cristalización, el cual fue identificado como violaceína por

espectrometría de masas (DI-EI-MS) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN). Luego, se demostró que la violaceína en alta pureza era el componente del extracto con actividad anti-proliferativa y sensibiliza a las células HeLa (células derivadas de un tumor de cuello uterino) al cisplatino. Se determinó, asimismo, que la violaceína no presenta actividad genotóxica, mediante ensayo de micronúcleos, como sucede con el cisplatino. Además, se trataron líneas celulares derivadas de cáncer de vejiga T24 (carcinoma grado III *in situ*) y 253 J (metástasis retroperitoneal) con violaceína o en forma combinada con diferentes dosis de cisplatino. La violaceína demostró ser un potente anti-proliferativo en concentraciones menores a 500 nM, aumentando la sensibilidad de las células al cisplatino. Los resultados sugieren que este efecto no sería debido a daño en el ADN, por lo que se excluyó un efecto genotóxico. La violaceína demostró ser inductor de apoptosis a las 12 y 24 horas luego del tratamiento; finalmente se demostró que la violaceína afecta la viabilidad celular cuando las células crecen independientemente de sustrato y reduce la migración celular. Estos resultados sugieren que la violaceína podría utilizarse como fármaco coadyuvante en el tratamiento del cáncer de vejiga o de cuello uterino.

2 INTRODUCCIÓN

Incidencia de Cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento incontrolado y la propagación (invasión y metástasis) de células anormales- Por tanto el cáncer es un problema de salud pública mundial (Siegel *et al.*, 2019). La incidencia a nivel global es de alrededor de 18,1 millones de casos y 9,6 millones de muertes por año, siendo la primer o segunda causa de muerte para menores de 70 años en 91, de los 192 países de mundo (Figura 1) (Bray *et al.*, 2018).

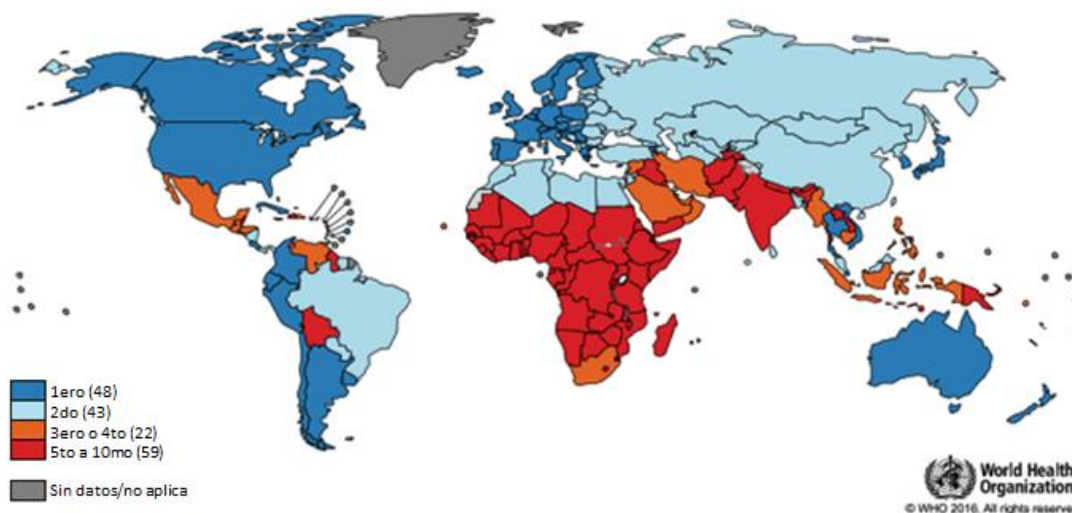


Figura 1 Mapa indicativo del lugar que ocupa el cáncer como causa de muerte para menores de 70 años (adaptado de Bray *et al.*, 2018).

En Uruguay se diagnostican unos 13000 casos nuevos de cáncer (exceptuando al cáncer de piel distinto al melanoma), y más de 8000 pacientes mueren por esta enfermedad anualmente (Barrios and Garau, 2017). Además, dada la tendencia al envejecimiento poblacional en Uruguay, se prevé que esta enfermedad se convierta en un problema sanitario (Barrios and Garau, 2017). El costo económico de la enfermedad a nivel mundial fue estimado en aproximadamente U\$S 1,6 trillones según la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer

(WHO IARC, 2014). Para su tratamiento existen fármacos antineoplásicos, cuya elevada toxicidad y producción de efectos secundarios indeseados (problemas renales graves, reacciones alérgicas, disminución de la inmunidad y propensión a las infecciones, trastornos gastrointestinales, hemorragia y pérdida de audición), así como el desarrollo de resistencias a las drogas quimioterapéuticas, han llevado a la necesidad de una búsqueda continua de fármacos con mayor eficacia terapéutica y/o menos efectos secundarios (Holoan *et al.*, 2013).

Cáncer de vejiga

El cáncer de vejiga es una enfermedad de gran importancia sanitaria, tanto por su incidencia como por su prevalencia. A nivel mundial se estiman 549.000 casos nuevos y 200.000 defunciones por año, ocupando el décimo lugar en incidencia (Bray *et al.*, 2018). El cáncer de vejiga es más común en hombres que en mujeres siendo las tasas de incidencia y mortalidad de 9,6 y 3,2 cada 100.000 para los hombres, mientras que para mujeres es cuatro veces menor (Tabla 1).

Tabla 1. Incidencia del cáncer de vejiga en Uruguay entre 2012 y 2016. T.A.: Tasa ajustada por edad a la población mundial estándar expresada en casos por 100.000 habitantes. %: porcentaje sobre el total de cánceres (excluyendo piel no melanoma) para cada sexo. Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer (CHLCC).

	INCIDENCIA			MORTALIDAD		
	T. A.	Promedio anual	%	T. A.	Promedio anual	%
Hombres	17,68	444	6,27	6,7	193	4,38
Mujeres	3,66	132	1,96	1,27	59	1,64

En nuestro país la incidencia anual entre 2012 y 2016 fue de 17,68 cada 100.000 para hombres ocupando el cuarto lugar de incidencia y 3,66 cada 100.000 en mujeres. La mortalidad fue de 4,38% y 1,64% respectivamente (Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer, 2019b). Un estudio estimó el costo de la patología en 4 billones de dólares en los Estados Unidos (EEUU), siendo el cáncer más costoso por paciente (Mossanen and Gore, 2014). La edad media de aparición se ubica entre 60-70 años, y su frecuencia aumenta con la edad. Aunque la incidencia es mayor en países desarrollados, la mortalidad es mayor en países en desarrollo (Cumberbatch *et al.*, 2018).

El cáncer de vejiga está relacionado con el contacto entre el epitelio vesical y sustancias cancerígenas ingeridas o inhaladas, y excretadas a través de la orina. El principal factor de riesgo es el tabaco, con un riesgo atribuible al 50%, debido a la presencia de aminas aromáticas y compuestos N-nitrosos eliminados en la orina. Está demostrado la correlación entre ciertas ocupaciones y el cáncer de vejiga, siendo las principales oficios la industria tabacalera, los trabajadores del metal y carbón, la fabricación de gomas, tintes, pinturas, productos de limpieza y belleza, imprentas, industrias del aluminio o cuero y los conductores de vehículos (Cumberbatch *et al.*, 2018).

En general todos los tumores se clasifican según diferentes estadios que varían en función del compromiso en lo local, regional y a distancia. El TNM (del inglés “Tumor, Nodes and Metastasis”, Figura 2), es el método más difundido y utilizado en el cáncer de vejiga. Este método clasifica los tumores en función de las características del tumor primario (T), la existencia de nódulos linfáticos afectados (N) y si se verifican metástasis (M) (Martínez *et al.*, 2018). Otra forma de clasificar los tumores de vejiga, es de acuerdo a su clasificación histológica. La clasificación establecida en 2004 por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Sociedad Internacional de Patología Urológica (SIPU), proporciona una estratificación de acuerdo a la malignidad del tumor entre las categorías individuales, sustituyendo a la clasificación anterior de la OMS de 1973, donde se definían como carcinomas

de grado 1, 2 y 3. En la nueva clasificación se marca la diferenciación el grado del tumor en cuanto a su capacidad invasiva, siendo los de alto grado los de mayor propensión a la invasión (Figura 2) siendo definidos como malignidad urotelial papilar de baja malignidad, carcinoma papilar urotelial de bajo y alto grado de malignidad (Humphrey *et al.*, 2016; Sanli *et al.*, 2017).

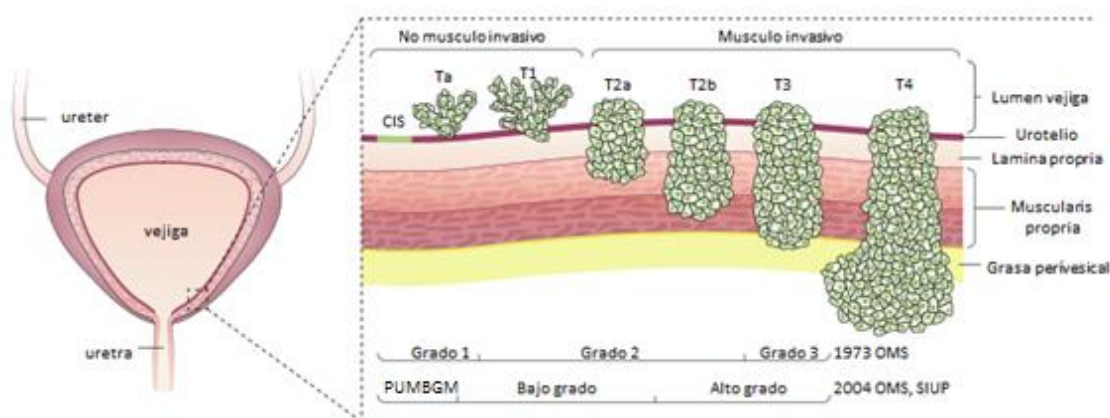


Figura 2. Esquema indicativo de las clasificaciones de cáncer de vejiga. PUMBGM: papiloma urotelial maligno de bajo grado de bajo grado de malignidad.

Otra clasificación descrita por Choi *et al.* en 2012 describe tres subtipos de carcinoma urotelial de alto grado músculo-invasivo, se basa en el perfil de expresión de ARNm de todo el genoma. Las categorías son basal, luminal, y p53-símil. Además de los subtipos luminal y basal que son similares a los descritos en estudios previos, el subtipo p53-símil fue descrito como un subtipo luminal resistente a la quimioterapia neoadyuvante (Choi *et al.*, 2012).

Aproximadamente el 75% de los pacientes presentan cáncer de vejiga no músculo invasivo confinado a la región mucosa/submucosa de la vejiga. En este tipo de tumores el objetivo de tratamiento se dirige a la resección endoscópica del tumor, reducir las recurrencias y prevenir la progresión a una etapa más avanzada. El segundo grupo abarca la enfermedad músculo invasora (25%), donde se determina si será necesario un tratamiento radical de terapia multimodal de cistectomía (resección transuretral, quimioterapia y radioterapia). Dentro de este grupo, los pacientes con cáncer de vejiga metastásico, se considera incurable y el objetivo terapéutico actual es prolongar en tiempo y calidad, la vida en los pacientes para lo cual se utiliza la terapia

con cisplatino (Cumberbatch *et al.*, 2018; Martínez *et al.*, 2018). Es de destacar que, la quimioterapia basada en cisplatino solo es efectiva en 30 a 40% de los casos, y aún no es posible identificar prospectivamente a los pacientes que probablemente obtengan beneficios (Shah *et al.*, 2011). Otra problemática de este tipo de tumores es la alta recidiva 30-80% en los 5 años posteriores al primer diagnóstico, y un 10-30% de ellos sobre todo los de alto grado, progresarán hacia tumor infiltrante. El 50% de la recidiva se da en los primeros dos años (Martínez *et al.*, 2018).

Cáncer de cuello uterino

En 2018 se estimaron 569.847 nuevos casos de cáncer de cuello uterino (CCU) y 311.365 defunciones (Bray *et al.*, 2018), el 90 % de los casos ocurren en países de desarrollo económico bajo o medio (Cohen *et al.*, 2019).

Tabla 2. Incidencia del CCU en Uruguay entre 2012 y 2016. T.A.: Tasa ajustada por edad a la población mundial estándar expresada en casos por 100.000 mujeres. % sobre el total de cánceres (excluyendo piel no melanoma). Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer 2019.

	INCIDENCIA			MORTALIDAD		
	T. A.	Promedio Anual	%	T. A.	Promedio anual	%
Mujeres	14,40	314	4,65	5,39	136	3,78

En Uruguay el CCU es el tercero más frecuente en la mujer, luego de los cánceres de mama y colo-rectal. En el periodo 2012-2016 (Tabla 2) se diagnosticaron en promedio unos 314 casos nuevos anuales de cáncer de cérvix invasor (excluyendo cáncer *in situ*) y más de 130 mujeres murieron cada año por esta causa en nuestro país. Tanto las tasas de incidencia como de

mortalidad por cáncer de cérvix en Uruguay se ubican en el tercer quintil en el contexto internacional (Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer, 2019a).

El principal factor etiológico es la presencia del virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo. Los VPH de alto riesgo, relacionados con lesiones de alto grado de CCU son: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 55, 56, 58, 59, 66, 68 (Nozar and Briozzo, 2017). Dentro de los factores de riesgo se encuentran: edad temprana del debut sexual, múltiples parejas sexuales o una pareja sexual de alto riesgo, inmunosupresión (p. ej., tras un trasplante de órganos o trastornos de inmunodeficiencia como el virus de la inmunodeficiencia humana, VIH), antecedentes de infección de transmisión sexual, antecedentes de displasia de vulva o vaginal relacionada con el HPV, la no asistencia para el tamizaje y el tamizaje insuficiente en países con programas de cribado cervical establecidos (lo que da como resultado aproximadamente dos tercios de los CCU en dichos países. Otro factor asociado al alto riesgo es el consumo de tabaco (Cohen *et al.*, 2019).

Dado la importancia de la infección por HPV de alto riesgo en el desarrollo del CCU, las directrices de la OMS que se aplican en nuestro país están enfocadas en la educación y sensibilización sobre el tema, la vacunación, tamizaje y detección precoz, tratamiento adecuado y cuidados paliativos. Esto incluye administrar a las niñas, entre los 9 y los 13 años, dos dosis de la vacuna contra los VPH; utilizar las pruebas de detección de VPH como método de cribado para prevenir el CCU y difundir información de forma más amplia (Nozar and Briozzo, 2017).

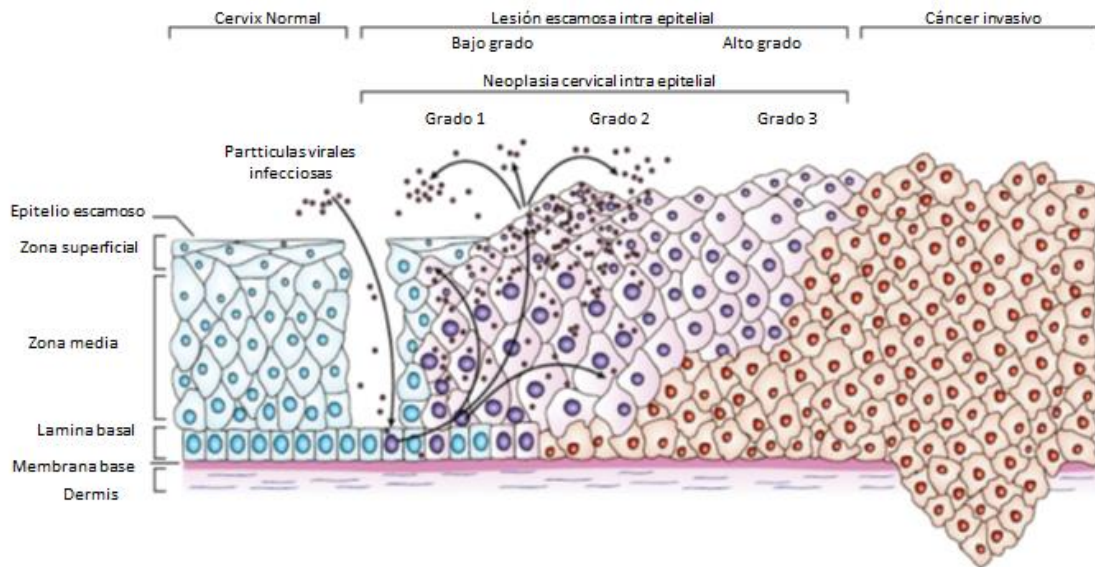


Figura 3. Esquema del CCU, adaptado de Cohen *et al.* 2019.

El CCU se clasifica según la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) en cuatro estadios I, II, III y IV. La determinación del estadio se basa en los resultados del examen físico, las exploraciones por imágenes y las biopsias. Según se destalla en el esquema de la Figura 3, en el estadio I el carcinoma está estrictamente limitado al cuello uterino. En el estadio II el cáncer se ha diseminado más allá del útero hacia áreas cercanas, como la vagina o el tejido cercano al cuello uterino, pero no se ha extendido al tercio inferior de la vagina ni a la pared pélvica. Avanzando en el Estadio III el CCU afecta el tercio inferior de la vagina y/o se ha diseminado a la pared pélvica y/o causa inflamación del riñón, denominada hidronefrosis, o impide que el riñón funcione y/o compromete los ganglios linfáticos regionales. No hay diseminación distante. El estadio IV, son las metástasis (probadas por biopsia) sub dividiéndose en estadio IVA cuando el cáncer se ha diseminado a la vejiga o al recto, pero no a otras partes del cuerpo y estadio IVB: el cáncer se ha diseminado a otras partes del organismo (Figura 3).

El tratamiento depende de la extensión de la enfermedad en el momento del diagnóstico, pudiendo involucrar la histerectomía radical o radioterapia combinada con quimioterapia. Para las mujeres con enfermedad metastásica o recurrente, el pronóstico general es malo, siendo el

tratamiento con cisplatino el habitualmente empleado en estos casos (Cohen *et al.*, 2019). La recurrencia post operatoria es del orden del 60% (Giansanti *et al.*, 2010).

Dada la localización en el cuerpo humano, este tipo de tumores (vejiga y cuello de útero) son pasibles de tratamientos poco invasivos (no sistémicos), como las instilaciones vesicales en el caso del cáncer de vejiga y tratamiento tópico para el cáncer cervical. Mediante esta metodología se logra inyectar el agente quimioterapéutico localmente, absorbiéndose solamente el 5% al torrente sanguíneo (Shen *et al.*, 2008), lo que disminuiría el riesgo de los posibles efectos secundarios para la realización de un ensayo preclínico.

Apoptosis, mecanismo de muerte celular

Uno de los principales mecanismos que llevan a la muerte de las células tumorales, mediante los clásicos tratamientos de quimio y radioterapia, lo constituye la apoptosis (Savage, 2015). En tal sentido, se ha demostrado que la muerte celular programada por apoptosis constituye una barrera natural para el desarrollo del cáncer (Hanahan and Weinberg, 2011). En términos generales, la apoptosis es un proceso altamente organizado de la muerte celular programada para la eliminación de células no deseadas del cuerpo durante el desarrollo de los órganos, la remodelación de los tejidos y la respuesta inmune. La apoptosis, se caracteriza por un conjunto discreto de pasos bioquímicos y cambios morfológicos, incluyendo la activación de caspasas, la translocación de fosfatidilserina desde el interior hacia el exterior de la membrana plasmática, condensación de la cromatina, degradación del ADN y la fragmentación de la célula en fragmentos subcelulares llamados cuerpos apoptóticos (Brunelle and Zhang, 2010). Se ha observado que los defectos en las vías apoptóticas están implicados en el desarrollo de cáncer, y a su vez, se encuentran relacionados en muchos casos con la resistencia de los tumores a la quimioterapia (Brunelle and Zhang, 2010; Hanahan and Weinberg, 2011).

Productos antitumorales naturales

Alrededor del 49% de los fármacos anti-neoplásicos aprobados en los últimos 50 años son productos naturales o moléculas derivadas de estos (Kinghorn *et al.*, 2016). Existen varios productos antitumorales de uso clínico derivados de planta, como por ejemplo los alcaloides derivados de vinca (*Catharanthus roseus*), vinblastina y vincristina; los derivados de camptotecina (aislados de *Camptotheca acuminata*) topotecan e irinotecan; el etopósido, derivado de epipodofilotoxina (aislado de *Podophyllum notatum*); y el paclitaxel o taxol (*Taxus brevifolia*) (Cragg and Newman, 2013). Como ejemplos de compuestos anticancerígenos derivados de microorganismos encontramos a las antraciclinas (doxorubicina), bleomicina, actinomicina y mitomicina C (Cragg and Newman, 2013; Kinghorn *et al.*, 2016).

Uso de bacterias para terapia anti-neoplásica:

Desde fines del siglo XIX se utilizan bacterias como agentes anticancerígenos. Las primeras aplicaciones implicaban el uso de bacterias patogénicas atenuadas, que estimulaban el sistema inmune generando regresión tumoral. Las nuevas estrategias incluyen el uso de productos bacterianos tales como proteínas, enzimas, inmunotoxinas y metabolitos secundarios, que se dirigen específicamente a las células cancerosas y causan la regresión del tumor a través de la inhibición del crecimiento, detención del ciclo celular o la inducción de la apoptosis (Bernardes *et al.*, 2010; Fialho *et al.*, 2011). Entre Enero de 2007 y Junio de 2011 se patentaron 376 productos bacterianos como agentes anticancerígenos, incluyendo entre otros, proteínas, enzimas, inmunotoxinas y metabolitos secundarios (Fialho *et al.*, 2011).

Características relevantes de las bacterias antárticas

La Antártida presenta una gama de condiciones climáticas extremas. Bajas temperaturas, alta radiación incidente, baja humedad atmosférica, baja disponibilidad de agua en estado líquido, alta salinidad, variaciones de pH, entre otras, las cuales llevan a catalogar a este ambiente como uno de los más duros de la Tierra, siendo inhóspito para el desarrollo de la mayoría de las

comunidades biológicas. Estas condiciones son apropiadas para el establecimiento de una serie de biotipos microbianos especializados y localizados (Cowan and Tow, 2004; Cary *et al.*, 2010).

Respecto a la clasificación de los microorganismos respecto a su temperatura cardinal de crecimiento, las bacterias psicrófilas poseen una temperatura óptima de crecimiento de 15 °C o inferior, mientras que las psicrotolerantes son capaces de crecer a temperaturas inferiores a 15 °C, pero la tasa de crecimiento es más rápida por encima de los 20 °C (Gupta *et al.*, 2014). Por otro lado, los microorganismos con capacidad de sobrevivir a altas dosis de radiación son conocidos como extremófilos radiorresistentes. La exposición excesiva a la irradiación UV induce lesiones en el ADN generando un efecto citotóxico y mutagénico sobre los organismos biológicos. Sin embargo, algunas poblaciones de microorganismos son capaces de crecer en ambientes expuestos a radiaciones gracias a los mecanismos de defensa desarrollados por los mismos (Gabani and Singh, 2013; Núñez-Montero and Barrientos, 2018). Este grupo de microorganismos extremófilos se consideran como una fuente importante de moléculas bioactivas que pueden ser empleadas en el tratamiento de algunas enfermedades, debido a que para sobrevivir en este tipo de ambientes, los microorganismos han desarrollado defensas únicas, y esto les ha llevado con frecuencia a producir nuevas moléculas no detectadas en las mismas especies de microorganismos ubicados en otros ambientes menos hostiles (Cowan and Tow, 2004; Cary *et al.*, 2010; Núñez-Montero and Barrientos, 2018).

Entre los metabolitos secundarios implicados en la respuesta a la exposición a algunos tipos de radiación se pueden encontrar numerosos pigmentos característicos. Estos pigmentos constituyen moléculas capaces de absorber la luz en determinadas longitudes de onda dentro de la región del espectro visible (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). Un mecanismo propuesto para la protección ante la radiación UV es la acumulación de pigmentos absorbentes generalmente a nivel de la membrana exterior bacteriana (Nicholson *et al.*, 2005; Morgan-kiss *et al.*, 2012; Mojib *et al.*, 2013; Marizcurrena *et al.*, 2019). Por otro lado, se ha demostrado que la producción de pigmentos puede funcionar como un mecanismo de adaptación a las bajas

temperaturas, actuando como moduladores de la fluidez de la membrana, alterando su homeoviscosidad durante la fluctuación de la temperatura (Dieser *et al.*, 2010; Mojib *et al.*, 2013).

Actividad antiproliferativa de pigmentos bacterianos

Varios trabajos científicos han demostrado la actividad antitumoral de los pigmentos bacterianos. Estos pueden inducir apoptosis y/o inhibición del ciclo celular. A modo de ejemplo, el pigmento denominado prodigiosina producido por *Serratia marcescens*, tiene un efecto antitumoral en líneas celulares derivadas de cáncer de mama (Wang *et al.*, 2016). Otro ejemplo es el pigmento piocianina producido por *Pseudomonas aeruginosa* que tiene un efecto anti-proliferativo en la línea derivada de cáncer de hígado HepG2 (Zhao *et al.*, 2014). El pigmento melanina extraído de *Streptomyces glaucescens* mostró actividad anti-proliferativa frente a la línea de cáncer de piel HFB4, (El-Naggar and El-Ewasy, 2017). Por otro lado, la violaceína, un pigmento producido por bacterias pertenecientes a diferentes géneros, entre ellos *Chromobacterium violaceum*, *Janthinobacterium lividum*, *Alteromonas luteoviolacea*, *Duganella* sp. (Durán *et al.*, 2012) que posee actividad anti-proliferativa sobre líneas celulares derivadas de melanoma (Melo *et al.*, 2003), cáncer de colon (De Carvalho *et al.*, 2006) y cáncer de mama (Bromberg *et al.*, 2010; Alshatwi *et al.*, 2016). Asimismo, el pigmento PVP (*violacein-like purple violet pigment*) extraído de *Janthinobacterium antarctica* mostró ser un eficiente inhibidor del crecimiento de líneas celulares derivadas de fibrosarcoma (Mojib *et al.*, 2011).

Quimioterapia basada en cisplatino

El cisplatino (cis-diaminadichloroplatino (II), CDDP), es un fármaco quimioterapéutico bien conocido, aprobado por la *Food & Drug Administration* (FDA, EEUU) para su uso quimioterapéutico en cáncer de vejiga y testículo en 1978 (Galluzzi *et al.*, 2012). Se ha utilizado en el tratamiento de numerosos cánceres humanos, incluidos el de vejiga y cuello uterino

(Ismaili *et al.*, 2011; Cheung-Ong *et al.*, 2013; Dasari and Bernard Tchounwou, 2014; Zhu *et al.*, 2016). Si bien tiene un efecto pleiotrópico tanto en el citoplasma como en el núcleo, su acción más estudiada y por la cual se le atribuye el efecto, es mediante intercalación entre las bases purínicas del ADN, generando aductos fundamentalmente inter hebra, rupturas de cadena simple del ADN, así como interfiriendo con los mecanismos de reparación del ADN (Galluzzi *et al.*, 2012). De este modo es capaz de causar daño en el ADN e inducción de la apoptosis en células tumorales (Galluzzi *et al.*, 2012; Dasari and Bernard Tchounwou, 2014). También produce varios efectos secundarios, y en la mayoría de los casos, las células tumorales desarrollan mecanismos de resistencia al tratamiento, limitando de ese modo su empleo (Cheung-Ong *et al.*, 2013; Castedo *et al.*, 2018).

Sensibilización química al cisplatino

Como se mencionó anteriormente, si bien existen fármacos para la terapia tumoral, muchas veces o bien no controlan al tumor, tienen efectos secundarios indeseados o las células cancerosas generan resistencia a los mismos. Uno de los principales problemas de la quimioterapia reside en la capacidad de algunas células neoplásicas de generar resistencia. Este fenómeno, sumado a la intrínseca inestabilidad genómica de las células tumorales, pueden generar clones resistentes al tratamiento (Castedo *et al.*, 2018). Existen distintos procesos que se modifican en las células resistentes al CDDP, entre ellos alteraciones que implican pasos que preceden a la unión del cisplatino al ADN, mediante mecanismos de eflujo y alteración química por proteínas del tipo tiol (resistencia pre-objetivo); que se relacionan directamente con los aductos de ADN-cisplatino aumentando los mecanismos de reparación celular del tipo reparación por escisión de nucleótidos (*nucleotide excision repair*, NER) y reparación por mal apareamiento de bases (*mismatch repair* MMR) (resistencia en el objetivo); alteraciones en las vías de señalización de muerte provocadas por el daño en el ADN, inactivando los mecanismos de muerte del tipo apoptosis y autofagia (resistencia posterior al objetivo); activando la transición epitelio-mesénquima (EMT) (Galluzzi *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2016). Además existe

una alteración de los perfiles de metilación del ADN, de los microARN, cambiando a un fenotipo de características similares al de las células madre cancerígenas (Zhu *et al.*, 2016).

Una estrategia utilizada es la combinación de dos o más agentes quimioterápicos. Por ejemplo, se ha utilizado CDDP en combinación con otros fármacos de uso común como el 5-fluorouracilo, capecetabina, bleomicina, ifosfamida, taxol o gemcitabina (Giansanti *et al.*, 2010). Dada la problemática que genera el uso del cisplatino, se han buscado alternativas fuera de los fármacos convencionales. Por ejemplo, se ha demostrado la acción sensibilizadora al cisplatino de varios fitoquímicos, entre ellos la cúrcuma y el flavonoide quercetina (Sun *et al.*, 2019), junto a fenazinas de origen sintético (Hernández *et al.*, 2019) o el ácido hidroxiaminico suberoilánilida (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) (Ryu *et al.*, 2019).

3 HIPÓTESIS

Debido a las condiciones ambientales extremas presentes en la Antártida, los microorganismos ahí presentes han desarrollado estrategias de supervivencia a través de la producción de metabolitos secundarios. El cáncer es un problema sanitario a nivel mundial que muchas veces lleva a un desenlace fatal, si bien existen terapias estas no siempre resultan efectivas y presentan diversos efectos colaterales.

La hipótesis de la presente tesis es que los microorganismos que se desarrollan en la Antártida, producen pigmentos desconocidos, que podrían tener actividad antiproliferativa y/o sensibilizadora a agentes quimioterapéuticos en líneas celulares derivadas de cáncer de vejiga y de cáncer de cuello uterino humanos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estudiar la posible actividad anti-proliferativa *in vitro* de pigmentos derivados de bacterias extremófilas antárticas en líneas derivadas de cáncer de vejiga y cuello uterino.

4.2 Objetivos específicos

- 1) Generar una colección de extractos enriquecidos de pigmentos producidos por bacterias antárticas, que cubran un amplio espectro de colores. Evaluar la actividad antiproliferativa y la capacidad de sensibilizar al cisplatino de los extractos alcohólicos enriquecidos. Purificar e identificar los compuestos responsables de la mencionada actividad.
- 2) Optimizar la producción y/o purificación de las moléculas activas. Verificar su actividad en células HeLa.
- 3) Estudiar el efecto del compuesto aislado sobre las líneas tumorales T24 (células derivadas de carcinoma *in situ* grado III de vejiga) y 253 J (células derivadas de metástasis retroperitoneal), analizando su posible actividad citotóxica, mutagénica, afectación del ciclo celular, daño primario sobre el ADN, inducción de muerte por apoptosis, afectación de la migración celular.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Estrategia experimental para el cumplimiento del primer objetivo: “Búsqueda de compuestos anti-proliferativos partiendo de extractos metanólicos de pigmentos producidos por bacterias antárticas”

Se obtuvieron y evaluaron los extractos metanólicos de seis bacterias antárticas. Posteriormente se purificaron sus compuestos activos siguiendo la estrategia de fraccionamiento bio guiado, purificando componentes y evaluándolos mediante un bioensayo, intentando obtener una bio molécula con actividad purificada e identificada.

5.1.1 Obtención de los extractos alcohólicos enriquecidos en pigmentos

Las bacterias evaluadas (Tabla 3) pertenecen a la colección de bacterias resistentes a la irradiación UV de la Dra. Susana Castro, de la Sección Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la Republica (UdelaR). Las bacterias se identificaron previamente mediante la secuenciación de un fragmento del gen ADNr 16S de aproximadamente 1600 pb comparando con bases de datos públicas (Marizcurrena *et al.*, 2017). El microorganismo UV 13, se identificó como miembro de los géneros *Janthinobacterium* o *Duganella* basándose en sus similitudes de secuencia de ADNr 16S con cepas de referencia, ambos miembros de la familia Oxalobacteraceae. La secuencia se depositó en la base de datos NCBI con el número de acceso MK757717 y el aislado bacteriano se llamó UV13. La identificación final aún no se ha designado, al menos hasta una evaluación adicional de la identificación final utilizando un enfoque polifásico, incluida la secuenciación del genoma. Por lo tanto, el aislado fue designado como miembro de la familia Oxalobacteraceae, cepa UV13. (Marizcurrena comunicación personal).

Se estrió en placa de cultivo TSA (Tryptic Soy Broth, Sigma Aldrich #22092 EEUU 3 g/L, agar bacteriológico 2 %) del stock original conservado en 15 % glicerol en freezer -80 °C de cada bacteria. El mantenimiento se realizó por pasaje en placa de cultivo durante dos semanas a 20

°C. Se realizaron pre-cultivos de las bacterias creciéndolas en 5 mL de medio TSB (Tryptic Soy Broth, Sigma Aldrich #22092, EEUU) a una concentración de 3 g/L, a 200 rpm por 48 h a 20 °C, y luego se inocularon en matraces conteniendo 500 mL de TSB y se crecieron de igual forma que el pre-cultivo. Luego, se centrifugaron a 4 °C, 10.000 rpm por 15 min, descartando el sobrenadante. El pigmento presente en el pellet celular se extrajo en 5 mL de metanol puro para análisis (ppa) (MeOH, Dorwil) a 65 °C durante 15 min. Se centrifugó nuevamente, obteniéndose el sobrenadante coloreado a un tubo limpio, los cuales se evaporaron a presión reducida hasta secar (Labconco 78100-00 B Centrivap Concentrator, EEUU). Los extractos metanólicos (EM) se pesaron en balanza analítica y se resuspendieron en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich #276855) o etanol ppa (EtOH, Dorwil) para la evaluación de la citotoxicidad.

Tabla 3. Lista de bacterias evaluadas.

Identificación del microorganismo	Género	Identidad (%)	Color de la colonia
UV1	<i>Janthinobacterium</i>	99	NC
UV9	<i>Sphingomonas</i>	99	Naranja
UV11	<i>Hymenobacter</i>	96	Rojo
UV12	<i>Sphingomonas</i>	99	Amarillo
UV13	<i>Janthinobacterium o Duganella</i>	97	Violeta
UV15	<i>No identificado</i>	--	Amarillo limón

NC: no coloreada. La información sobre la identidad de los microorganismos se tomó de Marizcurrena *et al.*, 2017.

5.1.2 Espectros de absorción UV visible

Para la identificación primaria de los pigmentos se realizaron espectros de absorción en el rango de 200 a 800 nm. Se colocaron 100 µL de los EM a una concentración de 100 µg/mL, y se realizaron las medidas de absorbancia en un espectrofluorímetro (Varioskan Flash, Thermo Scientific, Finlandia).

5.1.3 Cultivos celulares

Se establecieron cultivos de las líneas derivadas de cáncer de vejiga T24 (carcinoma *in situ*) y 253 J (metástasis retroperitoneal) en el medio Mac Coy's 5A (Gibco #12330031, Gaithersburg, Maryland, EEUU), suplementado con L-glutamina 1 mM, penicilina–streptomina 1% y suero fetal bovino al 10% (SFB) (Capricorn Scientific #FBS 11-A, Ebsdorfergrund, Alemania). Los cultivos se mantuvieron en atmósfera con CO₂ al 5%, a 37 °C. Las células se obtuvieron de la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC; <http://www.abac.org.ar/>).

5.1.4 Determinación de la actividad antiproliferativa

Para determinar la actividad antiproliferativa se realizaron los ensayos de reducción del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, Sigma #M2128, EEUU) y/o el ensayo de reducción de la resazurina (RZ; Sigma # R7017, EEUU). Ambos ensayos se basan en la reducción metabólica de los compuestos por parte de las células viables. En el caso del MTT se reduce a formazan, mientras que la RZ se reduce a resofurina (Van Tonder *et al.*, 2015).

Brevemente, se establecieron los cultivos de la línea derivada de cáncer de vejiga T24, en placas de 96 pocillos, sembrando 5000 células cada 100 µL de medio Mac Coy's 5A con 10 % de SFB, y se cultivaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 24 h. Para evaluar la actividad antiproliferativa, se agregaron diferentes concentraciones de los EM (0,5, 5 y 50 µg/mL), y para evaluar la sensibilización al CDDP, se utilizaron las mismas concentraciones de los EM combinados con CDDP al 15 µM de. Se utilizó DMSO como control de vehículo. El ensayo transcurrió durante 24 h, en las condiciones de cultivo descritas.

Para el ensayo de reducción del MTT, se agregó MTT (concentración final 50 µg/mL) a cada pocillo y luego de 4 h se determinó el desarrollo de color a 575 nm en espectrofluorímetro (Varioskan). Para el ensayo de reducción de la RZ (RZ), se quitó el medio de cultivo y se reemplazaron por 100 µL de RZ 0,025 mg/mL preparada en PBS. Luego de 4 h, se midió la fluorescencia usando una longitud de onda de excitación de 530-560 nm y de emisión a 590 nm

en espectrofluorímetro (Varioskan). Los ensayos se realizaron por triplicado, teniendo además tres réplicas por concentración evaluada. Se realizó el test estadístico de ANOVA y Tukey.

5.1.5 Purificación del extracto metanólico producido por UV13 (EMUV13)

Como resultado de las actividades anteriores, se seleccionó el extracto EMUV13 (extracto metanólico o extracto enriquecido del pigmento producido por el aislamiento UV-resistente denominado UV13) para continuar el trabajo. Las etapas de purificación del pigmento seleccionado se realizaron en colaboración con el Dr. Danilo Davyt (Laboratorio de Química Farmacéutica, Facultad de Química, Udelar), y se describen a continuación.

Purificación por columna de sílica: 84 mg del EMUV13 se colocaron en una columna de vacío de flash sílica (Sigma #381276, EEUU) de 20 g. Como fase móvil se utilizaron 100 mL de mezclas de hexano ppa (Dorwil) y acetato de etilo (AcOEt) ppa (Dorwil) a diferentes relaciones (hexano 100%, hexano 80:20 AcOEt, 60:40, 40:60, y 100% de AcOEt; se agregó 10% de MeOH para facilitar la disolución del pigmento). Las fracciones se colectaron 100 mL de cada fase, se evaporaron a presión reducida, se pesaron y disolvieron en DMSO (1 mg/mL) para su evaluación biológica e identificación. Las fracciones purificadas se evaluaron en su actividad antiproliferativa y sensibilizadoras al CDDP como se describió anteriormente, a las concentraciones (0,01, 0,1, 1 y 10 µg/mL). La fracción AcOEt (FAE) activa se reservó para su posterior purificación.

Purificación de la FAE del EMUV13, por cristalización: Se disolvieron 24,3 mg de la fracción activa FAE en acetona caliente y se filtró con papel de filtro. La fracción se colocó en un balón cerrado y opaco con una salida de gases y una corriente baja de nitrógeno durante una semana. El precipitado se disolvió en DMSO (1 mg/mL), para su evaluación biológica e identificación.

5.1.6 Identificación del pigmento

La fracción purificada del pigmento se identificó realizando espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) y por espectrometría de masas (MS). El precipitado coloreado, obtenido por centrifugación, se identificó por espectrometría de masas (DI-EI-MS) utilizando un Shimadzu QP-2010 plus, y por impacto electrónico DI (EI) a 70 eV. La identificación también se realizó mediante espectroscopía de RMN. Los espectros de RMN ^1H de la fracción (1,5 mg) suspendida en dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) se registraron en un equipo Bruker Avance 400. Los cambios químicos se expresan en parte por millón (ppm) con respecto al tetrametilsilano (TMS), J en Hertz.

5.2 Estrategia experimental para el cumplimiento del segundo objetivo: "Producción de violaceína de UV13 a mayor escala y evaluación de su actividad antiproliferativa en HeLa"

Una vez seleccionado el pigmento de estudio, de obtenerlo puro y conocer su identidad química, se procedió a la optimización de la producción del mismo por parte del aislamiento bacteriano de origen Antártico (denominado UV13). Este trabajo se realizó en colaboración con la Dra. Verónica Saravia del Departamento de Bioingeniería, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República.

5.2.1 Optimización de la producción del pigmento

Primero se analizó el efecto de la temperatura en el crecimiento de UV13 y la producción del pigmento. Para ello, se obtuvieron pre-cultivos de la cepa UV13 en tubos de 10 mL con 3 mL de TSB 3 g/L y se cultivaron en una incubadora orbital a 200 rpm y 20 °C, durante toda la noche. Se transfirieron alícuotas de estos cultivos frescos a un matraz de 250 mL conteniendo 50 mL de TSB de 3 g/L a una densidad óptica inicial (DO) de 0,05 a 660 nm (aproximadamente 10^7 unidades formadoras de colonias por mL; UFC/mL) y se cultivaron a 20 °C, 25 °C y 30 °C, a 200 rpm durante 48 h. El crecimiento celular se monitoreó mediante medida de absorbancia a 660 nm. La producción del pigmento se determinó mediante medidas de absorbancia a 575 nm

de la siguiente manera: se centrifugó 1 mL de cultivo (6000 rpm, 15 min, 4 °C) y el sedimento se suspendió en 5 mL de metanol, se calentó a 65 °C durante 15 min, y se centrifugó (6000 rpm, 15 min) (el procedimiento de extracción de pigmento se repitió hasta el blanqueo del pellet celular; y los sobrenadantes coloreados se agruparon). El sobrenadante se evaporó a presión reducida y luego se suspendió en 1 mL de etanol. La producción del pigmento se evaluó midiendo la absorbancia de los EMs a 575 nm (máximo de absorción del pigmento determinado según los espectros de absorción).

Una vez seleccionada la temperatura óptima de crecimiento y producción del pigmento, se realizó un segundo grupo de experimentos para estudiar la influencia de la composición del medio de cultivo en el rendimiento de producción de la biomasa y del pigmento. Se evaluó el efecto de la concentración de TSB (3 g/L, 15 g/L y 30 g/L), así como el agregado de diferentes potenciales inductores de la producción del pigmento, tales como glicerol (1 y 5%), triptófano (10 y 25 mM), butirato de sodio (10 mM y 25 mM), Tween 80 (1 y 5%) y glucosa (1.8 y 3.6 g/L). El estudio se realizó en tubos con 3 mL de medio en un agitador orbital a 20 °C y 200 rpm, con una biomasa inicial equivalente a una OD de 0,05, medido a 660 nm. El crecimiento celular y la producción del pigmento se midieron después de que 48 h según lo descrito anteriormente.

Se realizaron dos experimentos independientes, con tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas por medida. Se realizó el estudio estadístico mediante el test de multicomparación de Tukey.

5.2.2 Crecimiento de UV13 y producción del pigmento en matraces (escalado)

Como paso intermedio al escalado a un bioreactor, se realizó una determinación del crecimiento y la producción del pigmento por UV13, en matraces conteniendo 50 mL de medio de cultivo, en las condiciones seleccionadas según los experimentos descritos más arriba.

Se evaluó la producción de biomasa y del pigmento, así como el consumo de glucosa en un matraz de 250 mL, conteniendo 50 mL de TSB 3 g/L, en ausencia y en presencia de 1,8 y 3,6

g/L de D(+)-glucosa, a 20 °C y 200 rpm. El matraz se inoculó con UV13 (como se describió anteriormente en 5.2.1), y se tomaron muestras de 1 mL del cultivo para monitorear la producción de biomasa y pigmento a las 24, 32, 48 y 52 h según lo descrito anteriormente. Además, se determinó la presencia de glucosa por HPLC a través de un cromatógrafo Shimadzu Lab Solution equipado con detector de índice refractivo (refractive index detector (RID-10A) y una columna Aminex HPX-87H a 45 °C. Se utilizó agua ultrapura como fase móvil a un flujo de 0,6 mL/min (Guigou *et al.*, 2019).

5.2.3 Producción del pigmento en biorreactor (escalado)

Las células UV13 se cultivaron en un biorreactor de tanque agitado de 5 L (BIOSTAT® Sartorius Stedim, Alemania) con un volumen de trabajo de 1,5 L. Para ello, el biorreactor que contenía el medio (3 g/L de TSB con 3,6 g/L de glucosa) se esterilizó en autoclave durante 20 min en condiciones estándar. Posteriormente, el biorreactor se inoculó con un cultivo fresco de UV13 que inicialmente alcanzaba una DO de 0,05 como se describió anteriormente. El curso del tiempo, de pH y OD se monitoreó en línea. La temperatura se ajustó a 20 °C y se mantuvo con agua refrigerada y una manta eléctrica. La agitación se estableció inicialmente a 150 rpm y se ajustó manualmente para mantener una mezcla adecuada. La formación de espuma se controló mediante la adición de una mezcla de silicona USP y polipropilenglicol (20:20) en agua, cuando fue necesario. Se tomaron muestras (5 mL) y se determinó la biomasa (por OD a 660 nm) como se describió anteriormente. Luego, la muestra se centrifugó (6000 rpm, 4 °C durante 10 min) y, los sobrenadantes y el pellet celular se almacenaron a -20 °C para la determinación de glucosa (por HPLC) y contenido del pigmento, respectivamente, como se describió anteriormente. La concentración de pigmento se calculó utilizando un coeficiente de extinción (ϵ) de 56,01 mL mg⁻¹ cm⁻¹, en etanol a 575 nm (Mendes *et al.*, 2001). Finalmente, el volumen de cultivo restante (colectado a las 96 h de cultivo) se usó para la extracción, purificación e identificación química final del pigmento, como se describe a continuación.

5.2.4 Extracción, purificación e identificación química del pigmento

Debido al aumento en escala del volumen del cultivo, se debió ajustar el proceso de purificación descrito en la sección 5.1.5. El cultivo obtenido del biorreactor (crecimiento de 96 h; 1,5 L) se mezcló con NaCl a una concentración final de 0,5 M (para la agregación de polisacáridos) y 200 mL de butanol, y se incubó a 65 °C durante 15 min. Luego, la mezcla se centrifugó (4000 rpm, 4 °C, 15 min) y la fase butanólica púrpura se secó en un equipo de evaporador rotativo. El polvo se lavó dos veces con 100 mL de hexano y 100 mL de diclorometano, y el sedimento se secó nuevamente a presión reducida, y luego se disolvió en MeOH. Finalmente, se agregaron dos volúmenes de agua destilada fría y la mezcla se incubó a 4 °C, durante toda la noche, para la cristalización del pigmento. El precipitado coloreado, obtenido por centrifugación, se identificó por espectrometría de masas (DI-EI-MS) y mediante espectroscopía de RMN como se describió anteriormente (Sección 5.1.6).

5.2.5 Cultivos celulares

Se establecieron cultivos de la línea derivada de cáncer de cuello uterino HeLa en el medio mínimo esencial (MEM, Minimum Essential Medium, Gibco # 11095080, Gaithersburg, Maryland, USA), suplementado con L-glutamina 1 mM, penicilina–streptomina 1% p/v y 10% v/v de SFB (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Alemania). Los cultivos se mantuvieron en atmósfera con CO₂ al 5% v/v, a 37 °C. Las células HeLa se obtuvieron de la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC; <http://www.abac.org.ar/>).

5.2.5 Actividad antiproliferativa y quimio-sensibilizadora del pigmento en línea de cáncer de cuello uterino HeLa

Para la determinación de la actividad antiproliferativa, se realizó el ensayo de reducción de la RZ explicado anteriormente y el ensayo de sulforodamina B (SRB), donde las células son fijadas y luego la SRB tiñe las proteínas presentes (Pérez *et al.*, 2019). Para esto, se estableció el cultivo de la línea celular HeLa (derivada de cáncer cervical) por siembra en placas de 96

pocillos, colocando 5000 células por 100 μL de medio MEM al 10 % v/v de SFB, se colocaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 5% v/v de CO_2 . Se evaluaron diferentes concentraciones de violaceína (75-1400 nM) durante 24 h. Para determinar el efecto quimo-sensibilizador de la violaceína, se evaluó el efecto del agregado de diferentes concentraciones de violaceína en presencia de CDDP 10 μM . Se utilizó DMSO como control del vehículo.

En el ensayo de RZ, luego de 20 h de incubación se retiró el medio de cultivo y se colocaron 100 μL de RZ 0,025 mg/mL preparada en PBS. La fluorescencia se midió utilizando una longitud de onda de excitación de 530-560 nm y de emisión a 590 nm, utilizando un espectrofluorímetro (Varioskan). Por otro lado en el ensayo de SRB, las células se lavaron con PBS a temperatura ambiente, se fijaron durante la noche con 200 μL de ácido acético al 1% en metanol a - 20 $^{\circ}\text{C}$. Luego, la solución se desechó y la placa se secó a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 h. Se añadieron 100 μL de una solución de 0,057 % p/v de SRB en ácido acético al 1% a cada pocillo y se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 h. Después de este paso, la solución se desechó y la placa se lavó rápidamente tres veces mediante la adición de 200 μl de ácido acético al 1% v/v en agua purificada MilliQ y se secó durante 1 hora a 37 $^{\circ}\text{C}$. Finalmente, se añadieron 100 μL de 10 M de Tris-NaOH, pH 10,5, y la placa se agitó durante 10 minutos en un agitador orbital a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 510 nm en un espectrofluorímetro (Varioskan).

La CI50 de los compuestos se determinó como la concentración que reduce la viabilidad celular en un 50% en comparación con el control tratado con DMSO, y se determinó mediante análisis de regresión lineal. Se realizaron tres experimentos independientes, por triplicado. Se realizó la prueba estadística de Sidak.

5.2.6 Ensayo de micronúcleos

El ensayo de micronúcleos se realizó según Fenech (2007) con modificaciones. Resumidamente, se sembraron 10^5 células HeLa en placas de 35 mm y se incubaron en condiciones de cultivo durante 24 h, luego se trataron con 150 y 300 nM de violaceína, en

presencia o ausencia de 5 μ M de CDDP. Se usó 1% DMSO como control de vehículo. Luego de seis horas, se agregó citocalasina B (3 μ g/mL) y las células se incubaron a 37 °C y 5% CO₂ por 18 h. El mismo diseño experimental se realizó en presencia de cafeína 4 mM (Baker # 02-002-696, EEUU) para estimular la división celular. Luego, las células se colectaron y centrifugaron a 1000 rpm por 5 min. El sobrenadante fue descartado, y se agregó una solución hipotónica de KCl 75 mM a 4 °C, seguido de una pre fijación con metanol:ácido acético (3:1) a 4 °C. Finalmente, las células se fijaron con 1% de ácido acético en metanol. Se realizaron los extendidos en portaobjeto, se tiñeron con ioduro de propidio (IP, Sigma Aldrich #P4170, EEUU) y se analizaron en un microscopio de epifluorescencia (ZEISS, AXIOPLAN II, Oberkochen, Alemania). Para la determinación del Índice de División Nuclear (IDN) se contaron al menos quinientas células por preparado, el $IDN = (MN + 2BN + 3TN + 4FN) / N$; siendo célula mononucleada, célula binucleada, célula trinucleada, célula tetranucleadas respectivamente, y N células totales. Para la frecuencia de micronúcleos ($FMN = Mi / BN$; siendo Mi el número de micro núcleos y BN el número de células binucleadas evaluadas) se analizaron 500 células binucleadas en cada portaobjetos según Fenech (2007). El ensayo se realizó en tres experimentos independientes y todos los tratamientos se realizaron por duplicado. Se realizó la estadística usando One-way ANOVA y test de Tukey.

5.3 Estrategia experimental para el cumplimiento del tercer objetivo: “Evaluación de la actividad antiproliferativa de la violaceína en líneas de cáncer de vejiga”

Una vez purificado el pigmento e identificado como violaceína, se estudió el efecto anti-proliferativo como sensibilizador al CDDP de la violaceína sobre las líneas derivadas de cáncer de vejiga.

5.3.1 Cultivos celulares

Se emplearon las líneas celulares tumorales T24 y 253 J, proporcionadas por la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC; <http://www.abac.org.ar/>), las cuales se cultivaron según lo descrito en la sección 5.1.3.

La actividad antiproliferativa y sensibilizadora se determinó usando el método de reducción de RZ como se describió anteriormente (sección 5.1.4) evaluando las concentraciones de violaceína 75 -1400 nM, en presencia o ausencia de CDDP 10 μ M. Además se estudió el efecto del CDDP a diferentes concentraciones (2,5-80 μ M) y el CDDP en combinación con 150 nM de violaceína.

5.3.2 Ensayo de micronúcleos

Se realizó el ensayo de micronúcleos en las líneas T24 y 253 J según lo descrito anteriormente. Se evaluaron las concentraciones 150 y 300 nM en presencia o ausencia de 10 μ M de CDDP. Para estimular la división celular se agregó caféina 4 mM. Se usó como control de vehículo DMSO al 1% v/v. Se realizó la estadística usando One-way ANOVA y test de Tukey.

5.4.3 Ensayo Cometa

Para determinar el daño primario en el ADN se evaluó el ensayo de electroforesis de célula única en condiciones alcalinas (ensayo Cometa). Resumidamente, se sembraron 10⁵ células T24 o 253 J en placas de 35 mm de diámetro en las condiciones de cultivo previamente descritas (sección 5.1.1) por 24 h. Luego, los cultivos se trataron con violaceína 300 y 500 nM, en

presencia o ausencia de CDDP 10 μ M por 24 h. Se usó DMSO 1% como control negativo. Como control positivo las células se expusieron a 100 μ M de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las células se incubaron por 3 h a 37 °C y 5% CO_2 . Luego las células se tripsinizaron y centrifugaron por 5 min a 1200 rpm y el pellet celular se suspendió en 40 μ L de PBS. Se prepararon los portaobjetos mezclando 20 μ L de la solución de células con 80 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (0,5%). Se colocó un cubreobjetos y se dejó solidificar a 4 °C por 10 min. Luego se retiró el cubreobjeto y se lisaron las células en una solución tampón de lisis a 4 °C (pH 10, NaCl 2,5 M, Na_2EDTA 100 mM, Tris-HCl 10 mM, and Triton X-100 1%) por 1 h, a 4 °C. Los preparados se colocaron en una cuba de electroforesis horizontal y se cubrieron con una solución alcalina de electroforesis a pH 13 (NaOH 300mM y NaEDTA 1 mM). Los preparados se dejaron en esta solución durante 15 min para permitir la separación de las hebras de ADN. Luego, se realizó la corrida electroforética a 0,7 V/cm (300 mA) por 15 min a 4 °C. Inmediatamente, los preparados se lavaron con una solución de neutralización pH 7,5 (0,4 mM Tris-HCl) por 5 min a temperatura ambiente. Finalmente los preparados se tiñeron con 50 μ L de IP (10 μ g/mL). Las muestras se analizaron utilizando el programa Comet Imager (MetaSystems, Altlußheim, Alemania). Se contaron al menos 50 núcleos por preparado (dos preparados por tratamiento o control). Se realizaron tres experimentos independientes. El daño se cuantificó como el momento de cola de Olive (*Olive Tail Moment*), el cual representa la extensión del daño en el ADN en una célula individual (el producto de la fracción de ADN migrado y la distancia en la media de la cabeza y la cola del cometa) (Olive and Banáth, 2006). Se realizó la estadística usando One-way ANOVA y test de Tukey.

5.3.4 Estudio del ciclo celular

Para determinar el efecto de la violaceína en el ciclo celular se sembraron 1×10^6 células en placas de 10 cm de diámetro en condiciones de cultivo durante 24 h. Luego se colocaron 300 y 500 nM de violaceína en presencia o ausencia de CDDP 10 μ M por 24 h. Luego del tratamiento las células se colectaron y fijaron en etanol 70% a -20 °C por al menos 30 min. Posteriormente,

las células se centrifugaron, resuspendieron en PBS y trataron con 50 µg/mL de ARNasa. Finalmente se tiñeron con 50 µg/mL de IP y se analizaron en un citómetro de flujo y clasificador celular *MoFlo Astrios EQ* (Beckman Coulter, EE UU), usando un láser azul (488 nm) y una boquilla de 100 µm (operando a 25 psi). La calibración del citómetro y su control de calidad diario fue realizada con microesferas fluorescentes 3.0 µm *Ultra Rainbow Fluorescent Particles* (Spherotech, EE UU). La señal de dispersión frontal (*Forward Scatter*, FSC) fue detectada en FSC1 colocando máscara P1 delante del detector. Los datos del fotomultiplicador de FSC1 con máscara P1 y los de dispersión lateral (*Side Scatter*, SSC) se obtuvieron en escala lineal. Para el análisis de ciclo celular, la fluorescencia emitida por el IP se detectó usando un filtro de banda 620/29 con amplificación lineal. Los dobletes se excluyeron usando gráficos de 620/29-Area versus 620/29-Ancho empleando el software Kaluza (Beckman Coulter, EE UU). Se colocaron marcadores en los histogramas de contenido de ADN (620/29-A), identificando los porcentajes relativos de células con contenido de ADN en G1, S, G2/M y Sub-G1. Para mayor detalle del análisis de datos ver Anexo I.

5.3.5 Estudio de la apoptosis

Para realizar el estudio de la inducción de apoptosis se utilizó el kit de Anexina V (BD Biosciences). Se sembraron 5×10^5 células en placas de 60 mm y se colocaron en condiciones de cultivo. Luego de 24 h, las células se trataron con 150, 300 y 500 nM violaceína, en presencia o ausencia de CDDP 10 µM, por 24 h, se utilizó 2,5 µM de Camptotecina (CPT) como control positivo. Las células se cosecharon, lavaron dos veces con PBS frío y se resuspendieron en solución de unión (0,01 M HEPES (pH 7,4), 0,14 M NaCl, 2,5 mM CaCl₂) a una concentración aproximada de 1×10^6 células/mL. Posteriormente la suspensión celular se tiñó con 5 µL de Anexina V- FITC y 10 µg/mL de IP a temperatura ambiente por 15 min en la oscuridad. Las células se analizaron inmediatamente. El análisis se realizó en un citómetro de flujo y clasificador celular *Mo Flo Astrios EQ* (Beckman Coulter, USA). La señal de FITC se detectó con filtro 513/26 y la señal del IP con filtro 710/45. Ambos detectores se operaron con

escala logarítmica (4 décadas). Luego de excluidos los dobletes en un gráfico de FSC1 P1-Area y FSC1 P1-Width, se realizó un análisis por cuadrante para obtener los porcentajes relativos de células normales (IP y FITC negativas), células necróticas (IP positivas, FITC negativas), células apoptóticas tempranas (IP negativas y FITC positivas) y células apoptóticas tardías (IP positivas y FITC positivas). Los datos citométricos se adquirieron y analizaron con el programa Summit versión 6.3.1 (Beckman Coulter, EE UU). Para mayor detalle del análisis de datos ver Anexo I.

5.3.6 Ensayo de cierre de herida

Para evaluar la inhibición de la migración celular, se realizó el ensayo de herida (Ravi *et al.*, 2015). Se sembraron 5×10^5 células por pocillo en placa de 6 pocillos, se mantuvieron por 24 h en condiciones de cultivo como se mencionó anteriormente. Con el cultivo confluyente, se realizó una herida con un *tip* de 200 μ L generando una herida en el cultivo. Se limpiaron los restos con PBS y se colocaron 300 y 500 nM de violaceína en medio completo, empleando 1% de DMSO en medio completo como control. Se tomaron cuatro imágenes por réplica a tiempos 0 y 24 h en un microscopio de contraste de fases. Se midió el área de la herida en cada una de las fotos realizando la medición del área con el programa Image J. Se calculó el porcentaje de cobertura del área como:

% de herida = $(At_0 - At_f) / At_0 \times 100$, siendo At_0 el área de la herida a tiempo 0 y At_f el área de la herida a tiempo final.

5.3.7 Evaluación de la viabilidad en cultivos independientes de sustrato (esferoides multicelulares)

Para determinar el efecto de la violaceína sobre crecimientos tridimensionales independientes de sustrato, se realizó el ensayo de esferoides evaluados mediante la reducción de RZ (Ivanov *et al.*, 2014). Se trataron inicialmente placas de 96 pocillos con 50 μ L de agarosa 1,5 %. Una vez solidificada la agarosa, se sembraron 30×10^3 células de T24 y 253 J por pocillo en 200 μ L de

medio completo y se colocaron en condiciones de cultivo durante cuatro días. Al cuarto día cuidadosamente se retiraron 100 μ L de sobrenadante y se colocaron las distintas concentraciones de violaceína a evaluar (75-1400 nM), empleando DMSO como control de vehículo. Los tratamientos se dejaron en condiciones de cultivo durante 20 h. A las 20 h, se quitaron 100 μ L de sobrenadante y se colocó una solución de RZ durante 4 h en condiciones de cultivo. La reducción de RZ se cuantificó en espectrofluorímetro (Varioskan), según lo descrito anteriormente.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPITULO I

6.1 Búsqueda de compuestos anti-proliferativos partiendo de extractos metanólicos de pigmentos producidos por bacterias antárticas

En el primer capítulo se evaluó la posible actividad anti-proliferativa de los extractos alcohólicos enriquecidos en pigmentos de bacterias antárticas en una línea derivada de cáncer de vejiga. Luego se procedió a purificar e identificar sus compuestos activos mediante la estrategia de búsqueda bioguiada.

6.1.1 Obtención de los extractos alcohólicos de bacterias antárticas enriquecidos en pigmentos

Luego de la extracción de los pigmentos utilizando metanol (Tabla 4), se encontró que el procedimiento permitía la extracción de todos los pigmentos, excepto para el pigmento producido por el aislamiento *Sphingomonas* sp. UV12.

Tabla 4. Extractos metanólicos de bacterias antárticas. Se detallan los rendimientos obtenidos.

ID	Genero	Color	Pellet bacteriano (g)	Extracto peso seco (mg)	% de rendimiento
UV1	<i>Janthinobacterium</i>	Crema	1,66	24,6	1,48
UV9	<i>Sphingomonas</i>	Naranja	1,32	89,3	6,76
UV11	<i>Hymenobacter</i>	Rojo	16,25	19,9	0,12
UV12	<i>Sphingomonas</i>	Amarillo	2,63	29,5*	1,12
UV13	<i>Janthinobacterium o Duganella</i>	Violeta	8,32	27,6	0,33
UV15	<i>No identificada</i>	Amarillo	13,76	31,2	2,26

* No se logró extraer el pigmento. % de rendimiento = (masa extracto peso seco/masa pellet bacteriano) x 100.

6.1.2 Espectros de absorción UV- visible de los EMs

En la Figura 4 se muestran los espectros de absorción de los EMs enriquecidos en pigmentos de las bacterias antárticas estudiadas, donde se observan los máximos de absorción para cada caso. Los mismos fueron de 450 nm, 475 nm, 575 nm y 435 nm para los EM de los pigmentos extraídos de los aislamientos UV9, UV11, UV13 y UV15, respectivamente. Los espectros de los EMs UV1 y UV 12 no presentaron color y no mostraron picos de absorción en el espectro visible. La información obtenida de este ensayo permitió definir a que longitud de onda se puede realizar un seguimiento de la producción de los pigmentos.

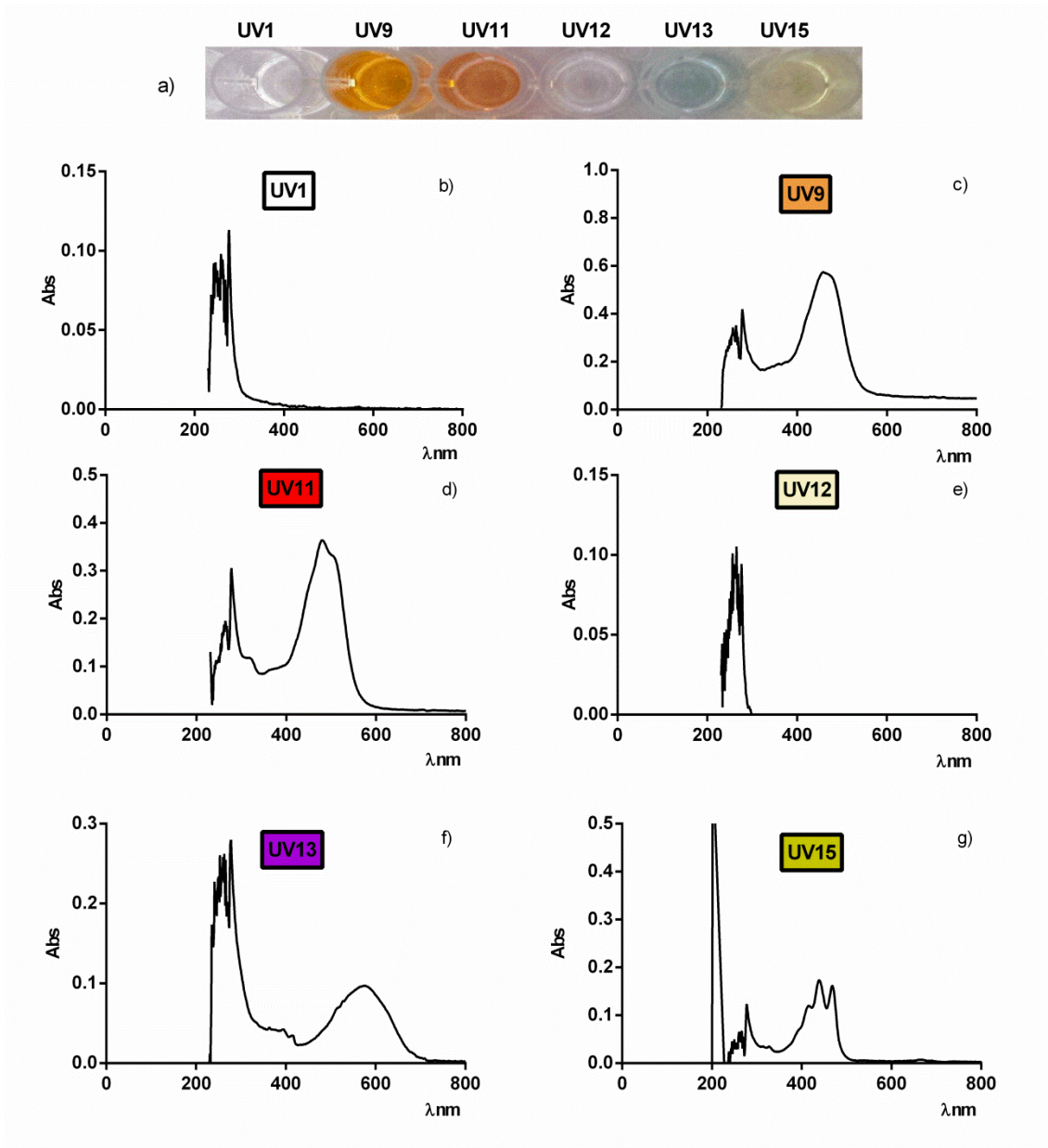


Figura 4. Colores de los pigmentos y espectros de absorción de los EMs. a) Imagen de los EMs de los pigmentos, según se observa en placa de 96 pocillos. Los espectros de absorción de los EMs de b) UV1 y e) UV12 no presentan señales en el visible. Los espectros de absorción de los siguientes EMs y presentan picos de absorción en el visible: c) UV9 naranja, Max = 450 nm; d) UV11 rojo, Max = 480 nm; f) UV13 violeta, Max = 575 nm; g) UV15 amarillo limón, Max 435 nm y 465 nm.

6.1.3 Actividad antiproliferativa de los EMs

Una vez obtenidos los extractos, se evaluó su actividad antiproliferativa en la línea T24, empleando el ensayo MTT. En la Figura 5 se muestran los resultados obtenidos luego de analizar la actividad antiproliferativa de los diferentes EMs, a diferentes concentraciones. Los resultados sugieren que solamente el EMUV13 mostraría actividad antiproliferativa cuando se lo utilizó a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ reduciendo a un 46,7 % la viabilidad respecto al control con DMSO.

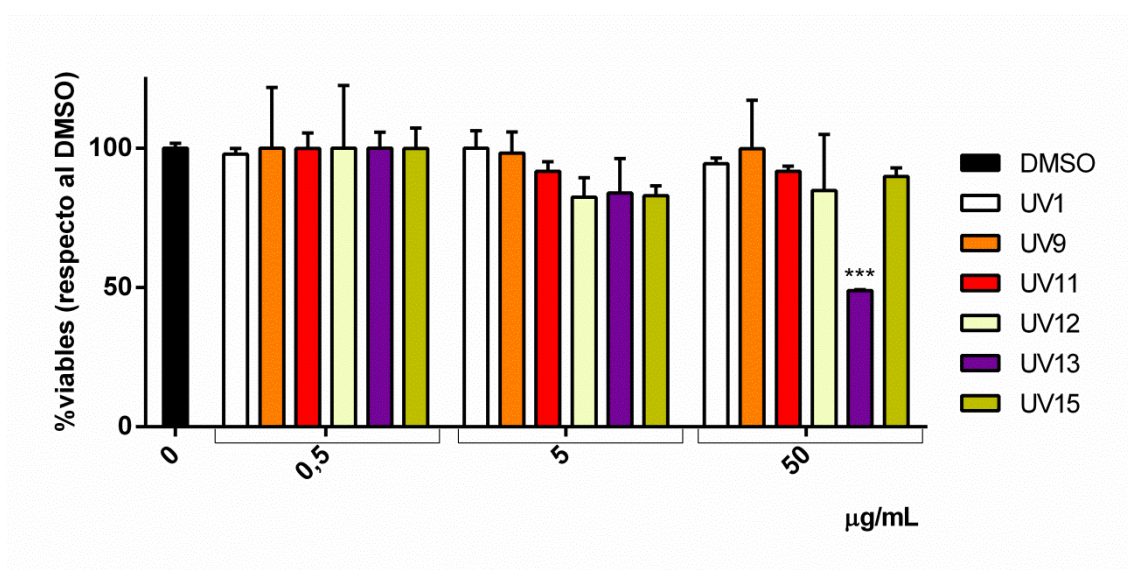


Figura 5. Actividad antiproliferativa de los EMs por 24 h en la línea T24, evaluados mediante MTT. Los resultados se muestran como la media más el desvío estándar en grupos de barras dependiendo de la concentración del EM ensayada, de tres experimentos independientes. Cada color de barra señala un tratamiento diferente. Los resultados se trataron en forma estadística mediante el test one way ANOVA y el test de multicomparación de Tukey. *** indica $p \leq 0,001$ respecto al control de DMSO.

Además, se evaluó el posible efecto sensibilizador de los extractos en concentración final CDDP a 15 μM . Los resultados (Figura 6) sugieren que el EMUV13 sería el único extracto pigmentado que produjo una reducción significativamente del número de células viables relativo al CDDP. A partir de estos resultados, se decidió continuar el trabajo con la purificación e identificación del o los principios activos del EMUV13.

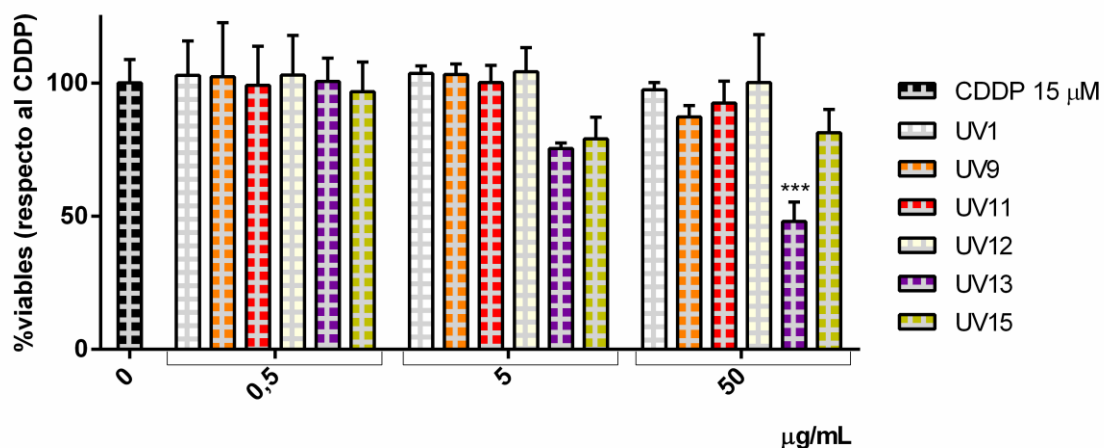


Figura 6. Estudio de la combinación de los EMs combinados con CDDP 15 µM. Los resultados se muestran como la media más el desvío estándar en grupos de barras dependiendo de la concentración del EM ensayada. Se realizó tratamiento estadístico mediante el test one way ANOVA y el test de multicomparación de Tukey. *** indica $p \leq 0,001$ respecto al control de DMSO

6.1.4 Purificación de la fracción activa presente en EMUV13

Una vez definido el EM con el cual se continuaría el trabajo, se procedió a su purificación mediante fraccionamiento bioguiado. En la Figura 7 se observa la apariencia de los eluidos cuando se realiza una purificación utilizando sílica gel como matriz, y utilizando distintas mezclas de hexano (Hex) y acetato de etilo (AcOEt) como fase móvil, partiendo del menos polar como el Hex puro al AcOEt mezclado con 10 % de MeOH. Los resultados anteriores sugieren que el mejor solvente para la purificación del pigmento violeta activo sería el AcOEt y la mezcla de AcOEt con MeOH 10%. Cuando se utilizó esta mezcla, se observó que se solubilizan partículas del pigmento que habían precipitado en la columna, sugiriendo que el agregado de metanol a la solución de elución aumenta el rendimiento de obtención del pigmento purificado.

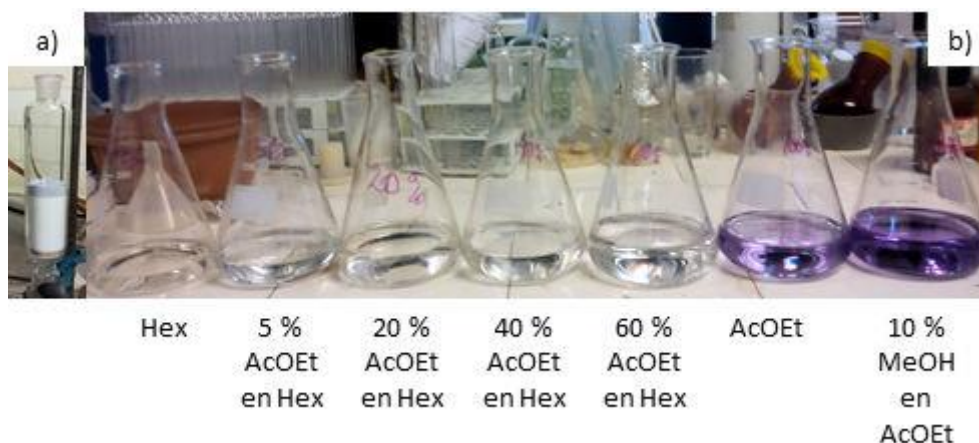


Figura 7. Purificación del pigmento en columna de sílica. a) Columna de sílica cargada con EMUV13. b) Eluciones de la columna con distintas mezclas de hexano (Hex) y acetato de etilo AcOEt). 1) Hex; 2) 5% AcOEt en Hex; 3) 20% AcOEt en Hex; 4) 40% AcOEt en Hex; 5) 60% AcOEt en Hex; 6) AcOEt y 7) 10% MeOH en AcOEt.

Una vez obtenidas las diferentes fracciones de elución se procedió a evaluar la actividad antiproliferativa en T24 de las fracciones, a modo de identificar la o las responsables de la actividad del extracto. Para ello se estudió el efecto de las fracciones frente a la línea tumoral derivada de cáncer de vejiga T24, por el método de reducción de la RZ. En la Figura 8 solo se muestran los resultados obtenidos utilizando la fracción del pigmento purificando con acetato de etilo (FAE) como solvente, pues fue la única que presentó actividad antiproliferativa en las condiciones ensayadas a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; es de destacar que el EMUV13 (sin purificar) no presentó actividad a esta concentración. Además, se observó un aumento de la concentración del pigmento en la FAE evidenciada por un aumento en la absorbancia a 575 nm. Mientras la absorbancia del EM 1mg/mL fue 0,07 U Abs (unidades de absorbancia), la absorbancia de la FAE 1 mg/mL fue de 0,34 U Abs. De este modo se observa un aumento de la actividad antiproliferativa a medida que aumenta la concentración de del pigmento. Además la FAE incrementó la actividad antiproliferativa del CDDP, sugiriendo que habría un efecto potenciador de la FAE sobre la actividad antiproliferativa del cisplatino.

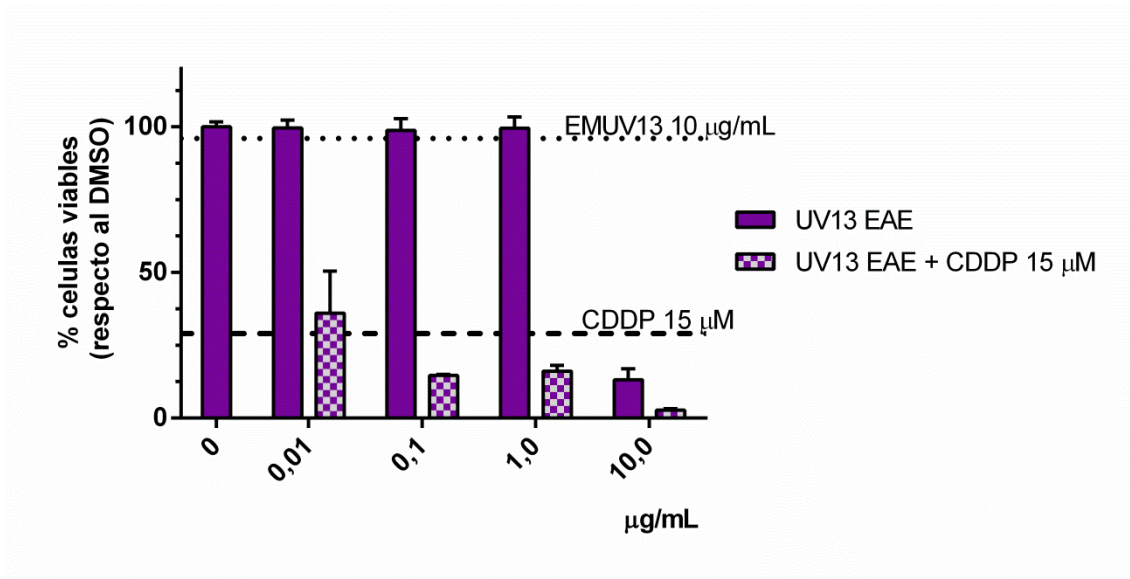


Figura 8. Efecto de la FAE en la línea T24 por 24 h evaluada mediante ensayo de RZ. Se muestran media y desvío estándar de la actividad de la FAE (violeta) y FAE combinado con CDDP 15 μM (violeta con gris). En el eje x se indica la concentración de FAE que se utilizó en cada ensayo. Se observa la actividad antiproliferativa de la fracción acetato de etilo y su efecto combinado con el CDDP. Las líneas puntuadas representan la actividad promedio normalizada respecto al DMSO del EMUV13 a 10 $\mu\text{g/mL}$ (...) y CDDP 15 μM (---). Se realizaron dos ensayos independientes con tres réplicas biológicas.

Una vez verificado que la fracción purificada del pigmento, utilizando acetato de etilo y metanol como solvente, presentaba actividad antiproliferativa, se procedió a su identificación química. Para ello, se realizó el estudio de la FAE por espectrometría de masas. El espectro de masas obtenido (Figura 9) muestra que existe una señal con m/z de 343, que coincide con la señal del pigmento violaceína descrita (Rettori and Durán, 1998), pero también se evidencian otras señales correspondientes a otras moléculas. Con este estudio se verificó la presencia del pigmento violaceína en el extracto purificado, pero también se encontró que existirían impurezas, por lo que se continuó optimizando los procesos de purificación.

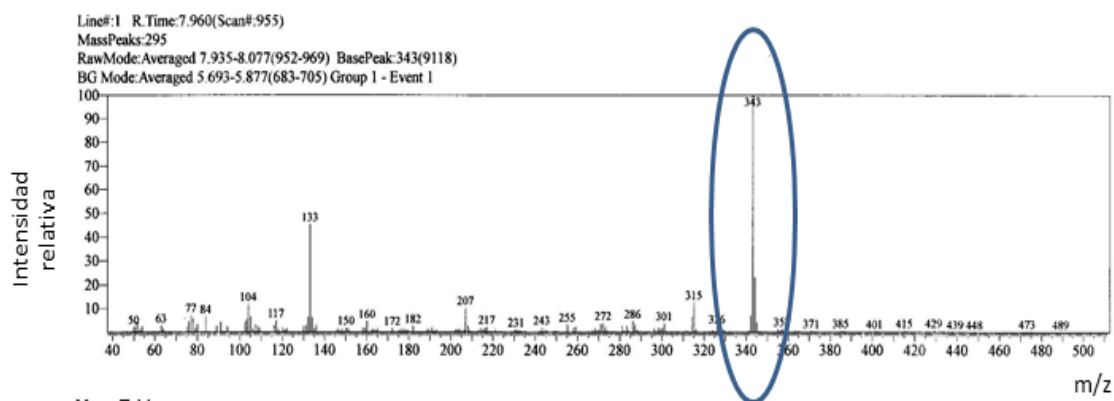


Figura 9. Espectro de masas de la FAE. Se observa una señal de m/z 343 que coincide con la señal del pigmento violaceína, así como otras señales menos marcadas.

Si bien se observó un aumento en la actividad antiproliferativa de la fracción FAE respecto al EM del cual se purificó, así como un aumento en la concentración del pigmento, la FAE contenía impurezas, por lo que se procedió a realizar la purificación de la FAE del EMUV13 por cristalización. La FAE (24,3 mg), se suspendió en acetona, se filtró y se la colocó con una corriente de nitrógeno permitiendo la salida de gases, a medida que se desplazan los gases el pigmento se agrega formando “cristales” que precipitan. De esta manera se logró recuperar 1 mg del precipitado o fracción cristalizada (FC) que se disolvió en DMSO para su análisis químico.

Para identificar el pigmento se realizó el estudio de RMN de la FC (Figura 10). En ésta se observó que los espectros de RMN coinciden con las señales de características de los aromáticos que corresponden a los protones de violaceína. Además, se verificó que no existen señales asignables a otras moléculas. Siguiendo este procedimiento se logró poner a punto un método que permite obtener violaceína en estado de pureza. Sin embargo, la cantidad purificada no fue suficiente para el desarrollo del resto de las actividades del trabajo. Por este motivo, en el siguiente capítulo de la tesis se abordará la optimización de la producción y purificación del compuesto.

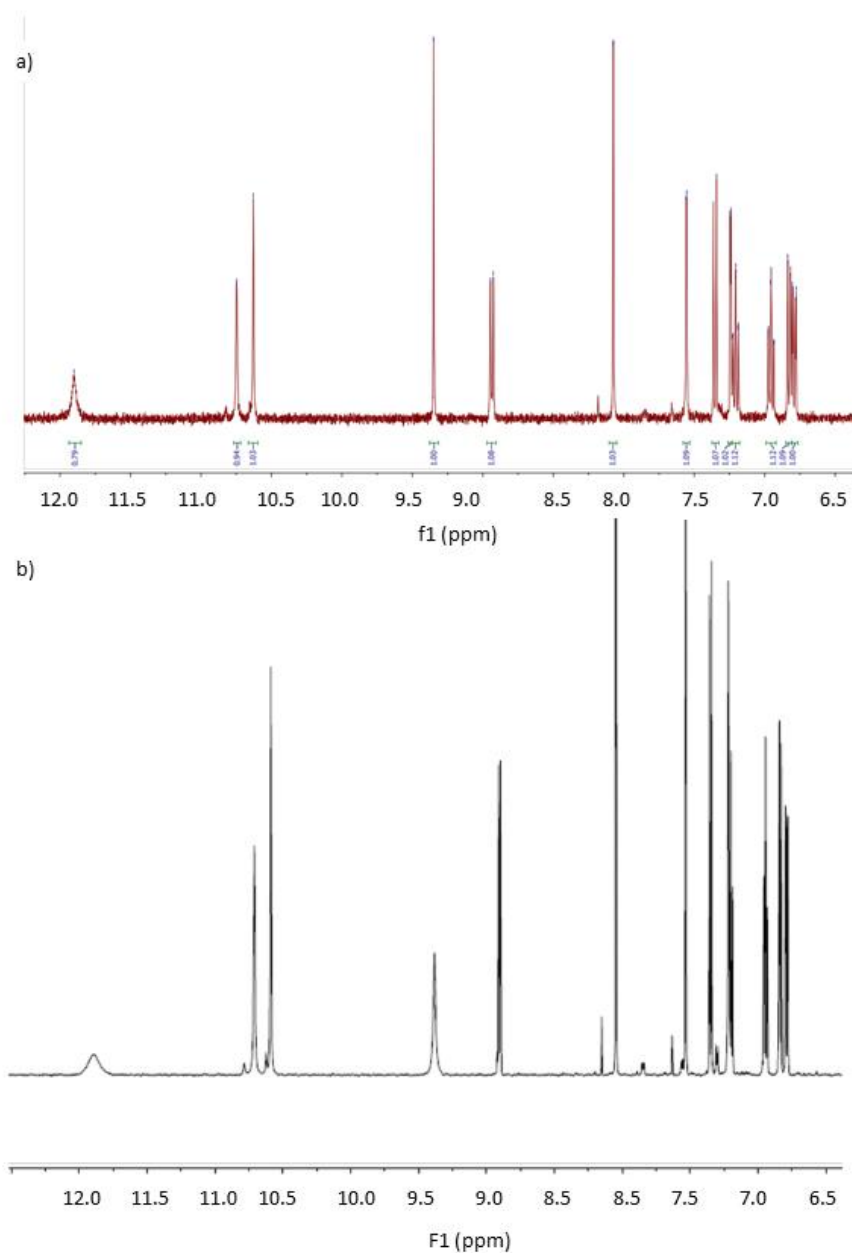


Figura 10. Espectro ¹H-RMN en DMSO-*d*₆ de la violaceína a) Ampliación del espectro ¹H-RMN del pigmento de UV13 b) Espectro de un estándar de violaceína publicado por Atalah *et al.* (2019). Se identifican señales de características aromáticos que corresponden a los protones de violaceína Las señales del espectro obtenido son idénticas a las de referencia para el compuesto

DISCUSIÓN CAPITULO I

De los EMs provenientes de las bacterias antárticas evaluadas, solamente el extracto proveniente de la bacteria identificada como Oxalobacteraceae cepa UV13 presentó actividad antiproliferativa y aumentó el efecto citotóxico del CDDP en la línea T24 derivada de cáncer de vejiga. El pigmento se purificó e identificó como violaceína. El pigmento puro mostró también actividad antiproliferativa y sensibilizante al cisplatino.

La violaceína es un pigmento producido por bacterias de varios géneros, entre ellos *Chromobacterium violaceum*, *Janthinobacterium lividum*, *Alteromonas luteo violacea*, *Duganella* sp. (Durán *et al.*, 2012; Choi, Yoon, *et al.*, 2015). Químicamente es un bisindol, producido por la fusión de dos moléculas de triptófano. Su síntesis está catalizada por cinco enzimas de secuencias conservadas entre las bacterianas y que se encuentran formando un agrupamiento u operón (Hoshino, 2011).

Ha sido demostrado que el pigmento presenta actividad antimicrobiana, antiparasitaria, antiviral y antitumoral (Lopes *et al.*, 2009; Durán *et al.*, 2012; Choi, Yoon, *et al.*, 2015). Se observó actividad antitumoral del pigmento a muy bajas concentraciones (inhibición del 50% de células viables utilizando concentraciones de 1-3 μM) sobre líneas celulares derivadas de melanoma (Melo *et al.*, 2003), cáncer de colon (De Carvalho *et al.*, 2006) y líneas de cáncer de mama (Bromberg *et al.*, 2010; Alshatwi *et al.*, 2016). Asimismo, se reportó que el pigmento sensibiliza a células derivadas de cáncer colorectal tratadas con 5-fluorouracil (Kodach *et al.*, 2006). Es de destacar que el pigmento no presenta actividad en linfocitos de sangre periférica normales a concentraciones de hasta 2 μM (Ferreira *et al.*, 2004), ni en tomas orales por ratas Wistar en dosis de 10 mg kg^{-1} (Durán *et al.*, 2003), o ratones balb/c en dosis de 1 mg kg^{-1} por inyección intra peritoneal diaria durante 35 días (Bromberg *et al.*, 2010).

En varias líneas celulares derivadas de cáncer se ha observado que la violaceína actúa favoreciendo la apoptosis. Sin embargo, el modo por el cual genera apoptosis no está claro, y puede que no sea común en todas las líneas en las cuales presenta actividad antiproliferativa

(Durán *et al.*, 2012; Choi, Yoon, *et al.*, 2015). Por ejemplo, en líneas derivadas de cáncer de colon, la violaceína presenta efecto anti-proliferativo en las líneas tumorales Caco-2 y HT29, sin embargo el efecto en Caco-2 estaría dado debido al estrés oxidativo inducido por la violaceína, siendo un mediador clave de la apoptosis celular, mientras que en las células HT29 no produce un aumento del estrés oxidativo, lo que sugiere la existencia de mecanismos de acción específicos de la violaceína sobre distintos tipos de células (De Carvalho *et al.*, 2006). En la línea TF1 (eritro leucemia) se observó que la violaceína produce una reprogramación de las quinasas, causando un reordenamiento del retículo endoplasmático y un colapso del aparato de Golgi (Queiroz *et al.*, 2012). Se ha propuesto la sobreexpresión de la deacetilasa de histona 6 (HDAC6) como un factor esencial para el fenotipo metastático en varios tipos de tumores (Liu *et al.*, 2016), por otro lado se ha demostrado que la violaceína actúa como inhibidor de HDAC6 en células de melanoma (Gonçalves *et al.*, 2016).

Si bien la violaceína sería un potente anti-proliferativo en células tumorales, no hemos encontrado reportes de actividad antiproliferativa en líneas de cáncer de vejiga. Tampoco encontramos reportes del uso de la misma sensibilizando células de otros tipos de cáncer al CDDP.

Basados en los resultados obtenidos en esta tesis, la información recabada en las referencias bibliográficas, y dado el potencial uso biotecnológico del compuesto, se resolvió continuar con los ensayos de bioescalado: optimización, purificación y evaluación, a modo de lograr obtener el compuesto bioactivo purificado y en cantidades que permitan continuar el estudio del pigmento como anti-proliferativo y justifiquen su producción a nivel industrial.

CAPITULO II

6.2 Optimización de la producción y purificación de la violaceína. Escalado

Con el fin de incrementar la producción del pigmento, se buscaron factores que aumenten su producción; luego se lo purificó e identificó nuevamente el compuesto activo. Finalmente, con

el fin de validar la actividad antiproliferativa y evaluar la actividad sensibilizadora al CDDP, se empleó como modelo a la línea celular derivada de cáncer de cuello uterino denominada HeLa en la cual la violaceína es activa (Leal *et al.*, 2015).

6.2.1 Producción de pigmento en diferentes condiciones de crecimiento

Se ha demostrado previamente que una variedad de factores físicos y químicos afectan la producción de violaceína y que estas condiciones son específicas de la cepa que lo producen (Choi, Yoon, *et al.*, 2015). Por lo tanto, nuestro próximo objetivo fue mejorar el rendimiento de la producción de violaceína del cultivo bacteriano UV13, ensayando el efecto a diferentes temperaturas y con la adición de una variedad de posibles inductores químicos.

Primero se evaluó el efecto de la temperatura en la producción de biomasa y violaceína a 20, 25 y 30 °C. Se observó que los mayores rendimientos en la de producción de biomasa y violaceína se alcanzaron a 20 °C (Figura 11). No se detectó la producción de violaceína a 30 °C y la producción de biomasa fue escasa, lo que sugiere que UV13 es un microbio psicrotolerante, más que psicrófilo de acuerdo a la clasificación clásica de Morita (1975). Es posible que el aislamiento UV13 crezca y aumente el rendimiento de la producción de violaceína a temperaturas inferiores a 20 °C, pero debido al elevado costo energético del enfriamiento a nivel industrial, decidimos enfocar los estudios de producción a 20 °C. Esta temperatura conciliaría la producción de violaceína con un alto rendimiento y el abaratamiento de los costos de producción del pigmento, pensando en una posible aplicación a nivel industrial. Una relación similar entre la producción de violaceína y la temperatura de crecimiento ya se había descrito para una cepa de *Janthinobacterium lividum*, aislada de un glaciar (Lu *et al.*, 2009).

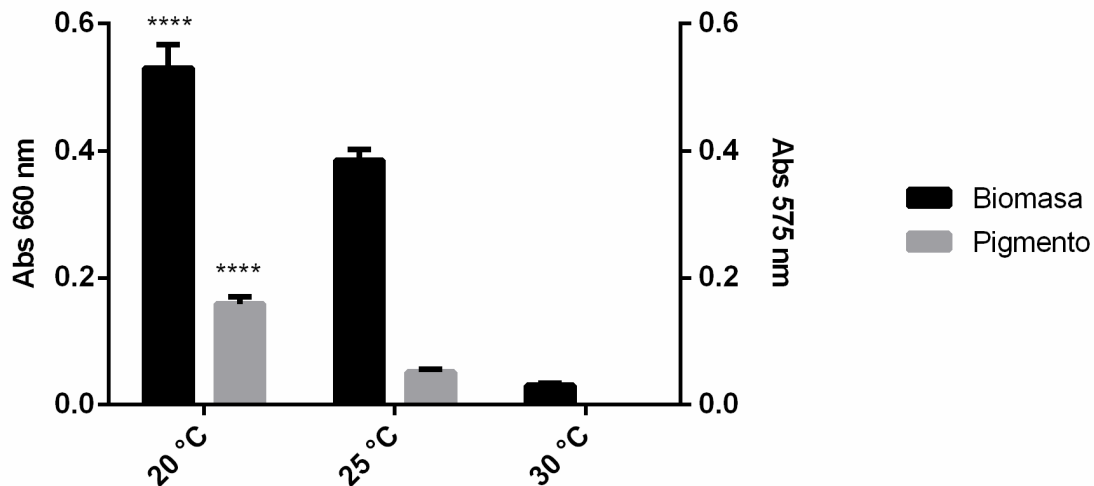


Figura 11. Efecto de la temperatura en la producción de biomasa y pigmento. Las barras negras y grises muestran (media y desvío estándar) las estimaciones de biomasa (Abs 660 nm) y la producción del pigmento (Abs 575 nm), respectivamente (ejes y). En el eje x se muestra las distintas temperaturas en las que las células UV13 se cultivaron en 3 g/L de digesto tréptico de soja (TSB), 200 rpm, durante 48 h. Cada tratamiento se realizó con tres réplicas biológicas y tres réplicas metodológicas. **** indica $p \leq 0,0001$ para ese punto respecto al resto de temperaturas evaluadas mediante el Test de Tukey.

Una vez seleccionada la temperatura de crecimiento, a 20 °C, se determinó el rendimiento de la producción de biomasa y violaceína modificando la concentración del medio de cultivo. Para ello se evaluaron tres concentraciones de TSB, determinando la biomasa y la producción de violaceína a las 48 h de cultivo (Figura 12). El aumento en la concentración de TSB en el medio resultó en una mayor biomasa (OD a 660 nm). La misma aumentó casi tres veces cuando se utilizaron 15 y 30 g/L de TSB, respecto a cuando se utilizó 3 g/L de TSB. Sin embargo, el aumento en la concentración de TSB no produjo un aumento en la producción de violaceína (no se detectó producción ni a 15 g/L ni a 30 g/L TSB), lo que sugiere la relevancia de la disponibilidad y relación entre nutrientes en la producción del pigmento. Se definieron entonces como condiciones basales de estudio la temperatura a 20 °C y la concentración de TSB de 3 g/L.

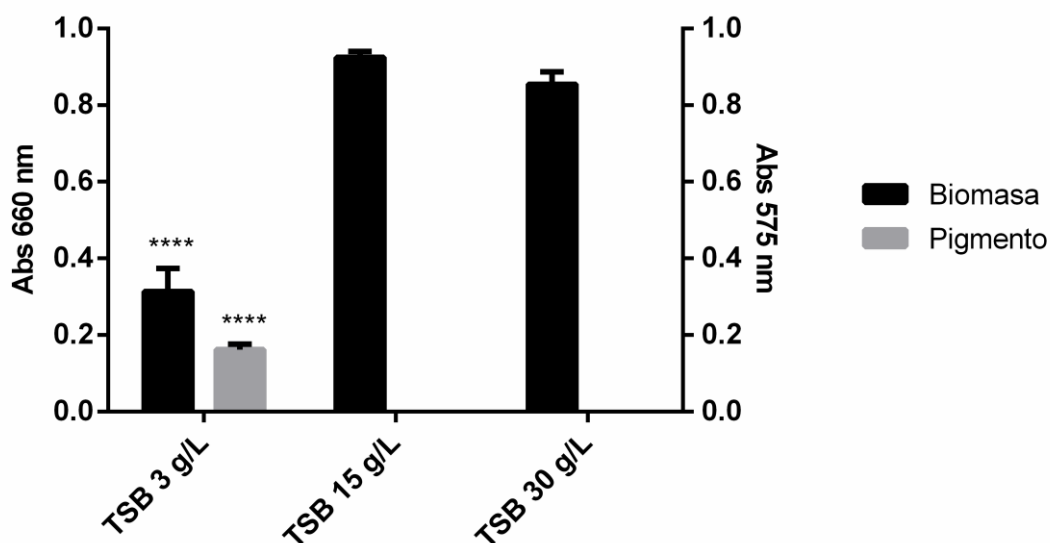


Figura 12. Efecto de la concentración de TSB en la producción de biomasa y violaceína. Las barras negras y grises muestran (media y desvío estándar) las estimaciones de biomasa (660 nm) y la producción del pigmento a (575 nm), respectivamente (ejes y). En el eje x diferentes concentraciones de TSB en que las células UV13 se cultivaron en durante 48 h, a 20 °C y 200 rpm. Cada tratamiento se realizó con tres réplicas biológicas y tres réplicas metodológicas. **** indica $p \leq 0,0001$ entre lese punto y las demás concentraciones de medio de cultivo evaluadas determinado por el Test de Tukey.

Luego de definir las condiciones estándares de crecimiento para la bacteria UV13, se intentó modificar el medio de cultivo a modo de obtener mayor cantidad del pigmento, agregando diferentes compuestos químicos al medio de cultivo; como el triptófano (Trp), que es el precursor químico de la biosíntesis de violaceína, así como el glicerol y la glucosa como fuentes de carbono previamente reportadas como inductor e inhibidor de la producción de violaceína, respectivamente (Pantarella *et al.*, 2007), Tween 80 (una molécula que afecta la permeabilidad de la membrana produciendo un estrés) y butirato de sodio como inductor de la expresión génica (Zhu *et al.*, 2014). Se muestra una imagen representativa de un experimento (Figura 13) y los resultados de la producción de biomasa y violaceína, así como el contenido de violaceína se presentan en la Tabla 5.

Se observó un aumento de las producciones de biomasa en todas las condiciones ensayadas excepción de cuando se agregó Trp, donde no se observó una variación con respecto al control. Se evidenció un efecto negativo sobre el contenido de violaceína en las concentraciones evaluadas de Trp, butirato y Tween 80. Por otro lado, el glicerol y la glucosa tuvieron un efecto promotor tanto en la producción de biomasa como en la producción de violaceína cuando se los evaluó a bajas concentraciones. Por el contrario, a altas concentraciones, el contenido de violaceína disminuyó cuando se agregó glicerol al medio de cultivo presentando un efecto negativo y, con glucosa fue neutro. A pesar de eso, la producción de violaceína fue la más alta cuando el medio se suplementó con 3,6 g/L de glucosa, debido al efecto positivo sobre la biomasa como se mencionó anteriormente. Luego, considerando que la glucosa sería el agente que produciría el mayor aumento en la producción de violaceína para la cepa UV13, se prosiguió estudiando el efecto del agregado de glucosa en un matraz agitado.

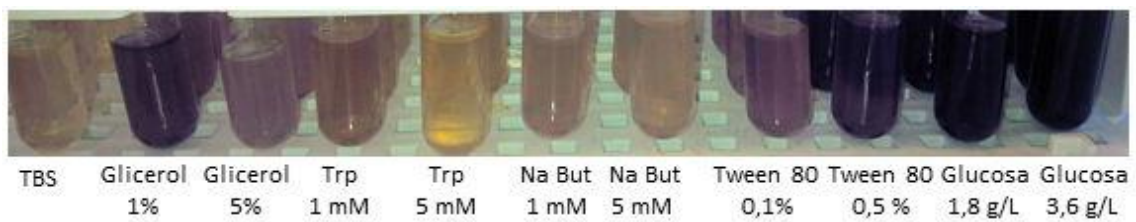


Figura 13. Imagen representativa del experimento de optimización en tubos con distintos medio de cultivo. Los tubos con agregado de glucosa muestran una mayor producción de pigmento.

Tabla 5. Producciones de biomasa y violaceína por UV13, utilizando diferentes posibles inductores de la producción de violaceína. La producción de biomasa y violaceína (media y desvío estándar) se determinó a 660 y 575 nm, a 20 °C, 200 rpm por 48 h. Se realizaron tres réplicas biológicas en dos experimentos independientes. Se estudió la varianza mediante test de ANOVA y la diferencia entre tratamientos por test de Tukey. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas frente al medio basal TSB 3 g/L (control), * p≤ 0,05, ** p≤ 0,01, *** p≤ 0,001, **** p≤ 0,0001. Los # muestra diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento con glucosa de 1,8 g/L y glucosa de 3,6 g/L (# p≤ 0,05, ## p≤ 0,01, ### p≤ 0,001, #### p≤ 0,0001).

	Biomasa	Producción de violaceína	Relación violaceína/biomasa
Absorbancia	(OD 660 nm)	(U Abs 575 nm)	(U Abs 575 nm/U Abs 660nm)
Control (TSB 3 g/L)	0,25 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,48 ± 0,14
1% Glicerol	0,89 ± 0,08 *	0,54 ± 0,21	0,61 ± 0,02
5% Glicerol	0,96 ± 0,11 *	0,31 ± 0,14	0,32 ± 0,24
1 mM Trp	0,34 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,56 ± 0,08
5 mM Trp	0,30 ± 0,01	0,17 ± 0,04	0,57 ± 0,08
1 mM Na Butirato	0,38 ± 0,05	0,14 ± 0,01	0,37 ± 0,12
5 mM Na Butirato	0,49 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,27 ± 0,07
0,1 % Tween 80	0,44 ± 0,05	0,16 ± 0,03	0,36 ± 0,03
0,5 % Tween 80	1,88 ± 0,37	0,19 ± 0,05	0,1 ± 0,10
1,8 g/L Glucosa	1,31 ± 0,34 ****	1,35 ± 0,19 ****	1,03 ± 0,26 ***
3,6 g/L Glucosa	4,41 ± 0,25 ****	1,78 ± 0,35 ****#	0,4 ± 0,06 ###

6.2.2 Producción de pigmento en matraces agitados

Luego de definir a la glucosa como el agente químico que mostró un mayor aumento en la producción de violaceína, realizamos el escalado, pasando de tubos de cultivo a escala de matraces. Como se presenta en la Figura 14, se estudió la producción de biomasa y violaceína, así como el consumo de glucosa, a las 24, 32, 48 y 56 h de cultivo. Los resultados de la Tabla 6 muestran cómo mientras aumenta la biomasa, se va consumiendo la glucosa, hasta agotarse completamente a las 48 y 56 h de crecimiento, cuando se agregó 1,8 y 3,6 g/L del azúcar, respectivamente. La producción de violaceína se hizo evidente durante la fase de estacionaria de crecimiento, coincidiendo con el agotamiento de glucosa. Además, se determinó que la mayor relación entre la producción del pigmento y de la biomasa se logra cuando UV13 crece en presencia de 1,8 g/L de glucosa, a las 56 h de crecimiento. La mayor producción de biomasa y violaceína se dio con el tratamiento de 3,6 g/L de glucosa a las 56 h. De acuerdo a estos resultados seleccionamos el medio TSB suplementado con 3,6 g/L de glucosa para continuar con los ensayos, debido a que si bien la relación entre la producción de violaceína y biomasa fue algo mayor con el agregado de 1,8 g/L del azúcar, con el agregado 3,6 g/L de glucosa al obtener una mayor cantidad de biomasa obtenemos mayor cantidad neta de violaceína necesaria para los siguientes objetivos.

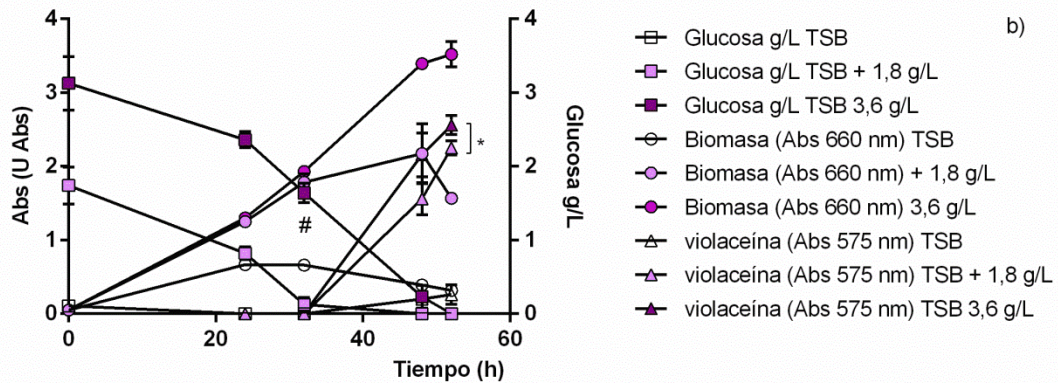
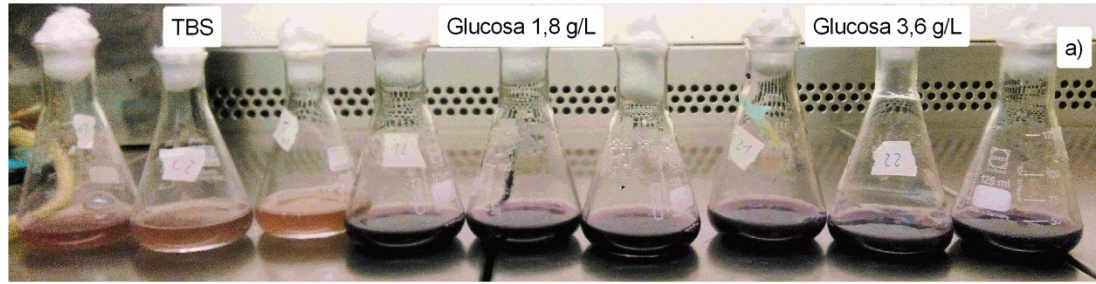


Figura 14. Producción de violaceína en matraz agitado (50 mL de medio de cultivo en matraz de 250 mL). a) Imagen representativa de un experimento a tiempo final. b) Gráfico del monitoreo del curso temporal de las producciones de biomasa y violaceína cruda (media y desvío estándar). Los experimentos se realizaron a 20 °C y 200 rpm, usando 3 g/L TSB (control) y 3 g/L TSB suplementado con 1,8 g/L y 3,6 g/L de glucosa. Se representan las siguientes diferencias significativas estudiadas por el método de multicomparación de Tukey. El asterisco indican diferencias estadísticamente significativa en la producción de violaceína ente los tratamientos 3 g/L TSB suplementado con 1,8 g/L y 3,6 g/L de glucosa, * $p \leq 0,05$. # indica diferencia estadísticamente significativa en el consumo de glucosa entre el cultivo TSB suplementado con 3,6 g/L de glucosa y los demás tratamientos.

6.2.3 Producción del pigmento en un biorreactor

Una vez definido el TSB suplementado 3,6 g/L de glucosa como el de mayor rendimiento en cuanto a la producción de violaceína, se continuó con el proceso de escalado realizando la producción del pigmento en un biorreactor de 5 L, con un volumen de trabajo de 1,5 L para contar con una mayor cantidad del pigmento para su posterior purificación. Como se muestra en

la Figura 15, la cepa UV13 cultivada en biorreactor presentó una fase de retraso corta; luego, el crecimiento de las células y la producción de violaceína aumentaron con el consumo concomitante de la glucosa. A las 56 h, la producción de biomasa y violaceína fue similar a la obtenida en matraces agitados. Sin embargo, en el cultivo que creció en el biorreactor, la glucosa se consumió por completo a las 72 h, lo que permitió una mayor formación la biomasa y de producción de violaceína con una producción final de 4,33 U Abs, que corresponde a 77 mg/L de violaceína cruda. Luego, el cultivo se detuvo debido a la alta viscosidad del medio de cultivo, lo que no permitió una mezcla, muestreo y análisis adecuados. El cultivo se reservó para su purificación.

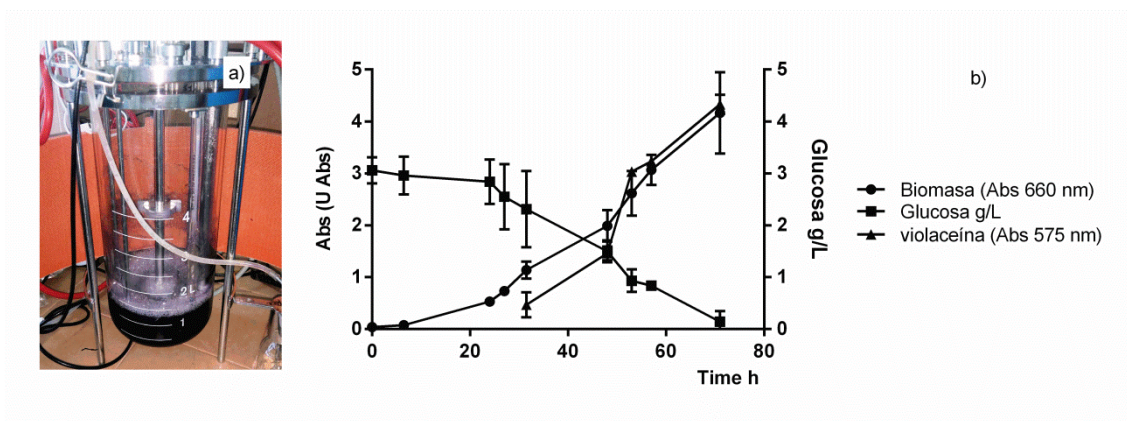


Figura 15. Producción del pigmento de UV13 en un biorreactor agitado de 5 L. a) Imagen del bioreactor a tiempo final. b) Grafico del escalado en bioreactor en función del tiempo (h): producción de biomasa (○) medida como unidades de absorbancia a 660 nm; consumo de glucosa (□) determinada como g/L por HPLC; y producción de violaceína (▲) medida como unidades de absorbancia at 575 nm. Los símbolos representan la media y el desvío estándar. Se realizaron dos experimentos independientes.

6.2.4 Purificación de la violaceína

Al aumentar el volumen de trabajo fue necesario ajustar el proceso de purificación para poder realizarlo a mayor escala como se detalló en la sección Materiales y Métodos. El cultivo obtenido del biorreactor se extrajo con butanol, aprovechando que el butanol no es miscible en agua y por lo que se generan dos fases, una fase butanólica y una fase acuosa. Al separar y secar

la fase butanólica se obtuvieron un total de 2,92 g del extracto butanólico (extracto crudo). Luego, usando un procedimiento económico y sencillo de extracción con solventes y precipitación se purificó el pigmento. En el hexano y diclorometano se extraen las moléculas hidrofóbicas. Posteriormente, se suspendió en metanol caliente y al agregar agua fría la violaceína (que no es soluble en agua) se agregó y precipitó. De esta forma se obtuvieron 141,5 mg del pigmento violeta puro (rendimiento de purificación del 4,8 % de violaceína pura/extracto butanólico crudo). La validación de la pureza de la violaceína se realizó mediante RMN como se detalló en la sección 6.1.4 (Figura 10), donde se confirmó la identidad del pigmento. Esto último se verificó además por HPLC-UV; actividad que realizó el Dr. Danilo Davyt.

6.2.5 Actividad antiproliferativa y sensibilizadora al cisplatino de la violaceína en células HeLa

Una vez obtenida la violaceína en un elevado grado de pureza, se procedió a evaluar su posible actividad antiproliferativa y sensibilizadora al cisplatino en la línea celular derivada de cáncer de cuello uterino denominada HeLa, utilizando el método de RZ. Los resultados (Figura 16) muestran que la concentración inhibitoria media máxima (CI50) para la violaceína fue de 0,42 μM y para el CDDP de 17,6 μM . Por otro lado, la CI50 para la violaceína disminuyó cuando además se agregó CDDP a una concentración de 5 μM (CI50 = 0,22 μM). Del mismo modo, la CI50 para CDDP se redujo hasta 8,34 μM cuando se combinó con 0,15 μM de violaceína. Vale la pena mencionar que ni 5 μM de CDDP, ni 0,15 μM de violaceína produjeron ningún efecto anti-proliferativo significativo cuando se los utilizó en forma independiente. Por lo tanto, la violaceína pura produciría un efecto anti-proliferativo y sensibilizador al CDDP en las células HeLa, sugiriendo que sería el pigmento y no otro constituyente del EM el responsable de la actividad.

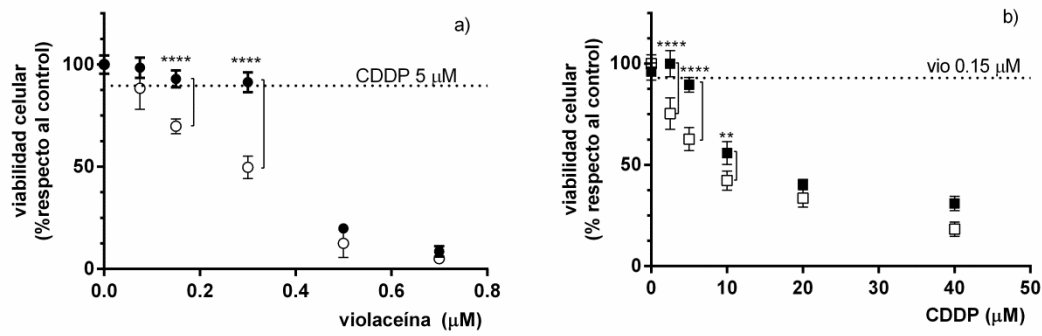


Figura 16. Efecto anti-proliferativo y sensibilizador al cisplatino en células HeLa evaluadas por el método RZ. Se muestran valores de media y desvío estándar normalizados respecto al control de DMSO de tres experimentos independientes de diferentes concentraciones de: a) violaceína (●) y violaceína con el agregado de 5 μM CDDP (○), la línea puntuada representa la viabilidad celular de 5 μM CDDP; b) CDDP (■), CDDP combinado con 0,15 μM de violaceína (□), la línea puntuada representa el porcentaje de la viabilidad celular de 0,15 μM de violaceína. El tratamiento se realizó por 24 h en condiciones de cultivo. Los **** muestran diferencias significativas entre tratamientos por el test de Sidak ($p \leq 0,0001$).

6.2.6 Genotoxicidad

Analizamos el efecto genotóxico de la violaceína en las células HeLa a través del recuento de los micronúcleos en células binucleadas. En la Figura 17 a se observa el valor de índice de división nuclear (IDN) para los diferentes tratamientos. Este índice tiende a uno cuando la mayoría de las células son mononucleadas y tiende a dos cuando la mayoría de las células son binucleadas, alcanzando un ciclo de mitosis. En las células tratadas con violaceína, o tratadas con violaceína y CDDP, se observó una reducción del IDN, indicando un efecto de freno del ciclo celular. Probablemente debido al efecto anti-proliferativo de la violaceína no se obtuvieron suficientes células binucleadas por tratamiento, lo que no permitió evaluar la frecuencia de micronúcleos (FMN) para los tratamientos combinados o a la concentración 300 nM de violaceína (concentración sub CI50%). Igualmente, en los tratamientos en los que se alcanzó el número suficientes de células binucleadas se observó que la violaceína a una concentración de

150 nM no evidencia un aumento de la FMN respecto al control, mientras que en el caso del CDDP obtuvimos una FMN de 0,14 (Figura 17 b).

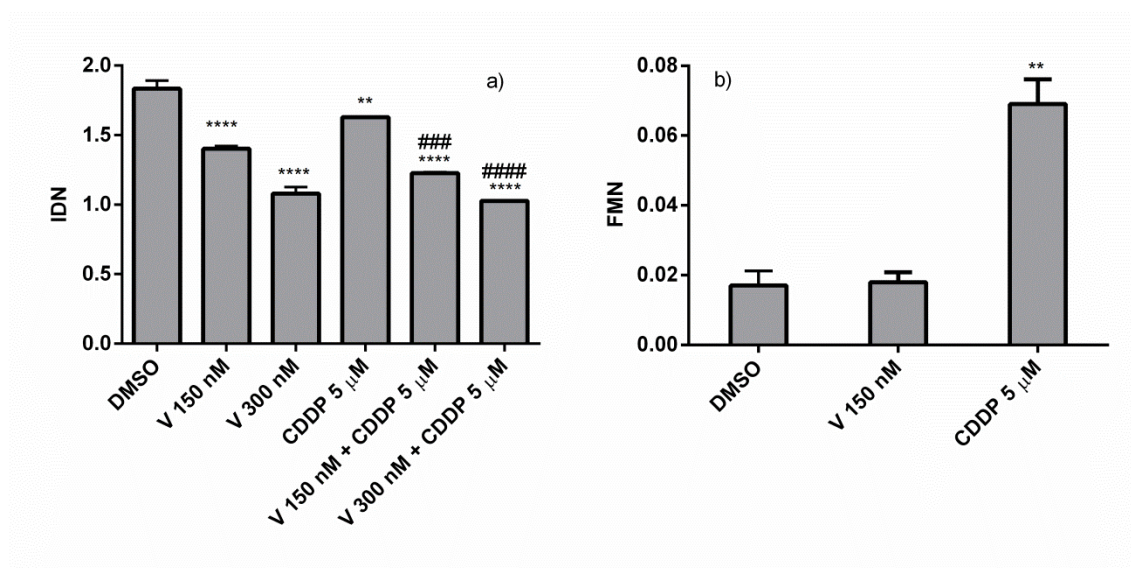


Figura 17. Ensayo de micronúcleos en células Hela tratadas con violaceína o violaceína + CDDP. Se representan los resultados de la media y desvío estándar de tres experimentos independientes de a) índice de división nuclear (IDN) y b) frecuencia de micronúcleos FMN. Se estudió la diferencia estadística mediante el test de Tukey * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$ significancia estadística con respecto al control (DMSO). Significancia estadística respecto a CDDP 5 μM (#### $P \leq 0,0001$, ### $P \leq 0,001$). El tratamiento se realizó en 24 h en condiciones de cultivo.

Para intentar evadir el bloqueo del ciclo celular en fase G2 cuando las células son expuestas a un agente tóxico, agregamos a los cultivos 4 mM de cafeína (Powell *et al.*, 1995; Bode and Dong, 2007), permitiendo que las células dañadas alcancen la división celular y produzcan células binucleadas, a fin de poder evaluar el posible efecto genotóxico de la violaceína y los tratamientos combinados. De esta forma analizamos el efecto de diferentes concentraciones de violaceína y los tratamientos combinados con CDDP (5 μM) en presencia de 4 mM de cafeína (Figura 18). Los experimentos mostraron que las células HeLa tratadas con violaceína y los tratamientos combinados de violaceína con CDDP en presencia de cafeína, mostraron una reducción del IDN respecto al control, observándose que el efecto citostático persiste, aunque es menor que en los tratamientos sin cafeína. Al evaluar el daño genotóxico evidenciado por la

frecuencia de micronúcleos en células binucleadas (FMN), los tratamientos con violaceína no evidenciaron un aumento significativo de la FMN respecto al DMSO. El CDDP 5 μ M produjo una FMN de 0,14 siendo significativo respecto al control. Además, los tratamientos combinados de CDDP 5 μ M y violaceína en ambas concentraciones redujeron significativamente la FMN respecto del CDDP 5 μ M. Según los resultados, la violaceína no presentaría efecto genotóxico en la línea HeLa y por otro lado a pesar de aumentar el efecto citotóxico del CDDP al combinarlos, causaría una disminución del efecto genotóxico del CDDP.

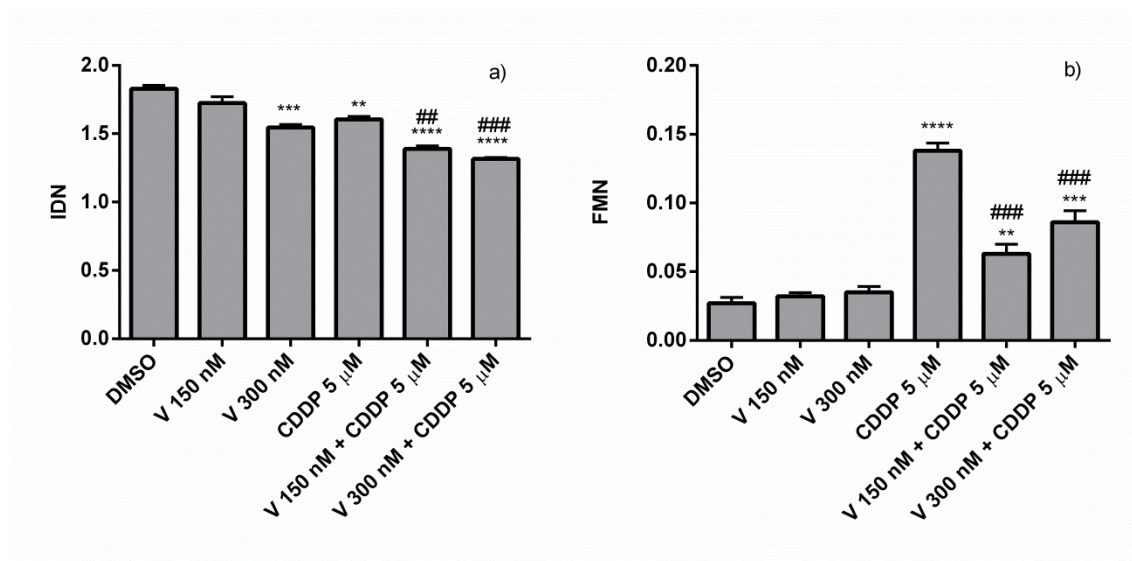


Figura 18. Ensayo de micronúcleos en células HeLa tratadas con violaceína y/o CDDP en presencia de cafeína (4 mM). Se representan la media y el desvío estándar de 3 experimentos independientes a) Evaluación del IDN; b) Evaluación de la FMN. * $P \leq 0,5$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$ significancia estadística con respecto al control (DMSO). # Significancia estadística para CDDP 5 μ M (### $P \leq 0,001$). El tratamiento se realizó por 24 h, en condiciones de cultivo.

La violaceína no produciría efecto genotóxico en la línea HeLa aun en presencia del inhibidor del freno en G2 cafeína. Además, la violaceína disminuiría el efecto genotóxico del cisplatino a pesar de aumentar su efecto citotóxico.

DISCUSIÓN CAPITULO II

Optimización de la producción del extracto y purificación de la violaceína

En este capítulo se muestran los resultados de la producción (puesta a punto de las condiciones de producción), purificación e confirmación de identidad del pigmento violaceína producido por UV13. En el Capítulo I se había ya identificado el pigmento como violaceína, pero se decidió realizar una nueva identificación del mismo luego de su producción a mayor escala. Además, se demostró que este pigmento podría considerarse como un potencial agente terapéutico durante el tratamiento del cáncer de cuello uterino.

Se analizó el efecto de algunos parámetros (temperatura de crecimiento, composición del medio de cultivo y la adición de inductores químicos potenciales) en el crecimiento bacteriano y el rendimiento de la producción de violaceína. El compromiso entre maximizar la producción bacteriana de metabolitos y la producción de bajo costo es un tema de estudio importante, tanto en el ámbito académico como industrial, justificando el esfuerzo realizado para maximizar el rendimiento de la producción. La baja productividad de los metabolitos puede dar como resultado un alto costo de fabricación por unidad del producto llevando muchas veces a la inviabilidad de su uso.

La cepa UV13, como otras bacterias psicrotolerantes que producen violaceína (Shivaji *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 2016; McClean *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009), presentó un aumento en la producción de violaceína a medida que se disminuyó la temperatura de crecimiento. Este efecto podría deberse al mecanismo de adaptación al frío que presentan algunas bacterias de este tipo; al disminuir la temperatura, se rigidizan las membranas celulares y la forma de fluidificarlas es cambiar la composición de los ácidos grasos de membrana, pasando a producir ácidos grasos de menor largo y mayor número de insaturaciones; pero además, como forma de fluidificar la membrana se producen pigmentos que se integran a la membrana (Marizcurrena *et al.*, 2019). Otra posible explicación es que al ser la violaceína un metabolito secundario, este se produce al terminar la fase exponencial de crecimiento, siendo

esto alcanzado a temperaturas menores para bacterias psicrotolerantes. No se evaluaron temperaturas menores de 20 °C debido a que se consideró poco conveniente desde el punto de vista comercial, por el alto costo de energía para el enfriamiento, lo que haría más costosa la producción del pigmento en un desarrollo biotecnológico comercial.

Por otro lado, cuando se evaluaron las diversas concentraciones del medio de cultivo y los posibles suplementos agregados al mismo (Tabla 5), los resultados mostraron que creciendo el microorganismo en TSB a una concentración de 3 g/L y con el suplemento de glucosa 1,8 g/L se obtiene el mayor rendimiento de producción de violaceína. Este resultado contrasta con los obtenidos anteriormente para *Janthinobacterium lividum* DSM1522, donde el agregado de glucosa al 1% p/v en medio de cultivo actuó como inhibidor de la síntesis de violaceína, mientras que el agregado de glicerol al 1% p/v aumentó su producción (Pantanella *et al.*, 2007; Kanelli *et al.*, 2018). Dado que en la bacteria *Chromobacterium violaceum*, la violaceína es un metabolito que se produce en condiciones de estrés controlados por mecanismos de *quorum sensing* (Liu *et al.*, 2013; Ayé *et al.*, 2015), y que se ha demostrado que agentes como el DMSO inducen la producción de violaceína en biofilms (Mart'yanov *et al.*, 2018), se estudió el posible efecto del Tween 80 como generador de estrés; sin embargo, en este estudio el Tween 80 no demostró aumentar la producción de violaceína. Por otra parte, el butirato de sodio se ha estudiado como un modulador de la expresión génica en *Streptomyces* sp., debido a la acción sobre proteínas homologas a las deacetilasas de histonas (Zhu *et al.*, 2014); sin embargo, los resultados obtenidos no muestran un aumento en la producción de violaceína. Curiosamente, el agregado de butirato de sodio duplicó la producción de biomasa, pero no alteró la producción de violaceína, lo que sugiere un efecto represor de este agente.

Considerando que la biosíntesis de violaceína requiere oxígeno (Hoshino, 2011), la mejora en la transferencia de O₂ en la producción a mayor escala (matraces y biorreactor) podría modificar la producción de la biomasa y el metabolito, pero este es un factor que aún no se ha estudiado.

Una vez seleccionado el agregado de glucosa como el agente que más aumentó la producción de violaceína en tubos, se evaluó el efecto de la glucosa en escala de matraces. El cultivo con mayor cantidad de glucosa agregada fue el último en consumirla completamente, además de haber sido el mayor productor de biomasa y violaceína. Nuevamente, el agregado de glucosa produjo un aumento de la producción de biomasa de aproximadamente diez veces comparado con los cultivos realizados con el medio basal (sin el agregado de algún agente). También, al comparar la producción de violaceína para las dos concentraciones de glucosa evidenciamos que el agregado de 3,6 g/L de glucosa se diferencia significativamente del agregado de 1,8 g/L de glucosa. De acuerdo a estos resultados seleccionamos el medio TSB suplementado con 3,6 g/L de glucosa como el que produciría más violaceína en escala de matraces y la condición a evaluar en el siguiente paso de escalado a biorreactor.

Descubrimos que la cepa UV13 produce una gran cantidad de violaceína cuando crece en 3 g/L de TSB suplementado con glucosa 3,6 g/L, a 20 °C. Obtuvimos 141,5 mg de violaceína pura a partir de 2,92 g de violaceína cruda (rendimiento de recuperación del 4,8 %), un rendimiento de recuperación más alto a los publicados por (Montforts *et al.*, 2011; Sasidharan *et al.*, 2015), que obtuvieron 12,8 mg y 2,9 mg de violaceína pura partiendo de 1,6 g (rendimiento de recuperación del 0,8 %) y 2,10 g (rendimiento de recuperación del 0,14 %) de violaceína cruda, obtenida de *Chromobacterium* sp. NIIST y *Pseudoalteromonas* sp. DMS 13623, respectivamente. Recientemente, se informó la producción de 1,089 mg de pigmento a partir de un aislado de *Iodobacter* antártico (rendimiento de 0,01 %) que presentó actividad antibacteriana (Atalah *et al.*, 2020).

La violaceína ha demostrado tener diversas actividades *in vitro*, lo cual sugiere su potencial uso en la industria farmacéutica. A modo de evaluar el efecto del producto purificado, se estudió el efecto de la violaceína en células derivadas de cáncer de cuello uterino. Para validar el posible uso en células de cáncer de cuello uterino, estudiamos las actividades antiproliferativas, sensibilizadoras al cisplatino y genotóxicas de la violaceína. Para estos experimentos

seleccionamos las células HeLa dado a que este tipo de tumor es uno de los cánceres más comunes en mujeres de todo el mundo (Bray *et al.*, 2018) y a que la actividad de la violaceína en esta línea es conocida (Leal *et al.*, 2015). El CDDP es un agente quimioterapéutico bien conocido utilizado para el tratamiento de numerosos cánceres humanos. Este medicamento interfiere con los mecanismos de reparación del ADN, lo que induce la apoptosis (Dasari and Bernard Tchounwou, 2014). Se utiliza como tratamiento sistémico para el cáncer de cuello uterino avanzado, persistente o recurrente, pero tiene una alta toxicidad y produce importantes efectos secundarios y el desarrollo de resistencia al CDDP por parte de las células tumorales (Cheung-Ong *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2016).

Los resultados obtenidos durante este trabajo de tesis mostraron que la violaceína producida por la cepa UV13 tiene actividad antiproliferativa en las células HeLa con una CI50 de 0,42 μM . Utilizando el método del azul tripán, otros autores demostraron que la violaceína tiene actividad antiproliferativa en las células HeLa, con un 60% de viabilidad celular después de exponer las células a 6 μM de violaceína durante 24 h (Leal *et al.*, 2015). Nuestro resultado parece prometedor en comparación con los resultados mostrados por Leal *et al.* (2015) pero utilizamos un método diferente para la determinación de la viabilidad celular, y probablemente el coeficiente de purificación de la violaceína fue diferente, por lo que posiblemente nuestro pigmento se encuentre en mayor grado de pureza.

Además, cuando se analizaron diferentes concentraciones de violaceína en combinación con CDDP 5 μM o empleando diferentes concentraciones de CDDP en combinación con violaceína 0,15 μM (ambas moléculas en concentración no tóxica), observamos que la adición de concentraciones sub-tóxicas de violaceína y CDDP tiene un efecto aditivo sobre la viabilidad celular, lo que nos permite sugerir la actividad sensibilizadora de la violaceína al cisplatino en células HeLa. En el próximo Capítulo se abordará el posible efecto sensibilizador al cisplatino en líneas de cáncer de vejiga.

Finalmente, según nuestros resultados la violaceína no muestra efecto genotóxico *per se*. Mientras que el CDDP tuvo un efecto genotóxico sobre células HeLa como era de esperar (Gebel *et al.*, 1997; Ethiraj *et al.*, 2016), cuando se agregó en combinación con violaceína se detectó una reducción de la genotoxicidad producida por el CDDP evidenciada por la disminución en la frecuencia de micronúcleos, pero con un aumento del freno en la división celular evidenciada por el IDN. Además, se observó la ausencia de efecto genotóxico por parte de la violaceína, incluso en presencia de cafeína. En general, las células normales que expresan p53 de tipo salvaje se detienen en G1, mientras que las células que no expresan P53 o expresan un P53 mutante se detienen principalmente en G2 (Bode and Dong, 2007). Muchos estudios sugieren que el aumento de la genotoxicidad de los agentes químicos está asociado con la inhibición por la cafeína de la actividad del punto de control G2, lo que aceleraría el ciclo celular a través del punto de control G2/M (Powell *et al.*, 1995).

Los resultados obtenidos evidencian el potencial de la violaceína como agente anticancerígeno o como adyuvante del CDDP en la terapia contra el cáncer de cuello uterino. Además, creemos que el proceso de producción y purificación de la violaceína utilizando el aislamiento antártico *Janthinobacterium* sp. UV13, permite obtener un producto (violaceína) que se puede producir fácilmente y a bajo costo, con un alto rendimiento de purificación, siempre pensando en el posible uso biotecnológico o bien para estudios en esta u otras líneas de investigación que necesiten una alta demanda de violaceína, como los ensayos *in vivo*.

CAPITULO III

6.3 Evaluación de la actividad antiproliferativa de la violaceína en líneas celulares de cáncer de vejiga

Como se mencionó en la introducción si bien el cáncer de vejiga no es el de mayor incidencia tiene una elevada tasa de recurrencia asociada con una alta mortalidad. Además, no está demostrado el efecto de la violaceína sobre líneas de cáncer de vejiga ni su uso como sensibilizador al CDDP.

6.3.1 Actividad antiproliferativa y sensibilizadora de la violaceína en células derivadas de cáncer de vejiga expuestas al cisplatino.

Se evaluó la actividad antiproliferativa de la violaceína y su capacidad para sensibilizar a CDDP en líneas celulares de cáncer de vejiga a las 24 h y 48 h. Se observó que la violaceína tiene un efecto sobre las líneas derivadas de cáncer de vejiga evidenciados por los ensayos de RZ para las líneas T24 y 253 J (Figuras 19 y 20).

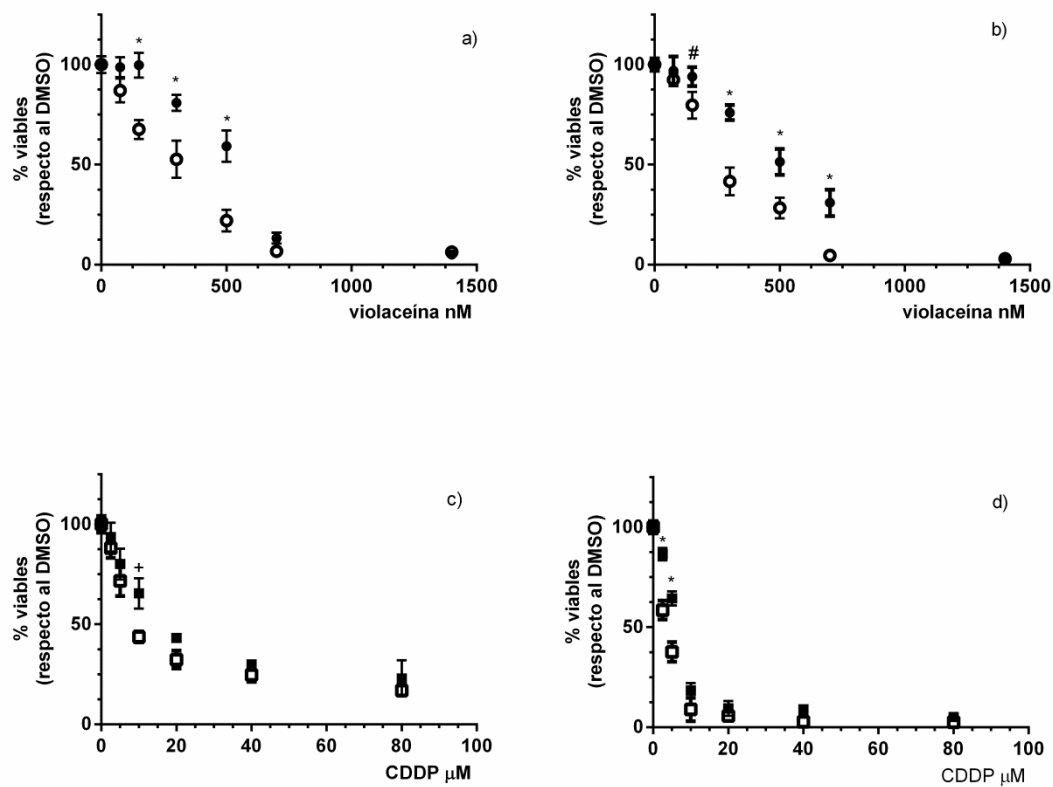


Figura 19. Efecto anti-proliferativo determinado por el ensayo de RZ en la línea T24. Se representan la media y desvío estándar de tres experimentos independientes normalizados respecto al control de DMSO, a) y b) efecto de la violaceína ● y la violaceína combinada con 10 μM de CDDP ○ a las 24 h y 48 h, respectivamente. c) y d) efecto del CPPD ■ y el CDDP combinado con 150 nM de violaceína □ a las 24 h y 48 h, respectivamente. Se indican los valores con significancia estadística según el Test de Sidak + $P \leq 0,001$ y * $P \leq 0,0001$.

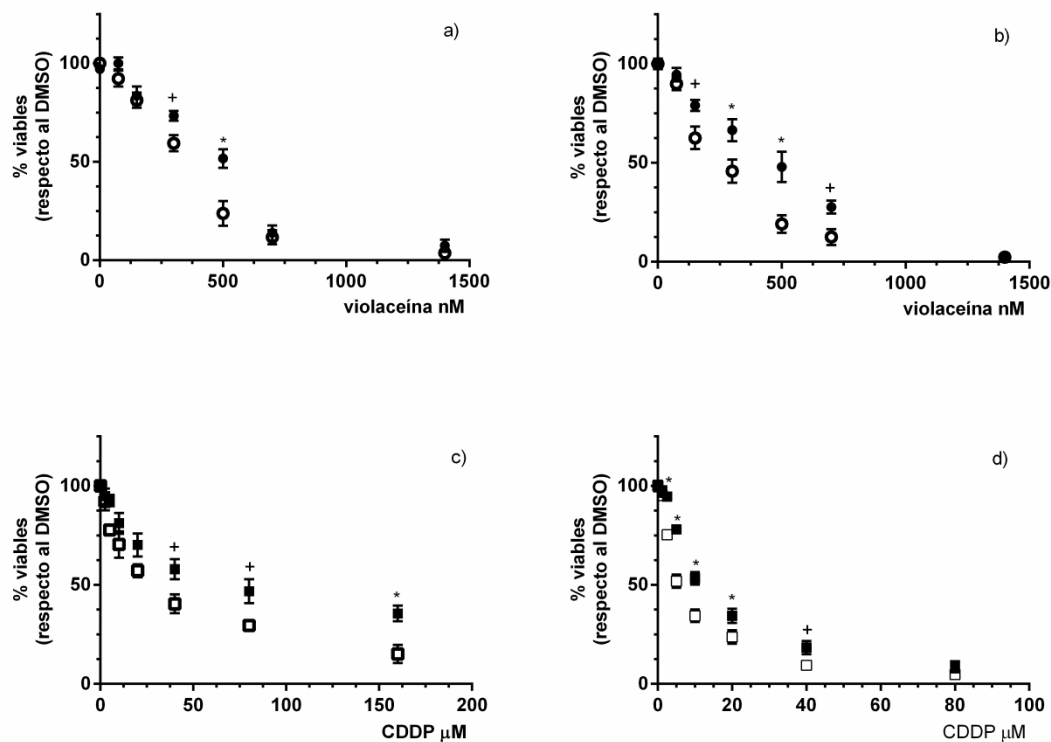


Figura 20. Efecto anti-proliferativo determinado por el ensayo de RZ en la línea 253 J. Se representan la media y desvío estándar de tres experimentos independientes normalizados respecto al control de DMSO: a) y b) efecto de la violaceína ● y la violaceína combinada con 10 μM de CDDP ○ a las 24 h y 48 h respectivamente; c) y d) efecto del CPPD ■ y el CDDP combinado con 150 nM de violaceína □ a las 24 h y 48 h respectivamente. Se indican los valores con significancia estadística según el Test de Sidak + $P \leq 0,001$ y * $P \leq 0,0001$.

Al calcular la concentración inhibitoria media (CI50) (Tabla 6), a partir del ensayo de RZ en células T24, se observó que la violaceína presentaba un CI50 de 515,5 nM, y 228,3 nM en combinación con 10 μM de CDDP a las 24 h y de 507,8 nM y 241,8 nM en combinación con cisplatino a las 48 h. Cuando se evaluó el cisplatino presentó un CI50 de 18,52 μM y 10,92 μM cuando se combinó con violaceína 150 nM. A las 48 h el CI50 fue de 5,59 μM , reduciéndose a 2,59 μM cuando se combinó con violaceína 150 nM. Al evaluar la actividad mediante SRB se obtuvieron valores algo menores, pero en el mismo orden de magnitud, observándose la misma tendencia que en RZ.

Tabla 6. Concentraciones inhibitorias medias de la violaceína y el cisplatino, así como sus combinaciones, sobre las células T24.

	Violaceína nM		CDDP μ M	
		+ CDDP 10 μ M		+ vio 150 nM
RZ 24 h	515,1	228,3	18,5	10,9
RZ 48 h	507,8	241,8	5,6	2,6
SRB 24 h	221	127,3	13,15	6,936
SRB 48 h	203,2	116,8	4,0	2,54

Por otro lado en la línea 253 J (Tabla 7) se muestran los valores de CI50 obtenidos con el ensayo de RZ. Para la violaceína se obtuvieron valores de CI50 de 432,9 nM mientras que en combinación con 10 μ M de CDDP el CI50 fue de 290,4 nM a las 24h. A las 48 h se obtuvieron valores de CI50 380,4 y 211,8 nM para la violaceína y la violaceína combinada con 10 μ M de CDDP, respectivamente. Por otro lado, al evaluar el CDDP y el CDDP combinado con 150 nM de violaceína obtuvimos valores de CI50 de 62, 1 y 26,5 μ M a las 24 h y 12,7 y 6,2 μ M a las 48 h respectivamente.

Tabla 7. Concentraciones inhibitorias medias de la violaceína y el cisplatino, así como sus combinaciones sobre células 253 J.

	Violaceína nM		CDDP μ M	
		+ CDDP 10 μ M		+ vio 150 nM
RZ 24 h	432,9	290,4	62,1	26,5
RZ 48 h	380,4	211,8	12,7	6,2
SRB 24 h	216,0	127,9	20,0	13,7
SRB 48 h	340,1	137,4	7,2	3,1

En ambos casos, obtuvimos un aumento en el efecto de la violaceína o el CDDP cuando se combinaron a una concentración no tóxica, lo que sugiere un efecto aditivo. Estos resultados indicarían que la violaceína es un potente anti-proliferativo y que además actuaría sensibilizando a las células tumorales al CDDP.

6.3.2 Estudio del efecto genotóxico de la violaceína

Una vez determinada la potencia de la violaceína se evaluó el posible efecto genotóxico a concentraciones sub CI50 de violaceína y CDDP, así como el efecto combinado. Como se observa en la figura 21, en ambas líneas celulares, al utilizar concentraciones sub CI50 como son 150 o 300 nM de violaceína se observa una reducción de la división celular, evidenciada por una disminución de la frecuencia de las células binucleadas (FBN). Se probó el mismo diseño experimental para 48 h pero el efecto persiste, por lo que con este diseño experimental no se logró alcanzar el número mínimo de células binucleadas para determinar la frecuencia de micronúcleos (FMN) en los tratamientos con 300 nM de violaceína y los tratamientos combinados con CDDP. En el tratamiento de 150 nM de violaceína no se observa una diferencia significativa en cuanto a la FMN respecto al control. Por otro lado, la concentración de 10 μ M CDDP sí produce un aumento significativo de la FMN.

Como alternativa para lograr estudiar la formación de micronúcleos, se realizó el ensayo de micronúcleos con el agregado de 4 mM de cafeína. En la línea celular T24 (Figura 21) se observa que la violaceína no produce un aumento del daño genético evidenciado por la FMN, en ninguna de las concentraciones evaluadas en ambas líneas celulares. El CDDP como era de esperar produce daño genotóxico (FMN = 0,28). Es interesante resaltar que cuando se combina violaceína con cisplatino, si bien aumenta el efecto de freno del ciclo evidenciado por la baja en la FBN, disminuye significativamente la formación de micronúcleos respecto al cisplatino 10 μ M, siendo la FMN 0,19 para 150 nM de violaceína en combinación con el cisplatino y 0,24 para la concentración 300 nM de violaceína en combinación con el cisplatino.

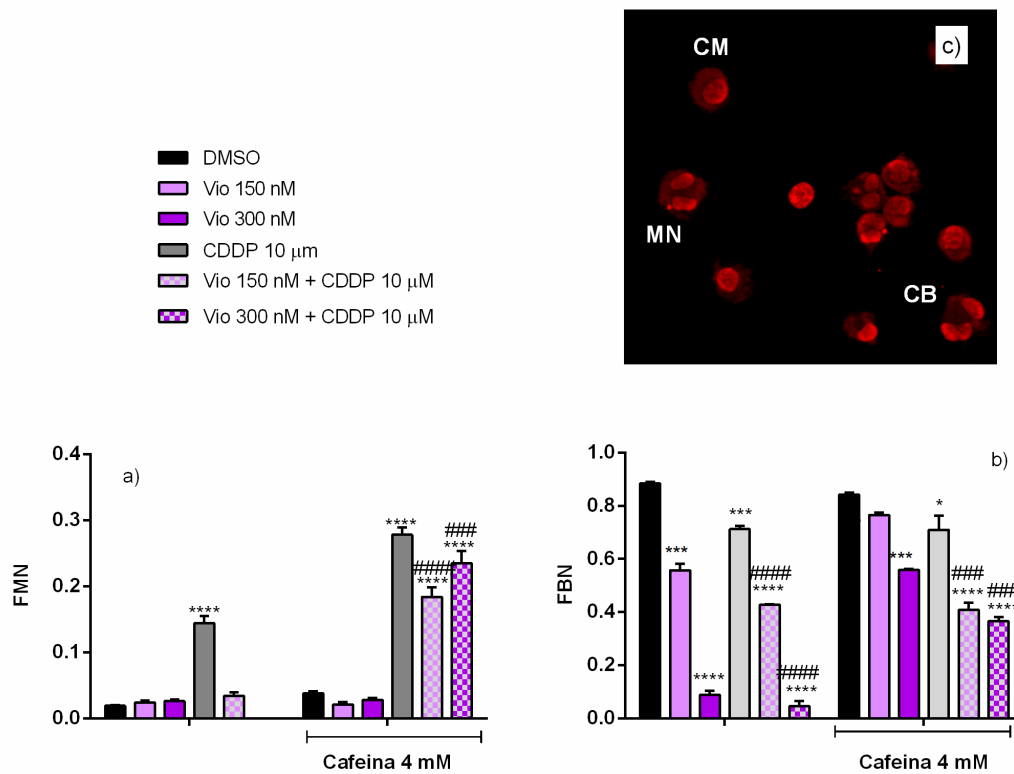


Figura 21. Efecto de la violaceína sobre la frecuencia de micronúcleos y de células binucleadas para la línea celular T24. Se representan la media y desvío estándar de tres experimentos independientes. Se indican los valores con significancia estadística según el Test de Tukey con respecto al control (DMSO) * $P \leq 0.5$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$ y significancia estadística respecto CDDP 10 μ M (### $P \leq 0,001$ y ##### $P \leq 0,0001$). c) Imagen representativa de un campo con el objetivo 20X. Se señalan: CM, célula mono nucleada; CB, célula bi nucleada, MN micronúcleo en célula binucleada.

Cuando evaluamos el efecto genotóxico de la violaceína y el cisplatino en la línea celular 253J (Figura 22) observamos un comportamiento similar al descrito en T24 no observándose daño genético en los tratamientos con violaceína. Por otro lado, al evaluar el daño producido por el cisplatino 10 μ M obtuvimos una FMN de 0,36, disminuyendo significativamente cuando se combina con violaceína 150 y 300 nM.

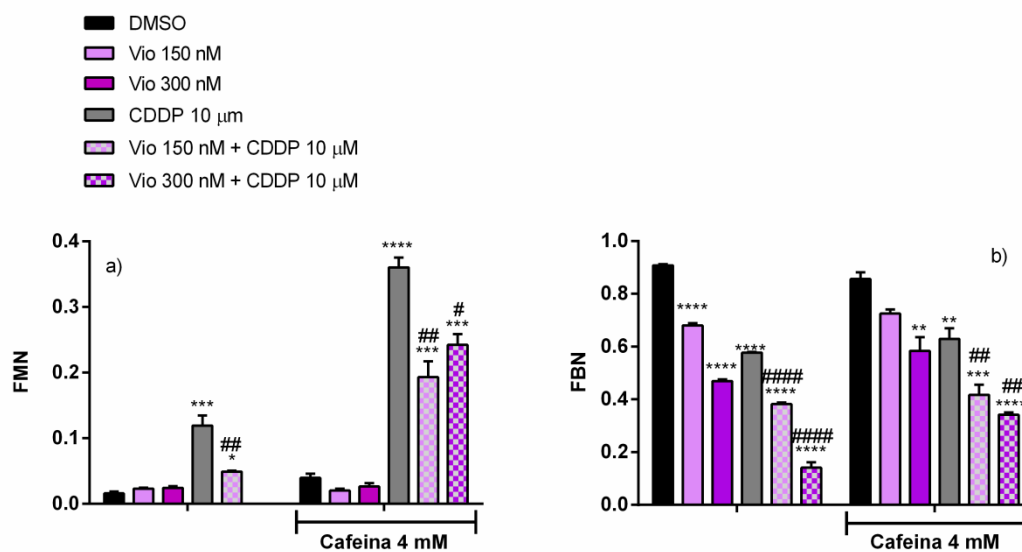


Figura 22. Frecuencia de micronúcleos y células binucleadas en células 253J tratadas con cisplatino y/o violaceína. Se representan la media y desvío estándar de tres experimentos independientes. Se indican los valores con significancia estadística según el Test de Tukey con respecto al control (DMSO) * $P \leq 0.5$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$ y significancia estadística respecto CDDP 10 μ M (### $P \leq 0,001$ y #### $P \leq 0,0001$).

Estos resultados sugieren que la violaceína tiene un modo de acción no genotóxico y que además actuaría disminuyendo el efecto genotóxico del CDDP a la vez que potenciaría el efecto citotóxico en células T24 y 253J derivadas de cáncer de vejiga.

6.3.3 Estudio del daño primario inducido por la violaceína mediante Ensayo Cometa

Luego de evaluar el daño genotóxico y no observar un aumento significativo en la producción de micronúcleos se estudió el daño primario en el ADN mediante el ensayo Cometa. Este ensayo evidencia las roturas en el ADN producidas por agentes químicos o físicos. Como se observa en la Figura 23 en ambas líneas de cáncer de vejiga la violaceína no generó daño primario en el ADN respecto al control. El cisplatino y el H_2O_2 produjeron daño significativo,

mientras que cuando la violaceína se combina con el cisplatino se observa una reducción del daño primario. Con estos resultados descartamos a la violaceína como un posible inductor del daño primario.

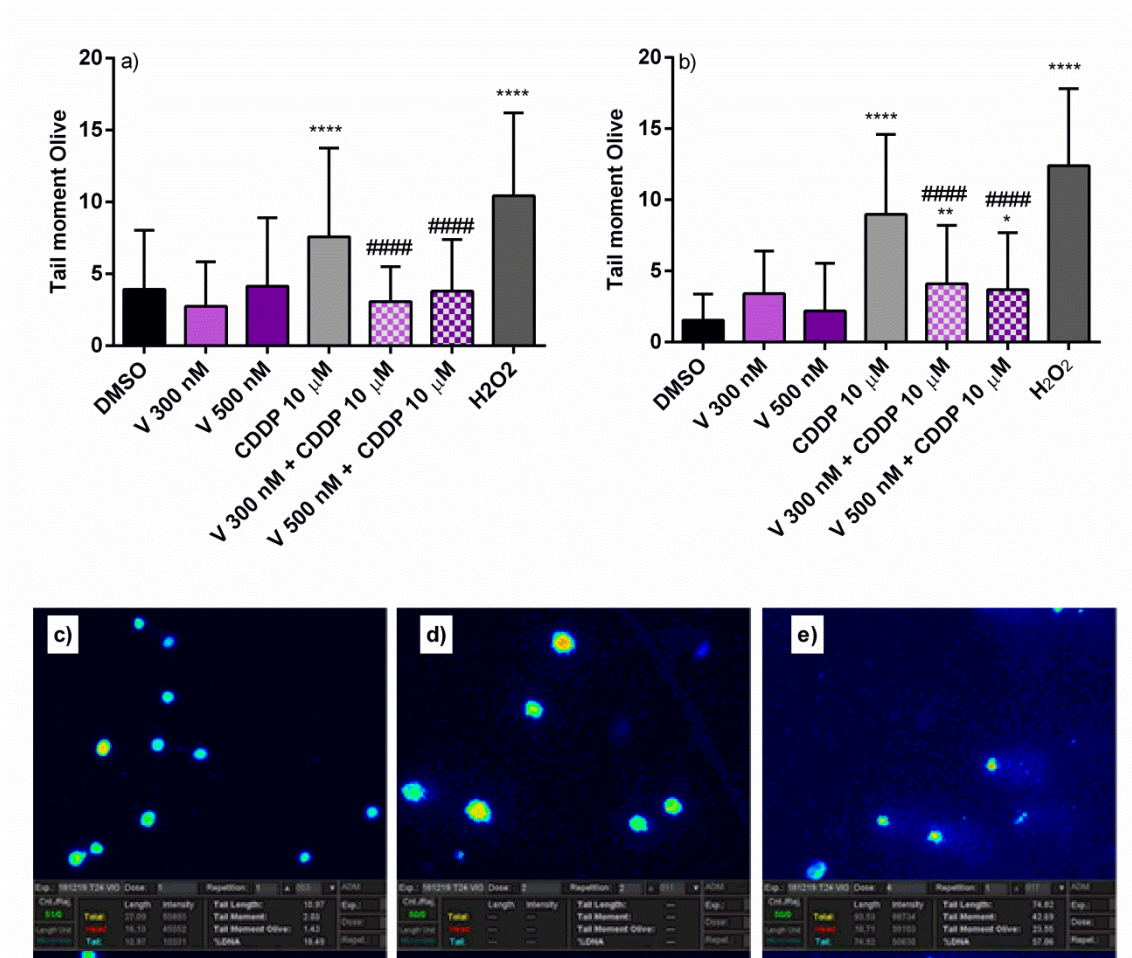


Figura 23. Estudio del efecto de la violaceína y el cisplatino en el daño primario en el ADN, el H₂O₂ fue utilizado como control positivo. Se representan la media y desvío estándar de tres experimentos independientes. a) Línea celular T24, b) Línea celular 253 J. Se indican los valores con significancia estadística según el Test de Tukey con respecto al control (DMSO) * P ≤ 0.5, ** P ≤ 0,01, *** P ≤ 0,001, **** P ≤ 0,0001 y significancia estadística respecto CDDP 10 μM (#### P ≤ 0,001 y ##### P ≤ 0,0001. Imágenes representativas de tratamientos observados en el Software Comet Image de c) DMSO, d) violaceína 300 nM y e) 500 nM.

6.3.4 Estudio del efecto de la violaceína sobre el ciclo celular

Vista la potente actividad antiproliferativa de la violaceína, se estudió el efecto de la violaceína sobre el ciclo celular mediante citometría de flujo. La violaceína produce en ambas líneas celulares un aumento de la fase sub G1, fracción asociada con la muerte celular en ambas concentraciones evaluadas. En la línea celular T24 (Figura 24) las células tratadas con violaceína evidenciaron un aumento de la fracción sub G1. Por otro lado, el CDDP a 10 μ M no produjo un aumento significativo de la fracción Sub G1, mientras que al combinar CDDP a 10 μ M con violaceína 300 nM y 500 nM produjeron un aumento en la fracción sub G1.

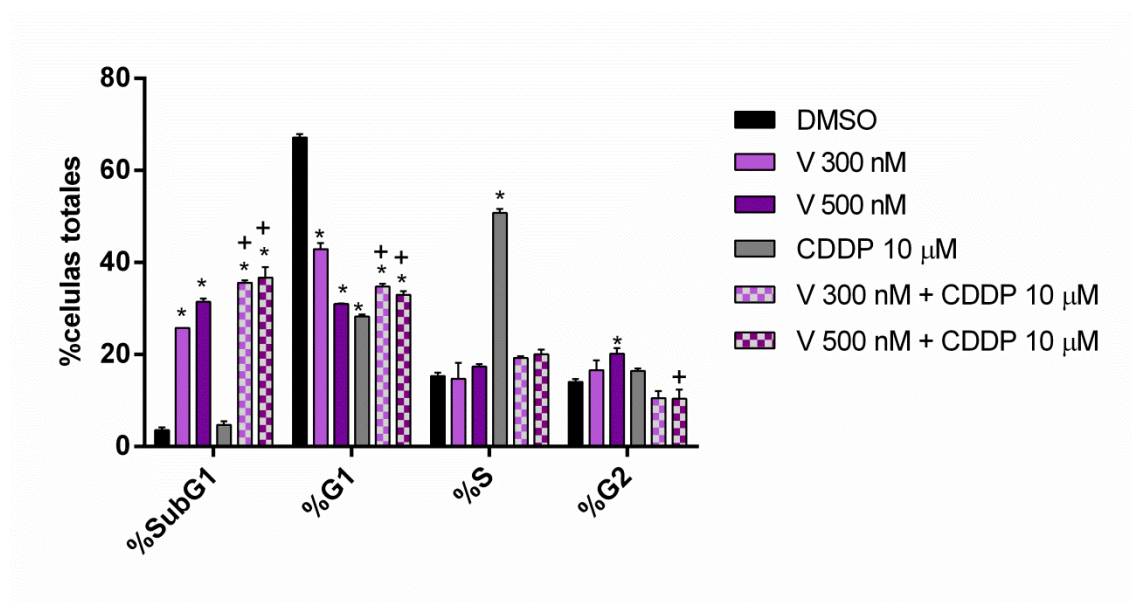


Figura 24. Estudio de la alteración del ciclo celular en la línea T24. Se representan la media y desvío estándar de dos experimentos independientes, por parte de la violaceína (V), el cisplatino (CDDP) y ensayos combinados. Se realizó el test de Tukey indicando * $P \leq 0,001$, significancia estadística con respecto al control (DMSO). # $P \leq 0,001$ Significancia estadística respecto al CDDP 10 μ M.

En la línea 253 J (Figura 25), la violaceína produjo un aumento significativo de Sub G1. Por otro lado, al combinar CDDP a 10 μ M con las distintas concentraciones de violaceína no produce un aumento en sub G1 respecto al tratamiento con violaceína a la misma concentración.

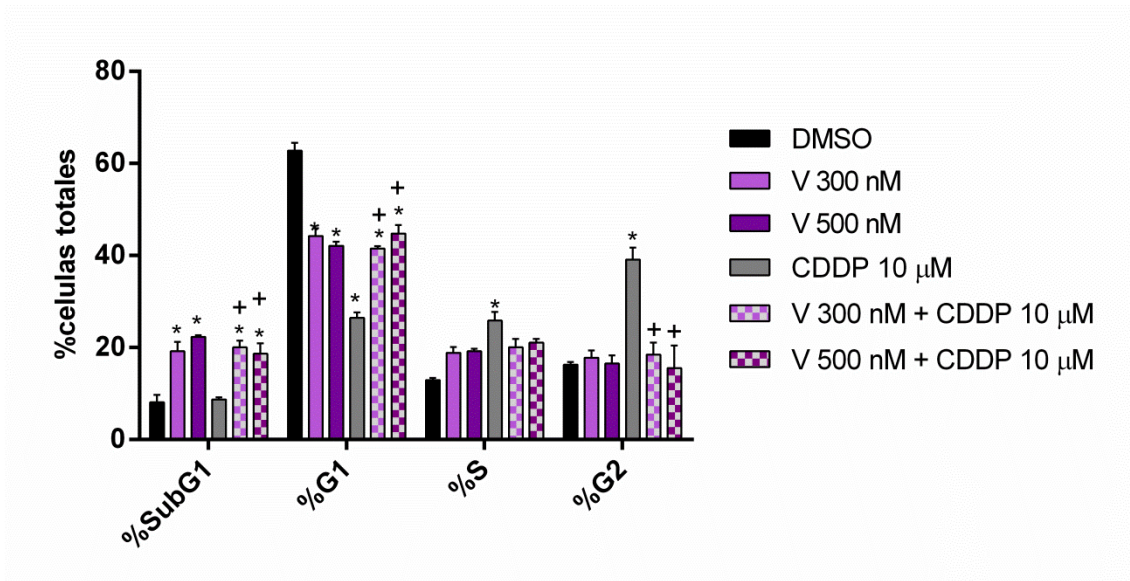


Figura 251. Estudio de la alteración del ciclo celular en la línea 253 J. Se representan la media y desvío estándar de dos experimentos independientes, por parte de la violaceína (V), el cisplatino (CDDP) y ensayos combinados. Se realizó el test de Tukey indicando * $P \leq 0,001$, significancia estadística con respecto al control (DMSO). # $P \leq 0,001$ Significancia estadística respecto al CDDP 10 μM .

6.3.5 Estudio de la inducción de apoptosis por violaceína

Ante el posible efecto pro apoptótico de la violaceína se estudió el efecto de la violaceína sobre la apoptosis empleando el ensayo de Anexina V y evaluación por citometría de flujo a dos tiempos 12 h y 24 h. Como se observa en las Figuras 26 y 27 en ambas líneas celulares T24 y 253 J a las 12 h los únicos tratamientos que evidencian una disminución significativa ($P \leq 0,0001$) de las células vivas respecto al DMSO son los tratamientos con violaceína y los co-tratamientos con violaceína. Por otro lado, tanto los tratamientos como los co-tratamientos combinados con CDDP aumentan significativamente la muerte celular por vía de la apoptosis en ambas líneas. No existieron diferencias significativas entre los tratamientos con violaceína y los co-tratamientos de violaceína con CDDP a la misma dosis. Ni el CDPP 10 μM ni la Camptotecina 2,5 μM presentaron disminución de las células viables en forma significativas. Finalmente, la violaceína aumenta la muerte por necrosis respecto al DMSO.

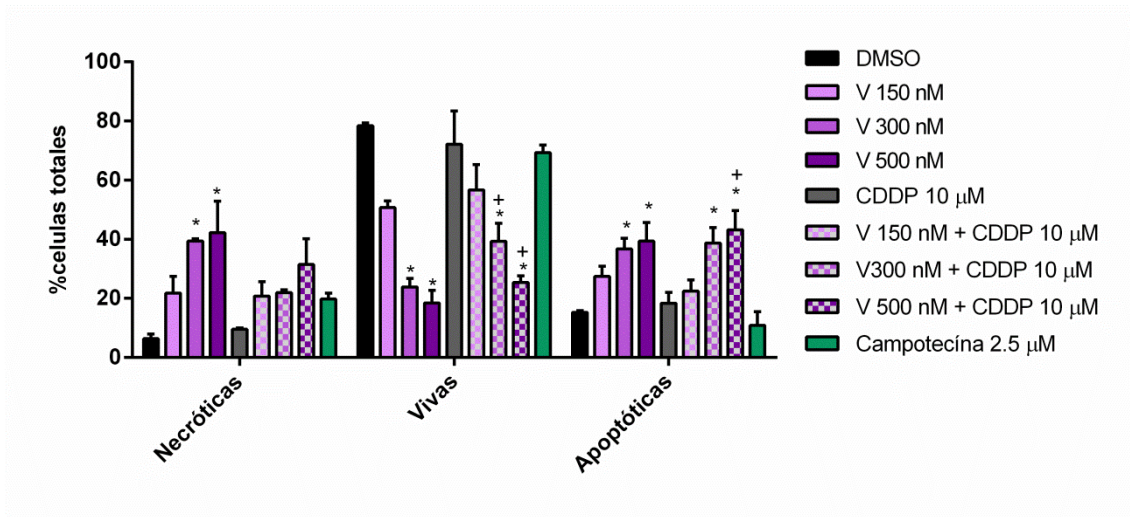


Figura 26. Estudio de la apoptosis en la línea T24 a las 12 h. Se representan la media y desvío estándar de dos experimentos independientes, por parte de la violaceína (V), el cisplatino (CDDP) y ensayos combinados, la Campotecina se utilizó como control positivo. Las células que presentaron marcación con yoduro de propidio (IP) se tomaron como necróticas, las que no presentaron marcación como vivas, y las que presentaron marcación con Anexina V como apoptóticas (para detalles metodológicos ver anexo I). Se realizó el test de Tukey indicando * $P \leq 0,001$, significancia estadística con respecto al control (DMSO). # $P \leq 0,001$ Significancia estadística respecto al CDDP 10 μM .

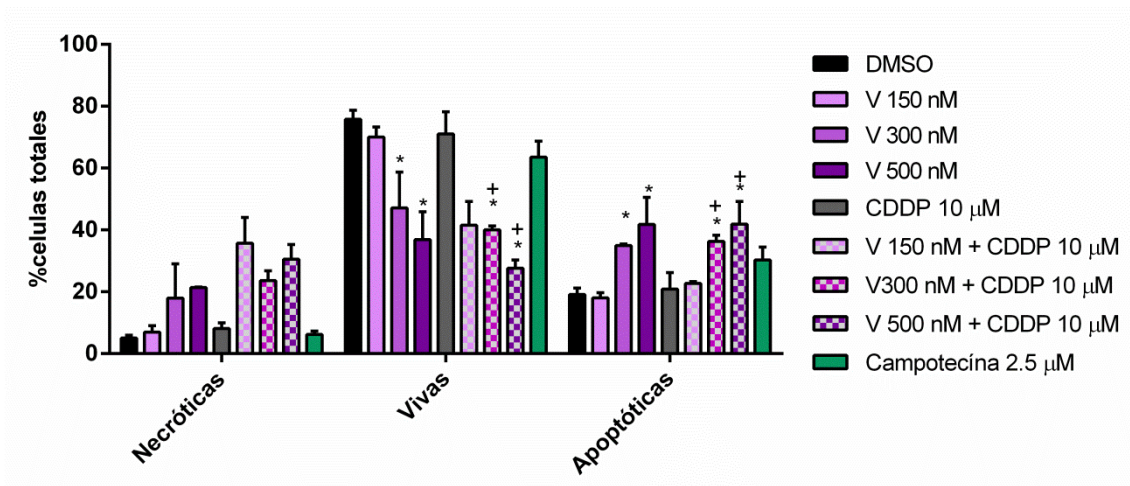


Figura 27. Estudio de la apoptosis inducida en la línea celular 253 J a las 12 h. Se representan la media y desvío estándar de dos experimentos independientes, por parte de la violaceína (V), el cisplatino (CDDP) y ensayos combinados, la Campotecina se utilizó como control positivo. Las células que presentaron marcación con yoduro de propidio (IP) se tomaron como necróticas, las que no presentaron marcación como vivas, y las que presentaron marcación con Anexina V como apoptóticas (para detalles

metodológicos ver anexo I). Se realizó el test de Tukey indicando * $P \leq 0,001$, significancia estadística con respecto al control (DMSO). # $P \leq 0,001$ Significancia estadística respecto al CDDP $10 \mu\text{M}$.

A las 24 h de tratamiento (Figuras 28 y 29), todos los tratamientos presentan una disminución significativa de las células vivas. Además, se observa un aumento de las células apoptóticas para todas las concentraciones de violaceína evaluadas en ambas líneas celulares. Por otro lado, tanto el cisplatino como la Camptotecina (control positivo) presentan un aumento de la apoptosis recién a las 24 h. Cuando se combinan cisplatino y violaceína se observa un incremento de las células apoptóticas y necróticas.

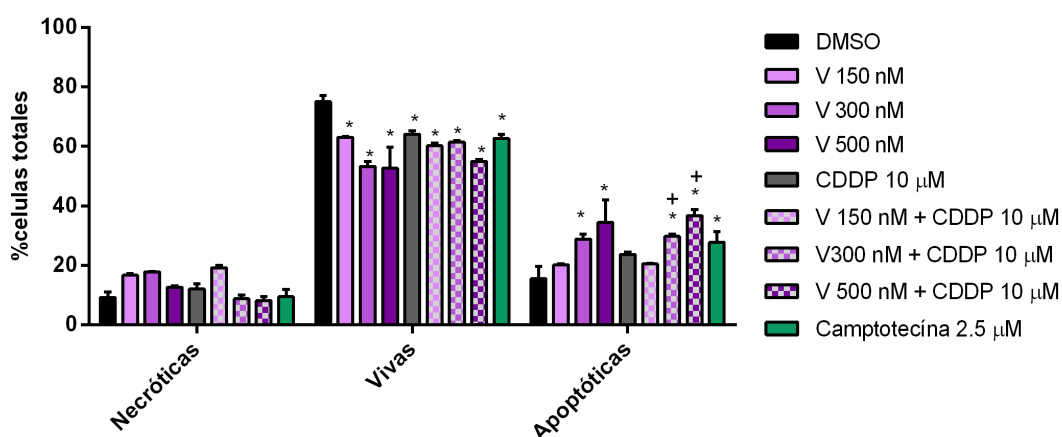


Figura 28. Estudio de la apoptosis en la línea celular T24 a las 24 h. Se representan la media y desvío estándar de dos experimentos independientes, por parte de la violaceína (V), el cisplatino (CDDP) y ensayos combinados, la Camptotecina se utilizó como control positivo. Las células que presentaron marcación con yoduro de propidio (IP) se tomaron como necróticas, las que no presentaron marcación como vivas, y las que presentaron marcación con Anexina V como apoptóticas (para detalles metodológicos ver anexo I). Se realizó el test de Tukey indicando * $P \leq 0,001$, significancia estadística con respecto al control (DMSO). # $P \leq 0,001$ Significancia estadística respecto al CDDP $10 \mu\text{M}$.

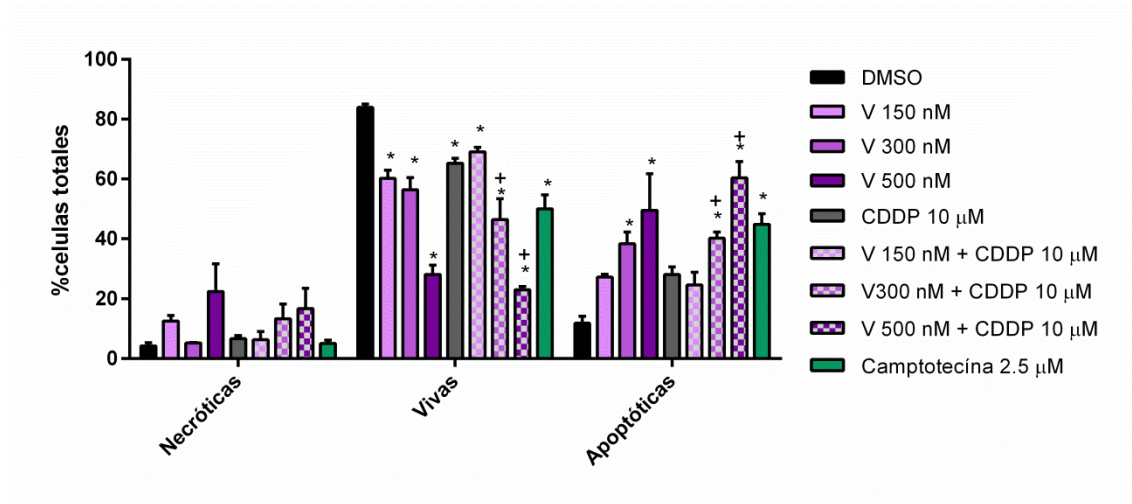


Figura 29. Estudio de inducción de células apoptóticas en la línea 253J a las 24 h. Se representan la media y desvío estándar de dos experimentos independientes, por parte de la violaceína (V), el cisplatino (CDDP) y ensayos combinados, la Camptotecina se utilizó como control positivo. Las células que presentaron marcación con ioduro de propidio (IP) se tomaron como necróticas, las que no presentaron marcación como vivas, y las que presentaron marcación con Anexina V como apoptóticas (para detalles metodológicos ver anexo I). Se realizó el test de Tukey indicando * $P \leq 0,001$, significancia estadística con respecto al control (DMSO). # $P \leq 0,001$ Significancia estadística respecto al CDDP $10 \mu\text{M}$.

De acuerdo a los resultados obtenidos al estudiar la inducción de apoptosis mediante violaceína, esta molécula parece inducir rápidamente la apoptosis en ambas líneas celulares. Además este efecto parecería ser mayor en combinación con el CDDP.

6.3.6 Estudio del efecto de la violaceína sobre el cierre de herida

Dado la importancia del proceso metastásico en la evolución del proceso tumoral, se estudiaron los efectos de la violaceína sobre el cierre de herida, que está relacionado con la migración celular durante la formación de metástasis. La violaceína demostró reducir significativamente el cierre del área de herida en ambas líneas celulares (Figura 30), el cual se incrementó de manera proporcional a la dosis empleada.

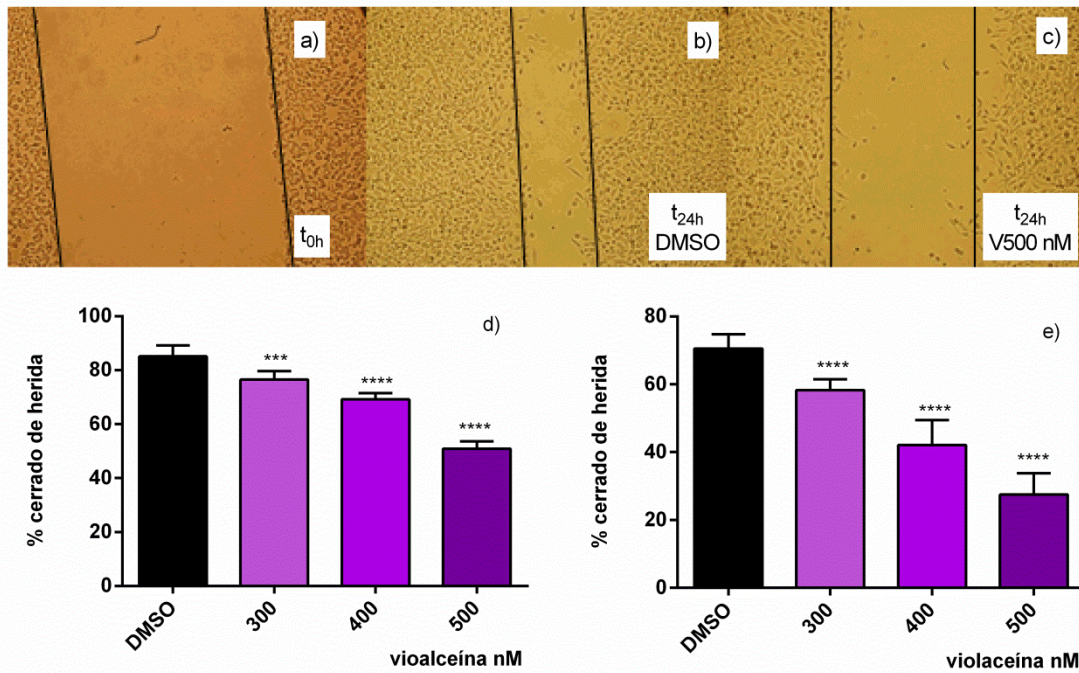


Figura 30. Ensayo de inhibición de cierre de herida de la violaceína en las líneas celulares. Se representa la media y el desvío estándar de dos experimentos independientes. a) Imagen representativa de la herida a tiempo 0h en la línea 253J. b) Imagen representativa de la herida a tiempo 24 h en la línea 253J para el tratamiento control de DMSO. c) Imagen representativa de la herida a tiempo 24 h en la línea 253J para el tratamiento de violaceína 500 nM. d) Porcentaje de cierre de herida para la línea T24 y e) 253 J. Los resultados se trataron en forma estadística mediante el test one way ANOVA y el test de multicomparación de Tukey. *** indica $p \leq 0,001$ respecto al control de DMSO.

La violaceína parece inhibir la migración celular, este efecto se observa una proporcional a la dosis de violaceína empleada.

6.3.6 Estudio del efecto de la violaceína sobre el crecimiento celular independiente de sustrato

Otra característica de las células que presentan un fenotipo metastásico es el crecer de forma independiente del sustrato. Por ello, se estudió el efecto de la violaceína sobre los esferoides de las líneas celulares derivadas de cáncer de vejiga T24 y 253 J. Como se observa en la Figura 31 la violaceína mostró un efecto sobre ambas líneas celulares, reduciendo la viabilidad medida por el método de reducción de la RZ. Es de destacar que este tipo de crecimiento a diferencia del

cultivo en monocapa, se asemeja más al crecimiento tumoral, donde existe variabilidad en cuanto a la disponibilidad de nutrientes, intercambio gaseoso y biodisponibilidad de fármacos entre otros.

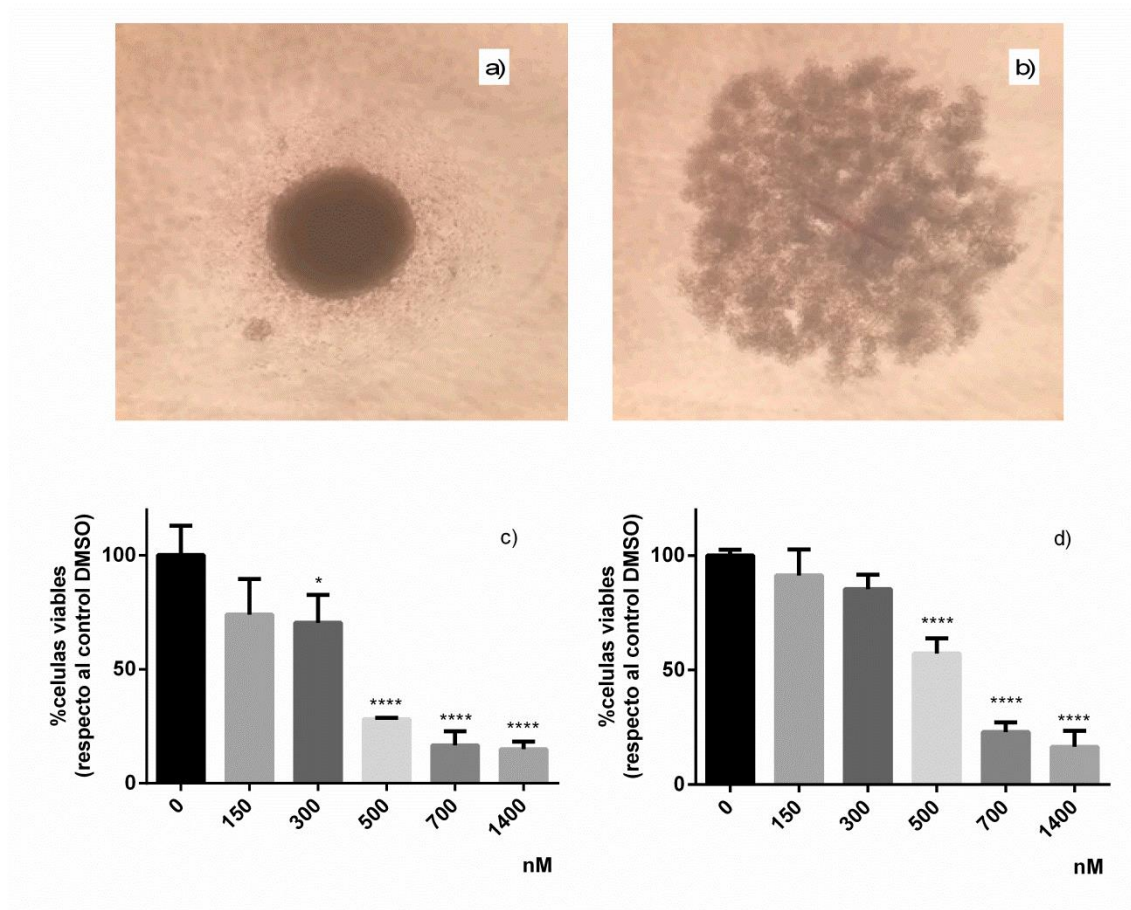


Figura 31. Efecto de la violaceína sobre esferoides de las líneas T24 y 253 J. Se representa la media y el desvío estándar de dos experimentos independientes. a) Imagen representativa la línea T24 que forma esferoides regulares. b) Imagen representativa la línea 253J que forma esferoides irregulares c) T24 y d) 253 J. Los resultados se trataron en forma estadística mediante el test one way ANOVA y el test de multicomparación de Tukey. * $P \leq 0,5$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$ indican diferencia respecto al control de DMSO. La violaceína mostró un efecto similar al cultivo en dos dimensiones.

DISCUSIÓN CAPÍTULO III

En este capítulo se estudió el efecto de la violaceína en líneas celulares derivadas de cáncer de vejiga y la capacidad de actuar en combinación con el CDDP para sensibilizar a las líneas

celulares. La violaceína mostró un efecto anti-proliferativo en ambas líneas celulares obteniendo valores de CI50 del orden de los 500 nM con el método RZ a las 24 h manteniéndose un efecto similar a las 48 h. Por otro lado, el CDDP presentó valores de CI50 mayores en la línea 253 J que en la línea T24 según lo esperado (Hernández *et al.*, 2019). El efecto del CDDP aumenta a las 48 h mientras que el efecto de la violaceína se mantiene en el tiempo (Tabla 8).

La violaceína a una concentración de 150 nM demostró incrementar el efecto citotóxico del CDDP, obteniéndose una disminución en el CI50 a la mitad en ambas líneas celulares (Tabla 8), logrando una disminución de la viabilidad utilizando concentraciones más bajas de CDDP. Es de destacar que este efecto es evidente desde las 24 h. Se ha demostrado un efecto sinérgico de la violaceína con el 5 fluorouracilo (Kodach *et al.*, 2006). Es de destacar que los modos de acción de estas moléculas son distintos, mientras el 5 fluorouracilo es un análogo de base, el CDDP actúa formando aductos covalentes con el ADN, estructuras aberrantes que impiden el correcto desarrollo de la síntesis del ADN (Dasari y Bernard Tchounwou, 2014). Al combinar el CDDP con la violaceína se produjo una reducción del CI50 cercana a la mitad y el efecto se pudo observar a las 24 h.

Si comparamos el efecto sensibilizador de la violaceína con otras moléculas de origen natural, parecería ser que la violaceína actúa a concentraciones menores. Por ejemplo, se ha demostrado que la curcumína un polifenol derivado de los rizomas de la cúrcuma (*Curcuma longa*) sensibilizó a células derivadas de cáncer de ovario al CDDP a concentraciones de 10 y 20 μ M (Yallapu *et al.*, 2010), la quercetina un polifenol extraído de varias plantas sensibilizó células derivadas de cáncer de colon a concentraciones de 50 μ M (Jin *et al.*, 2016), otro ejemplo es la crocína un carotenoide aislado del azafrán (*Crocus Sativus* L.) que sensibilizó células derivadas de cáncer de cuello uterino al CDDP a concentraciones de 1,5 y 3 mg/mL (Mollaei *et al.*, 2019) y la cryptotanshinona aislada de *Salvia miltiorrhiza* Bge que sensibilizó células derivadas de cáncer de ovario al CDDP a concentraciones de 10 μ M (Jiang *et al.*, 2017).

Al evaluar el efecto genotóxico de la violaceína, se observó un freno de la división celular que nos impidió evaluar la frecuencia de micronúcleos al no poder alcanzar las 500 células binucleadas en varios puntos experimentales. En las concentraciones efectivamente evaluadas llegamos a observar que la violaceína no induce un aumento significativo de la formación de micronúcleos en ambas líneas celulares. Las células binucleadas son aquellas que alcanzaron la mitosis post exposición al agente y debido a la presencia de citocalacina B no llegan a completar la citocinesis (Fenech, 2007). De este modo se nota una disminución de las células que llegan a dividirse en presencia de violaceína en las dos concentraciones evaluadas.

Para soslayar este efecto se utilizó la cafeína según se discutió en el capítulo anterior. No se observó efecto genotóxico de la violaceína, incluso la violaceína demostró reducir el efecto genotóxico del cisplatino cuando se utilizó en combinación con éste. Probablemente esto se deba a que cuando el cisplatino produce daño en el ADN, las células co-tratadas con violaceína responden rápidamente al daño induciendo la muerte.

Seguidamente, al evaluar el daño primario se observó que la violaceína no producía efecto sobre el ADN incluso a 500 nM. Por otro lado, se reduce el efecto sobre el daño primario producido por el cisplatino. En el caso de las muestras co-tratadas no se observa daño primario.

Se estudió el efecto sobre el ciclo celular de la violaceína evidenciando un aumento de la fracción sub G1, lo que sugiere presencia de células que mueren mediante apoptosis. Este tipo de efecto es consistente con el freno característico del CDDP, dado que el CDDP forma aductos con el ADN frenando la síntesis (Galluzzi *et al.*, 2012; Dasari and Bernard Tchounwou, 2014). Las células al reconocer el daño intentan repararlo y al no poder repararlo, inducen apoptosis, sin embargo, algunas células logran sobrevivir a este efecto generándose resistencia al fármaco (Galluzzi *et al.*, 2012; Castedo *et al.*, 2018). Al realizar co-tratamientos de CDDP con violaceína, se obtiene un efecto similar al tratamiento con violaceína sola, observándose un aumento aun mayor de la fracción Sub G1. Esto podría deberse a que cuando se coloca el cisplatino en combinación con la violaceína, las células co-tratadas restablecerían la maquinaria

de muerte celular por lo que las células al detectar el daño en el ADN producido por el CDDP rápidamente responden induciendo apoptosis. Se necesitarán estudios complementarios para validar esta hipótesis.

La violaceína ha demostrado producir muerte por apoptosis en distintas líneas celulares derivadas de cánceres humanos. Por ejemplo, en líneas celulares derivadas de cáncer de colon el estrés oxidativo inducido por la violaceína es un inductor de la apoptosis celular en Caco-2, pero no en las células HT29, lo que sugiere la existencia de mecanismos de acción específicos de la violaceína para distintos tipos de células (De Carvalho *et al.*, 2006).

Este efecto se demostró en ambas líneas celulares derivadas de cáncer de vejiga. Sorprendentemente este efecto se observó a las 12 h. Por otro lado, el cisplatino mostró un aumento de la apoptosis a las 24 h, y fue mayor en la línea T24 que es más susceptible al CDDP. Al realizar en ambas líneas celulares co-tratamientos observamos un predominio del efecto de la violaceína (apoptosis a tiempo 12 h).

Se evaluó el efecto de la violaceína en el cierre de herida y en la viabilidad de esferoides, características de las células metastásicas, observando un efecto dosis dependiente en ambas líneas celulares (Hulkower and Herber, 2011; Liu *et al.*, 2016). Por otro lado, está descrito que la violaceína produce en la línea MCF7 (cáncer de mama) una inhibición de las metaloproteinasas de matriz, fundamentales en el proceso de metástasis (Platt *et al.*, 2014). Existen estudios que asocian la sobreexpresión de la deacetilasa de histona 6 (HDAC6) como un factor esencial para el fenotipo metastático en varios tipos de cáncer (Liu *et al.*, 2016). En tal sentido, ha sido observado una sobreexpresión de HDAC6 en líneas metastásicas derivadas de cáncer de vejiga (Zuo *et al.*, 2012). Asimismo, ha sido demostrado que el pigmento violaceína actúa como inhibidor de HDAC6 en células de melanoma (Gonçalves *et al.*, 2016). Los resultados de la reducción de la migración e inhibición de la viabilidad en esferoides, nos permiten plantear el estudio de la violaceína como un potencial agente antimetastático en

cáncer de vejiga. Se necesitarán estudios más extensos para validar esta actividad y su posible uso.

7 DISCUSIÓN GENERAL

La Antártida es un continente poco explorado, caracterizado por sus condiciones ambientales extremas para el humano y otras formas de vida. Nuestra hipótesis planteó que al ser un continente poco explorado y con un ambiente hostil y único, las bacterias podrían producir moléculas novedosas y que además podrían presentar actividad antitumoral en líneas celulares de cáncer de vejiga y cáncer de cuello uterino.

En este estudio se evaluaron los extractos metanólicos provenientes de los pellets celulares de seis bacterias antárticas, de las cuales sólo una resultó activa frente a líneas celulares de cáncer de vejiga. La molécula responsable de la actividad resultó ser la violaceína, una molécula conocida y producida por varios microorganismos, como se mencionó en la discusión del CAPITULO I. La violaceína ha demostrado tener distintas actividades *in vitro*, lo que permite plantearlo como una molécula de potencial interés farmacéutico. Encontrar nuevas fuentes de violaceína y aumentar su producción resulta de interés biotecnológico.

Diferentes investigadores han utilizado dos estrategias para aumentar los rendimientos de producción de violaceína: aumentar la producción de biomasa de las bacterias nativas modificando las condiciones del medio de cultivo (Choi, Kim, *et al.*, 2015; Kanelli *et al.*, 2018). En este trabajo, se optó por la optimización del medio de cultivo, dado a que el pigmento se produce como respuesta al estrés (por ejemplo, disminuyendo la temperatura de crecimiento). De esta forma se logró un rendimiento aceptable que permitió y permitirá ahondar en el estudio de la violaceína.

Durante la realización del CAPITULO II, se logró optimizar la producción y purificación de la violaceína, a bajo costo y alta pureza. Podemos definir que el costo de producción de un bioproducto en dos partes, aguas arriba y aguas abajo: la parte aguas arriba contiene sustratos, incluidos los pretratamientos de sustrato, la energía del proceso, incluida la esterilización, agitación, aireación, enfriamiento y calentamiento. Por otro lado, la parte aguas abajo requiere equipo y energía para separar las bacterias de su medio de crecimiento, extraer y purificar

productos intracelulares o extracelulares. Cualquier intento de reducir el consumo de energía es beneficioso para la reducción de los costos de producción (Chen and Jiang, 2018). Asumiendo estos costos se realizó un estimativo (ver anexo II), donde podemos estimar el costo de miligramo de violaceína UV13 en US\$ 18,62. Es de destacar que el costo del miligramo de violaceína (con un grado de pureza $\geq 85\%$), según se encuentra en la página web de la empresa Sigma es de US\$ 415,72 (Sigma EEUU, # V9389, <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/v9389?lang=en®ion=UY>), por lo que el costo de producir un mg de violaceína de la bacteria UV13, en condiciones optimizadas sería 22,33 veces más económico. Serán necesarios estudios de costos a mayor escala para poder proyectar a nuestro pigmento como un producto con alto potencial comercial.

Otra alternativa para aumentar la producción de violaceína, es la producción heteróloga en otros microorganismos como son *Escherichia coli* (Fang *et al.*, 2015; Rupa *et al.*, 2018), *Vibrio natriegens* (Ellis *et al.*, 2019) o *Saccharomyces cerevisiae* (Chuang *et al.*, 2018). Si bien la expresión heteróloga ha resultado exitosa, implica el conocimiento del genoma del microorganismo productor, lo cual excedía al alcance de esta tesis. Por lo tanto, De igual modo creemos que la búsqueda (secuenciación del genoma de UV13) y la expresión heteróloga del operon *vioABCDE*, el cual codifica para la producción de las cinco enzimas de la vía de producción de la violaceína es una opción atractiva a futuro que debe ser explorada.

En el CAPITULO III, se estudió el efecto de la violaceína y se comprobó el efecto sensibilizador al cisplatino en líneas derivadas de cáncer de vejiga. Como se mencionó en la Introducción, el cisplatino es el fármaco de referencia, pero presenta el inconveniente de tener efectos secundarios adversos y generar resistencias. Se observó que el efecto de la violaceína en líneas derivadas de cáncer de vejiga el efecto no se debe a la genotoxicidad. Además se comprobó que la violaceína induce la apoptosis incluso a las 12 h de su aplicación. Finalmente se dio un primer paso en la evaluación del efecto de la violaceína *in vitro* sobre características típicas de las células metastásicas como el crecimiento independiente de sustrato o la

inhibición de la migración. Se necesitara un abordaje más extenso para validar y caracterizar este efecto.

Obtener la violaceína en alta cantidad permitió el desarrollo de nuevas líneas de investigación en colaboración con otros grupos de trabajo, estudiando su posible uso para otras aplicaciones biomédicas. Como ejemplo, en colaboración con el grupo de la Dra. Silvia Olivera, se evaluó la violaceína como posible fármaco en células modelo de la esclerosis lateral amiotrófica, demostrando que la violaceína posee actividad antiproliferativa en los astrocitos aberrantes (AbAs) a dosis menores que las que afectan la funcionalidad y supervivencia de astrocitos normales y de células de glioma de rata, lo que permitiría un abordaje selectivo dirigido hacia los AbAs (Otero, 2019). Como resultado de esta colaboración se encuentra en proceso de elaboración un manuscrito.

La violaceína ha demostrado ser un pigmento con múltiples posibles actividades farmacológicas y biotecnológicas, para lo cual es importante contar con cantidades que permitan estudios en modelos animales y nuevos abordajes como ser la síntesis a partir de la violaceína o análogos de violaceína, así como el estudio de los blancos moleculares.

8 CONCLUSIONES

En la presente tesis se puso a punto la producción y purificación de un compuesto con propiedades antiproliferativas en líneas celulares derivadas de tumores. Este compuesto se identificó como violaceína. El pigmento presentó capacidad citotóxica, permitiendo sensibilizar células tumorales (derivadas de cáncer de vejiga y de cáncer de cuello uterino), a dosis menores de cisplatino. Finalmente se comprobó que el mecanismo de acción de la violaceína no se debe a la inducción de daño genotóxico, sino a través de muerte celular cuyo mecanismo molecular se desconoce.

9 PERSPECTIVAS

Identificar la bacteria. Para ello se planteará la secuenciación del microorganismo. Esto a su vez planteará nuevas posibilidades de optimización mediante procesos del tipo mutagénesis dirigida.

Continuar con la optimización de los procesos de producción y purificación de la violaceína. Si bien en el presente trabajo se realizó una aproximación, es posible un abordaje más profundo que permitan producir más cantidad de violaceína en estado de pureza

Estudio en células normales. Aunque la violaceína ha demostrado no tener efecto en células normales como fue mencionado en la discusión del Capítulo I. Es necesario evaluar la combinación de la violaceína y el cisplatino en células normales.

Estudio del modo de acción de la violaceína y *target* celular. Si bien como se expuso anteriormente, se sabe que en varias líneas celulares derivadas de cáncer actúa favoreciendo la apoptosis, el modo por el cual genera apoptosis no se conoce aún, y puede que no sea el mismo en todas las líneas en las cuales presenta actividad antiproliferativa (Durán *et al.*, 2012; Choi, Yoon, *et al.*, 2015). Además, no se halló en la bibliografía información sobre el *target* molecular de la violaceína. Descubrir el *target* molecular nos permitirá aproximarnos a las vías moleculares implicadas, mejorar mediante diseño la afinidad hacia el blanco molecular, disminuir las posibles toxicidades inespecíficas, mejorando, de ser necesario, sus propiedades físicas (como la lipofilidad, solubilidad, vida media, etc).

Estudio del efecto antimetastásico. Es necesario avanzar en el conocimiento del proceso y en la posible utilización de la violaceína como antimetastásico. Para ello, el primer paso es estudiar el efecto de la violaceína sobre las metaloproteinasas de matriz.

Estudios *in vivo*. El cultivo celular es una buena estrategia para la evaluación de compuestos antitumorales, sin embargo dado que muchos compuestos antitumorales presentan propiedades *in vitro* que no se reproducen en un organismo complejo es necesario plantear la evaluación de la violaceína en un modelo de cáncer de vejiga animal.

10 BIBLIOGRAFÍA

Alshatwi, A. A., Subash-Babu, P. and Antonisamy, P. (2016) "Violacein induces apoptosis in human breast cancer cells through up regulation of BAX, p53 and down regulation of MDM2", *Experimental and Toxicologic Pathology*. Elsevier GmbH., 68(1), pp. 89–97. doi:10.1016/j.etp.2015.10.002.

Atalah, J., Blamey, L., Muñoz-Ibacache, S., Gutierrez, F., Urzua, M., Encinas, M. V., Páez, M., Sun, J. and Blamey, J. M. (2020) "Isolation and characterization of violacein from an Antarctic Iodobacter: a non-pathogenic psychrotolerant microorganism", *Extremophiles*. Springer Japan, 24(1), pp. 43–52. doi:10.1007/s00792-019-01111-w.

Atalah, J., Blamey, L., Muñoz, S., Felipe, I., Marcela, G., Victoria, M., Maritza, E., Junsong, P. and Jenny, S. (2019) "Isolation and characterization of violacein from an Antarctic Iodobacter: a non - pathogenic psychrotolerant microorganism", *Extremophiles*. Springer Japan, (0123456789). doi:10.1007/s00792-019-01111-w.

Ayé, A. M., Bonnin-Jusserand, M., Brian-Jaisson, F., Ortalo-Magné, A., Culioli, G., Nevry, R. K., Rabah, N., Blache, Y. and Molmeret, M. (2015) "Modulation of violacein production and phenotypes associated with biofilm by exogenous quorum sensing N-acylhomoserine lactones in the marine bacterium *Pseudoalteromonas ulvae* TC14", *Microbiology (United Kingdom)*, 161(10), pp. 2039–2052. doi:10.1099/mic.0.000147.

Barrios, E. and Garau, M. (2017) "Cáncer: magnitud del problema en el mundo y en Uruguay, aspectos epidemiológicos", *Anales de la Facultad de Medicina*, 4(1), pp. 04–66. doi:10.25184/anfamed2017.4.1.2.

Bernardes, N., Seruca, R., Chakrabarty, A. M. and Fialho, A. M. (2010) "Microbial-based therapy of cancer Current progress and future prospects", 1(3), pp. 178–190.

Bode, A. M. and Dong, Z. (2007) "The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer", *Cancer Letters*, 247(1–2), pp. 26–39. doi:10.1016/j.canlet.2006.03.032.

- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. and Jemal, A. (2018) "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries", *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), pp. 394–424. doi:10.3322/caac.21492.
- Bromberg, N., Dreyfuss, J. L., Regatieri, C. V., Palladino, M. V., Durán, N., Nader, H. B., Haun, M. and Justo, G. Z. (2010) "Growth inhibition and pro-apoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor", *Chemico-Biological Interactions*, 186(1), pp. 43–52. doi:10.1016/j.cbi.2010.04.016.
- Brunelle, J. K. and Zhang, B. (2010) "Apoptosis assays for quantifying the bioactivity of anticancer drug products", *Drug Resistance Updates*. Elsevier Ltd, 13(6), pp. 172–179. doi:10.1016/j.drug.2010.09.001.
- De Carvalho, D. D., Costa, F. T. M., Duran, N. and Haun, M. (2006) "Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells".
- Cary, S. C., McDonald, I. R., Barrett, J. E. and Cowan, D. A. (2010) "On the rocks: The microbiology of Antarctic Dry Valley soils", *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 8(2), pp. 129–138. doi:10.1038/nrmicro2281.
- Castedo, M., Obrist, F. and Kroemer, G. (2018) "Cisplatin resistance coupled to enhanced sensitivity to metabolic interventions", *Molecular & Cellular Oncology*. Taylor & Francis, 5(6), pp. 1–3. doi:10.1080/23723556.2018.1526004.
- Chen, G. Q. and Jiang, X. R. (2018) "Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria", *Current Opinion in Biotechnology*, 50, pp. 94–100. doi:10.1016/j.copbio.2017.11.016.
- Cheung-Ong, K., Giaever, G. and Nislow, C. (2013) "DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: Serendipity and chemical biology", *Chemistry and Biology*. Elsevier Ltd, 20(5), pp. 648–659. doi:10.1016/j.chembiol.2013.04.007.

Choi, S. Y., Kim, S., Lyuck, S., Kim, S. B. and Mitchell, R. J. (2015) "High-level production of violacein by the newly isolated *Duganella violaceinigra* str. NI28 and its impact on *Staphylococcus aureus*", *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 5(September), pp. 1–12. doi:10.1038/srep15598.

Choi, S. Y., Yoon, K., Lee, J. Il and Mitchell, R. J. (2015) "Violacein: Properties and Production of a Versatile Bacterial Pigment", *BioMed Research International*, 2015(January), pp. 1–8. doi:10.1155/2015/465056.

Choi, W., Shah, J. B., Tran, M., Svatek, R., Marquis, L., Lee, I. L., Yu, D., Adam, L., Wen, S., Shen, Y., Dinney, C., McConkey, D. J. and Siefker-Radtke, A. (2012) "P63 Expression Defines a Lethal Subset of Muscle-Invasive Bladder Cancers", *PLoS ONE*, 7(1). doi:10.1371/journal.pone.0030206.

Chuang, J., Boeke, J. D. and Mitchell, L. A. (2018) "Coupling yeast golden gate and VEGAS for efficient assembly of the violacein pathway in *saccharomyces cerevisiae*", *Methods in Molecular Biology*, 1671, pp. 211–225. doi:10.1007/978-1-4939-7295-1_14.

Cohen, P. A., Jhingran, A., Oaknin, A. and Denny, L. (2019) "Cervical cancer", *The Lancet*. Elsevier Ltd, pp. 169–182. doi:10.1016/S0140-6736(18)32470-X.

Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer (2019a) "EN URUGU AbsY".

Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer (2019b) "Situacion Epidemiologica del Uruguay en relacion al Cancer", *Registro Nacional del Cáncer, Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer*, pp. 1–61. Available at: http://www.comisioncancer.org.uy/uc_513_1.html.

Cowan, D. A. and Tow, L. A. (2004) "Endangered Antarctic Environments", *Annual Review of Microbiology*, 58(1), pp. 649–690. doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.090811.

Cragg, G. M. and Newman, D. J. (2013) "Natural products: A continuing source of novel drug leads", *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(6), pp. 3670–3695. doi:10.1016/j.bbagen.2013.02.008.

Cumberbatch, M. G. K., Jubber, I., Black, P. C., Esperto, F., Figueroa, J. D., Kamat, A. M., Kiemeny, L., Lotan, Y., Pang, K., Silverman, D. T., Znaor, A. and Catto, J. W. F. (2018) "Epidemiology of Bladder Cancer: A Systematic Review and Contemporary Update of Risk Factors in 2018", *European Urology*. European Association of Urology, pp. 784–795. doi:10.1016/j.eururo.2018.09.001.

Dasari, S. and Bernard Tchounwou, P. (2014) "Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action", *European Journal of Pharmacology*, 740, pp. 364–378. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025.

Delgado-Vargas, F., Jimenez, A. R. and Paredes-Lopez, O. (2000) *Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability, Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40:3. doi:10.1080/10408690091189257.

Dieser, M., Greenwood, M. and Foreman, C. M. (2010) "Carotenoid pigmentation in Antarctic heterotrophic bacteria as a strategy to withstand environmental stresses", *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 42(4), pp. 396–405. doi:10.1657/1938-4246-42.4.396.

Durán, M., Ponezi, A. N., Faljoni-Alario, A., Teixeira, M. F. S., Justo, G. Z. and Durán, N. (2012) "Potential applications of violacein: A microbial pigment", *Medicinal Chemistry Research*. doi:10.1007/s00044-011-9654-9.

Durán, N., Justo, G. Z., Melo, P. S., Azevedo, M. B. M. De, Brito, A. R. M. S., Almeida, A. B. A. and Haun, M. (2003) "Evaluation of the antiulcerogenic activity of violacein and its modulation by the inclusion complexation with α -cyclodextrin", 396, pp. 387–396. doi:10.1139/Y03-033.

El-Naggar, N. E. A. and El-Ewasy, S. M. (2017) "Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H", *Scientific Reports*. Nature

Publishing Group, 7(January), pp. 1–19. doi:10.1038/srep42129.

Ellis, G. A., Tschirhart, T., Spangler, J., Walper, S. A., Medintz, I. L. and Vora, G. J. (2019) "Exploiting the Feedstock Flexibility of the Emergent Synthetic Biology Chassis *Vibrio natriegens* for Engineered Natural Product Production", *Marine Drugs*, 17(12), pp. 1–21. doi:10.3390/md17120679.

Ethiraj, P., Veerappan, K., Samuel, S. and Sivapatham, S. (2016) "Interferon β improves the efficacy of low dose cisplatin by inhibiting NF- κ B/p-Akt signaling on HeLa cells", *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS, 82, pp. 124–132. doi:10.1016/j.biopha.2016.04.058.

Fang, M. Y., Zhang, C., Yang, S., Cui, J. Y., Jiang, P. X., Lou, K., Wachi, M. and Xing, X. H. (2015) "High crude violacein production from glucose by *Escherichia coli* engineered with interactive control of tryptophan pathway and violacein biosynthetic pathway", *Microbial Cell Factories*, 14(1), pp. 1–13. doi:10.1186/s12934-015-0192-x.

Fenech, M. (2007) "Cytokinesis-block micronucleus cytome assay", *Nature Protocols*, 2(5), pp. 1084–1104. doi:10.1038/nprot.2007.77.

Ferreira, C. V., Bos, C. L., Versteeg, H. H., Justo, G. Z., Durán, N. and Peppelenbosch, M. P. (2004) "Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death", *Blood*. doi:10.1182/blood-2004-02-0594.

Fialho, A., Bernardes, N. and Chakrabarty, A. (2011) "Recent Patents on Live Bacteria and their Products as Potential Anticancer Agents", *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 7(1), pp. 31–55. doi:10.2174/157489212798357949.

Gabani, P. and Singh, O. V. (2013) "Radiation-resistant extremophiles and their potential in biotechnology and therapeutics", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(3), pp. 993–1004. doi:10.1007/s00253-012-4642-7.

Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., Castedo, M. and

Kroemer, G. (2012) "Molecular mechanisms of cisplatin resistance", *Oncogene*. Nature Publishing Group, 31(15), pp. 1869–1883. doi:10.1038/onc.2011.384.

Gebel, T., Lantzsch, H., Pleßow, K. and Dunkelberg, H. (1997) "Genotoxicity of platinum and palladium compounds in human and bacterial cells", pp. 183–190.

Giansanti, V., Piscitelli, F., Camboni, T., Prosperi, E., La Regina, G., Parks, M., Silvestri, R. and Scovassi, A. I. (2010) "The human pluripotency gene NANOG/NANOGP8 is expressed in gastric cancer and associated with tumor development", *Oncology Letters*, 1(1), pp. 109–112. doi:10.3892/ol.

Gonçalves, P. R., Rocha-Brito, K. J. P., Fernandes, M. R. N., Abrantes, J. L., Durán, N. and Ferreira-Halder, C. V. (2016) "Violacein induces death of RAS-mutated metastatic melanoma by impairing autophagy process", *Tumor Biology*. doi:10.1007/s13277-016-5265-x.

Guigou, M., Cabrera, M. N., Vique, M., Bariani, M., Guarino, J., Ferrari, M. D. and Lareo, C. (2019) "Combined pretreatments of eucalyptus sawdust for ethanol production within a biorefinery approach", *Biomass Conversion and Biorefinery*. Biomass Conversion and Biorefinery, 9(2), pp. 293–304. doi:10.1007/s13399-018-0353-3.

Gupta, G. N., Srivastava, S., Khare, S. K. and Prakash, V. (2014) "Extremophiles: An Overview of Microorganism from Extreme Environment", *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 7(2), p. 371. doi:10.5958/2230-732x.2014.00258.7.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) "Hallmarks of cancer: The next generation", *Cell*. Elsevier Inc., 144(5), pp. 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hernández, P., Alem, D., Nieves, M., Cerecetto, H., González, M., Martínez-López, W. and Lavaggi, M. L. (2019) "Chemosensitizer effect of cisplatin-treated bladder cancer cells by phenazine-5,10-dioxides", *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Elsevier, 69(March), pp. 9–15. doi:10.1016/j.etap.2019.03.015.

Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B. and Johnston, P. G. (2013) "Cancer drug

resistance: An evolving paradigm", *Nature Reviews Cancer*, 13(10), pp. 714–726. doi:10.1038/nrc3599.

Hoshino, T. (2011) "Violacein and related tryptophan metabolites produced by *Chromobacterium violaceum*: Biosynthetic mechanism and pathway for construction of violacein core", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(6), pp. 1463–1475. doi:10.1007/s00253-011-3468-z.

Hulkower, K. I. and Herber, R. L. (2011) "Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery", *Pharmaceutics*, 3(1), pp. 107–124. doi:10.3390/pharmaceutics3010107.

Humphrey, P. A., Moch, H., Cubilla, A. L., Reuter, V. E. and Ulbright, T. M. (2016) "The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours", *European Urology*, 70(1), pp. 93–105. doi:10.1016/j.eururo.2016.02.029.

Ismaili, N., Amzerin, M. and Flechon, A. (2011) "Chemotherapy in advanced bladder cancer : current status and future", pp. 1–11.

Ivanov, D. P., Parker, T. L., Walker, D. A., Alexander, C., Ashford, M. B., Gellert, P. R. and Garnett, M. C. (2014) "Multiplexing spheroid volume, resazurin and acid phosphatase viability assays for high-throughput screening of tumour spheroids and stem cell neurospheres", *PLoS ONE*, 9(8), pp. 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0103817.

Jiang, G., Liu, J., Ren, B., Zhang, L., Owusu, L., Liu, L., Zhang, J., Tang, Y. and Li, W. (2017) "Anti-tumor and chemosensitization effects of Cryptotanshinone extracted from *Salvia miltiorrhiza* Bge. on ovarian cancer cells in vitro", *Journal of Ethnopharmacology*, 205(March), pp. 33–40. doi:10.1016/j.jep.2017.04.026.

Jin, W., Han, H., Ma, L., Zhou, H. and Zhao, C. (2016) "The chemosensitization effect of quercetin on cisplatin induces the apoptosis of human colon cancer HT-29 cell line", *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 9(2), pp. 2285–2292.

Kanelli, M., Mandic, M., Kalakona, M., Vasilakos, S., Kekos, D., Nikodinovic-Runic, J. and Topakas, E. (2018) "Microbial production of violacein and process optimization for dyeing polyamide fabrics with acquired antimicrobial properties", *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL), pp. 1–13. doi:10.3389/fmicb.2018.01495.

Kinghorn, A. D., Carcache De Blanco, E. J., Lucas, D. M., Rakotondraibe, H. L., Orjala, J., Soejarto, D. D., Oberlies, N. H., Pearce, C. J., Wani, M. C., Stockwell, B. R., Burdette, J. E., Swanson, S. M., Fuchs, J. R., Phelps, M. A., Xu, L., Zhang, X. and Shen, Y. Y. (2016) "Discovery of anticancer agents of diverse natural origin", *Anticancer Research*, pp. 5623–5637. doi:10.21873/anticancer.11146.

Kodach, L. L., Bos, C. L., Durán, N., Peppelenbosch, M. P., Ferreira, C. V. and Hardwick, J. C. H. (2006) "Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells", *Carcinogenesis*. doi:10.1093/carcin/bgi307.

Leal, A. M. de S., de Queiroz, J. D. F., de Medeiros, S. R. B., Lima, T. K. de S. and Agnez-Lima, L. F. (2015) "Violacein induces cell death by triggering mitochondrial membrane hyperpolarization in vitro", *BMC microbiology*. doi:10.1186/s12866-015-0452-2.

Liu, J., Gu, J., Feng, Z., Yang, Y., Zhu, N., Lu, W. and Qi, F. (2016) "Both HDAC5 and HDAC6 are required for the proliferation and metastasis of melanoma cells", *Journal of Translational Medicine*. BioMed Central, pp. 1–13. doi:10.1186/s12967-015-0753-0.

Liu, Z., Wang, W., Zhu, Y., Gong, Q., Yu, W. and Lu, X. (2013) "Antibiotics at subinhibitory concentrations improve the quorum sensing behavior of *Chromobacterium violaceum*", *FEMS Microbiology Letters*, 341(1), pp. 37–44. doi:10.1111/1574-6968.12086.

Lopes, S. C. P., Blanco, Y. C., Justo, G. Z., Nogueira, P. A., Rodrigues, F. L. S., Goelnitz, U., Wunderlich, G., Facchini, G., Brocchi, M., Duran, N. and Costa, F. T. M. (2009) "Violacein extracted from *Chromobacterium violaceum* inhibits *Plasmodium* growth in vitro and in vivo",

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53(5), pp. 2149–2152. doi:10.1128/AAC.00693-08.

Lu, Y., Wang, L., Xue, Y., Zhang, C., Xing, X. H., Lou, K., Zhang, Z., Li, Y., Zhang, G., Bi, J. and Su, Z. (2009) "Production of violet pigment by a newly isolated psychrotrophic bacterium from a glacier in Xinjiang, China", *Biochemical Engineering Journal*, 43(2), pp. 135–141. doi:10.1016/j.bej.2008.09.009.

Marizcurrena, J. J., Cerdá, M. F., Alem, D. and Castro-Sowinski, S. (2019) "Living with Pigments: The Colour Palette of Antarctic Life", pp. 65–82. doi:10.1007/978-3-030-02786-5_4.

Marizcurrena, J. J., Morel, M. A., Braña, V., Morales, D., Martínez-López, W. and Castro-Sowinski, S. (2017) "Searching for novel photolyases in UVC-resistant Antarctic bacteria", *Extremophiles*. Springer Japan, 21(2), pp. 409–418. doi:10.1007/s00792-016-0914-y.

Mart'yanov, S. V., Letarov, A. V., Ivanov, P. A. and Plakunov, V. K. (2018) "Stimulation of Violacein Biosynthesis in *Chromobacterium violaceum* Biofilms in the Presence of Dimethyl Sulfoxide", *Microbiology*, 87(3), pp. 437–440. doi:10.1134/s0026261718030050.

Martínez, L., Ubillos, L., Eguiluz, E., Mancebo, M., Huelmo, S., Pérez, L., Despau, Á., Ximenez, S., Mareco, K., Notejane, Á., Guerreros, S., Musto, M. L. and Restrano, D. (2018) *Cáncer de Vejiga musculoinvasor no metastásico*.

Melo, P. S., Justo, G. Z., De Azevedo, M. B. M., Durán, N. and Haun, M. (2003) "Violacein and its β -cyclodextrin complexes induce apoptosis and differentiation in HL60 cells", *Toxicology*, 186(3), pp. 217–225. doi:10.1016/S0300-483X(02)00751-5.

Mendes, A. S., De Carvalho, J. E., Duarte, M. C. T., Durán, N. and Bruns, R. E. (2001) "Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production", *Biotechnology Letters*, 23(23), pp. 1963–1969. doi:10.1023/A:1013734315525.

Mojib, N., Farhoomand, A., Andersen, D. T. and Bej, A. K. (2013) "UV and cold tolerance of a pigment-producing Antarctic *Janthinobacterium* sp. Ant5-2", *Extremophiles*, 17(3), pp. 367–

378. doi:10.1007/s00792-013-0525-9.

Mojib, N., Nasti, T. H., Andersen, D. T., Attigada, V. R., Hoover, R. B., Yusuf, N. and Bej, A. K. (2011) "The antiproliferative function of violacein-like purple violet pigment (PVP) from an Antarctic *Janthinobacterium* sp. Ant5-2 in UV-induced 2237 fibrosarcoma", *International Journal of Dermatology*. doi:10.1111/j.1365-4632.2010.04825.x.

Mollaie, H., Hoshyar, R., Abedini, M. R. and Safaralizadeh, R. (2019) "Crocic acid enhances cisplatin-induced chemosensitivity in human cervical cancer cell line", *International Journal of Cancer Management*, 12(12). doi:10.5812/ijcm.94909.

Montforts, F., De, L., Meyer, D. and De, B. (2011) "(12) United States Patent", 1998(10), pp. 2–5.

Morgan-kiss, R. M., Priscu, J. C., Pockock, T., Gudynaite-savitch, L. and Huner, N. P. A. (2012) "Two-year subscription to " *Fitness* ": 20 issues", 70(1), p. 19038. doi:10.1128/MMBR.70.1.222.

Morita, R. Y. (1975) "Psychrophilic Bacteria", 39(2), pp. 144–167.

Mossanen, M. and Gore, J. L. (2014) "The burden of bladder cancer care : direct and indirect costs", pp. 487–491. doi:10.1097/MOU.0000000000000078.

Nicholson, W. L., Schuerger, A. C. and Setlow, P. (2005) "The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: Considerations for Earth-to-Mars transport by natural processes and human spaceflight", *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 571(1-2 SPEC. ISS.), pp. 249–264. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.10.012.

Nozar, M. F. and Briozzo, L. (2017) "Cáncer de cuello uterino en Uruguay. Controversias en la prevención", *Revista Médica del Uruguay*, 33(1), pp. 142–165.

Núñez-Montero, K. and Barrientos, L. (2018) "Advances in antarctic research for antimicrobial discovery: A comprehensive narrative review of bacteria from antarctic environments as

potential sources of novel antibiotic compounds against human pathogens and microorganisms of industrial importance", *Antibiotics*, 7(4). doi:10.3390/antibiotics7040090.

Olive, P. L. and Banáth, J. P. (2006) "The comet assay: A method to measure DNA damage in individual cells", *Nature Protocols*, 1(1), pp. 23–29. doi:10.1038/nprot.2006.5.

Otero, G. (2019) *Modulación Farmacológica de astrocitos con fenotipo aberrante*. PEDECIBA BIOLOGÍA Sub-área Biología Celular y Molecular.

Pantarella, F., Berlutti, F., Passariello, C., Sarli, S., Morea, C. and Schippa, S. (2007) "Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*", *Journal of Applied Microbiology*, 102(4), pp. 992–999. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03155.x.

Pérez, F., Varela, M., Canclini, L., Acosta, S., Martínez-López, W., López, G. V. and Hernández, P. (2019) "Furoxans and tocopherol analogs-furoxan hybrids as anticancer agents", *Anti-Cancer Drugs*, 30(4), pp. 330–338. doi:10.1097/CAD.0000000000000721.

Platt, D., Amara, S., Mehta, T., Vercussee, K., Myles, E. L., Johnson, T. and Tiriveedhi, V. (2014) "Violacein inhibits matrix metalloproteinase mediated CXCR4 expression: Potential anti-tumor effect in cancer invasion and metastasis", *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.124.

Powell, S. N., DeFrank, J. S., Connell, P., Eogan, M., Preffer, F., Dombkowski, D., Tang, W. and Friend, S. (1995) "Differential Sensitivity of p53(-) and p53(+) Cells to Caffeine-induced Radiosensitization and Override of G2 Delay", *Cancer Research*, 55(8), pp. 1643–1648. doi:10.1016/0360-3016(95)97825-1.

Queiroz, K. C. S., Milani, R., Ruela-de-Sousa, R. R., Fuhler, G. M., Justo, G. Z., Zambuzzi, W. F., Duran, N., Diks, S. H., Spek, C. A., Ferreira, C. V. and Peppelenbosch, M. P. (2012) "Violacein Induces Death of Resistant Leukaemia Cells via Kinome Reprogramming, Endoplasmic Reticulum Stress and Golgi Apparatus Collapse", *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0045362.

Ravi, M., Tentu, S., Baskar, G., Rohan Prasad, S., Raghavan, S., Jayaprakash, P., Jeyakanthan, J., Rayala, S. K. and Venkatraman, G. (2015) "Molecular mechanism of anti-cancer activity of phycoerythrin in triple-negative breast cancer cells", *BMC Cancer*. *BMC Cancer*, 15(1), pp. 1–13. doi:10.1186/s12885-015-1784-x.

Rettori, D. and Durán, N. (1998) "Production, extraction and purification of violacein: An antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(5), pp. 685–688. doi:10.1023/A:1008809504504.

Rupa, S., Immanuel, C., Banerjee, D. and Rajankar, M. P. (2018) "BioSystems Integrated constraints based analysis of an engineered violacein pathway in *Escherichia coli*", *BioSystems*. Elsevier, 171(June), pp. 10–19. doi:10.1016/j.biosystems.2018.06.002.

Ryu, H., Jin, H., Ho, J. N., Bae, J., Lee, E., Lee, S. E. and Lee, S. (2019) "Suberoylanilide hydroxamic acid can re-sensitize a cisplatin-resistant human bladder cancer", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 42(1), pp. 66–72. doi:10.1248/bpb.b18-00545.

Sanli, O., Dobruch, J., Knowles, M. A., Burger, M., Alemozaffar, M., Nielsen, M. E. and Lotan, Y. (2017) "Bladder cancer", *Nature Reviews Disease Primers*. Macmillan Publishers Limited, 3, pp. 1–19. doi:10.1038/nrdp.2017.22.

Sasidharan, A., Sasidharan, N. K., Amma, D. B. N. S., Vasu, R. K., Nataraja, A. V. and Bhaskaran, K. (2015) "Antifungal activity of violacein purified from a novel strain of *Chromobacterium* sp. NIIST (MTCC 5522)", *Journal of Microbiology*, 53(10), pp. 694–701. doi:10.1007/s12275-015-5173-6.

Savage, P. (2015) "Clinical observations on chemotherapy curable malignancies: Unique genetic events, frozen development and enduring apoptotic potential", *BMC Cancer*, 15(1), pp. 1–25. doi:10.1186/s12885-015-1006-6.

Shah, J. B., McConkey, D. J. and Dinney, C. P. N. (2011) "New strategies in muscle-invasive bladder cancer: On the road to personalized medicine", *Clinical Cancer Research*, 17(9), pp.

2608–2612. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2770.

Shen, Z., Shen, T., Wientjes, M. G., O'Donnell, M. A. and Au, J. L. S. (2008) "Intravesical treatments of bladder cancer: Review", *Pharmaceutical Research*, 25(7), pp. 1500–1510. doi:10.1007/s11095-008-9566-7.

Shivaji, S., Ray, M. K., Kumar, G. S., Reddy, G. S. N., Saisree, L. and Wynn-Williams, D. D. (1991) "Identification of *Janthinobacterium lividum* from the soils of the islands of Scotia Ridge and from Antarctic peninsula", *Polar Biology*, 11(4), pp. 267–271. doi:10.1007/BF00238461.

Siegel, R. L., Miller, K. D. and Jemal, A. (2019) "Cancer statistics, 2019", *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), pp. 7–34. doi:10.3322/caac.21551.

Sun, C. Y., Zhang, Q. Y., Zheng, G. J. and Feng, B. (2019) "Phytochemicals: Current strategy to sensitize cancer cells to cisplatin", *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier, 110(August 2018), pp. 518–527. doi:10.1016/j.biopha.2018.12.010.

Van Tonder, A., Joubert, A. M. and Cromarty, A. D. (2015) "Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays", *BMC Research Notes*, 8(1), pp. 1–10. doi:10.1186/s13104-015-1000-8.

Wang, H., Jiang, P., Lu, Y., Ruan, Z., Jiang, R., Xing, X. H., Lou, K. and Wei, D. (2009) "Optimization of culture conditions for violacein production by a new strain of *Duganella* sp. B2", *Biochemical Engineering Journal*, 44(2–3), pp. 119–124. doi:10.1016/j.bej.2008.11.008.

Wang, Z., Li, B., Zhou, L., Yu, S., Su, Z., Song, J., Sun, Q., Sha, O., Wang, X., Jiang, W., Willert, K., Wei, L., Carson, D. A. and Lu, D. (2016) "Prodigiosin inhibits Wnt/ β -catenin signaling and exerts anticancer activity in breast cancer cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(46), pp. 13150–13155. doi:10.1073/pnas.1616336113.

WHO IARC (2014) "World Cancer Report 2014: Press Release N° 224", (February), pp. 1–2.

- Yallapu, M. M., Maher, D. M., Sundram, V., Bell, M. C., Jaggi, M. and Chauhan, S. C. (2010) "Curcumin induces chemo / radio-sensitization in ovarian cancer cells and curcumin nanoparticles inhibit ovarian cancer cell growth", pp. 1–12.
- Zhao, J., Wu, Y., Alfred, A. T., Wei, P. and Yang, S. (2014) "Anticancer effects of pyocyanin on HepG2 human hepatoma cells", pp. 541–548. doi:10.1111/lam.12224.
- Zhu, H., Luo, H., Zhang, W., Shen, Z., Hu, X. and Zhu, X. (2016) "Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer", *Drug Design, Development and Therapy*, 10, pp. 1885–1895. doi:10.2147/DDDT.S106412.
- Zhu, H., Sandiford, S. K. and Van Wezel, G. P. (2014) "Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(2), pp. 371–386. doi:10.1007/s10295-013-1309-z.
- Zuo, Q., Wu, W., Li, X. U., Zhao, L. E. and Chen, W. E. I. (2012) "HDAC6 and SIRT2 promote bladder cancer cell migration and invasion by targeting cortactin", pp. 819–824. doi:10.3892/or.2011.1553.

Análisis de Ciclo Celular

El estudio se realizó en un citómetro de flujo y clasificador celular *Mo Flo Astrios EQ* (Beckman Coulter) del Servicio de Citometría de Flujo del IIBCE. Inicialmente se intentó utilizar el software Kaluza (Beckman Coulter), pero debido a que los perfiles de ciclo celular se encontraban muy alterados con los diferentes tratamientos, el análisis se realizó de la siguiente manera:

- 1) Se capturaron más de 10000 eventos en la región donde se encontraban nuestras células (R1).
- 2) Se excluyeron los dobletes en el gráfico 620/29 Width vs 620/29 Area para cada muestra de células teñidas con yoduro de propidio, identificando una región A como se observa en la figura a continuación para la muestra 1 (control negativo) y la muestra 3 (tratamiento con 300 nM de violaceína) (Figura 1).

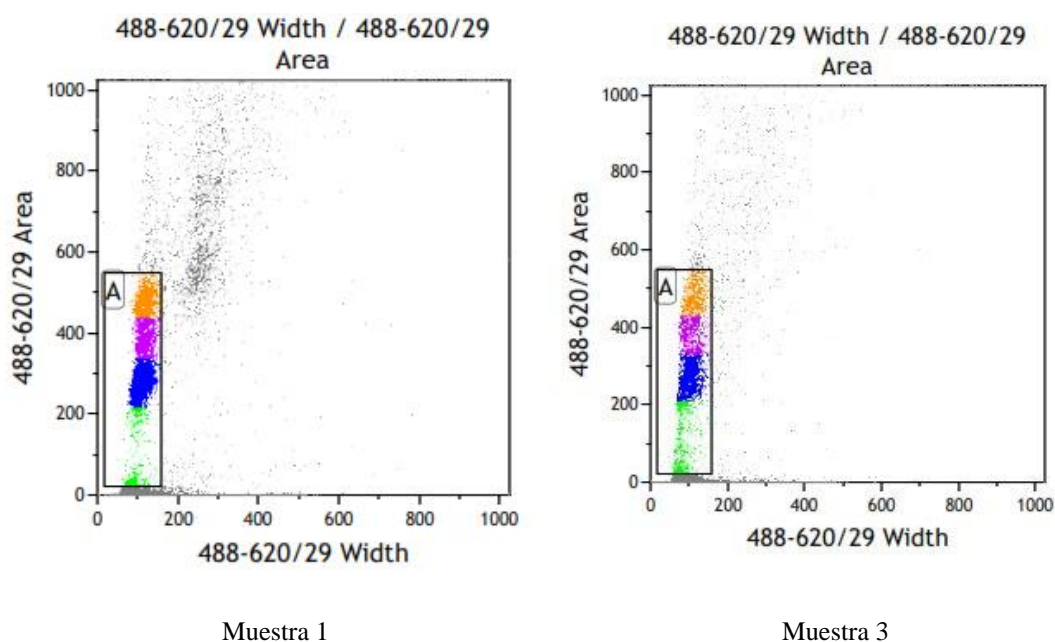
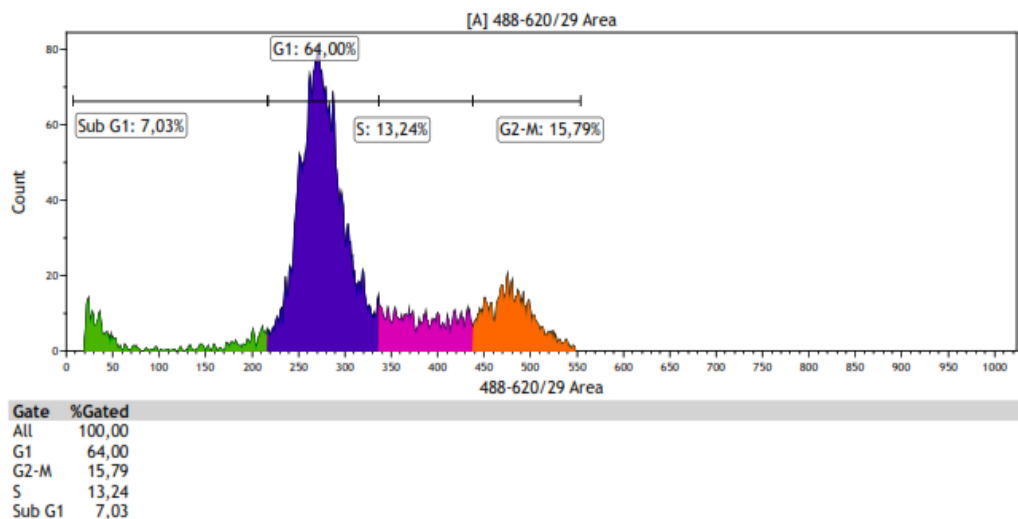
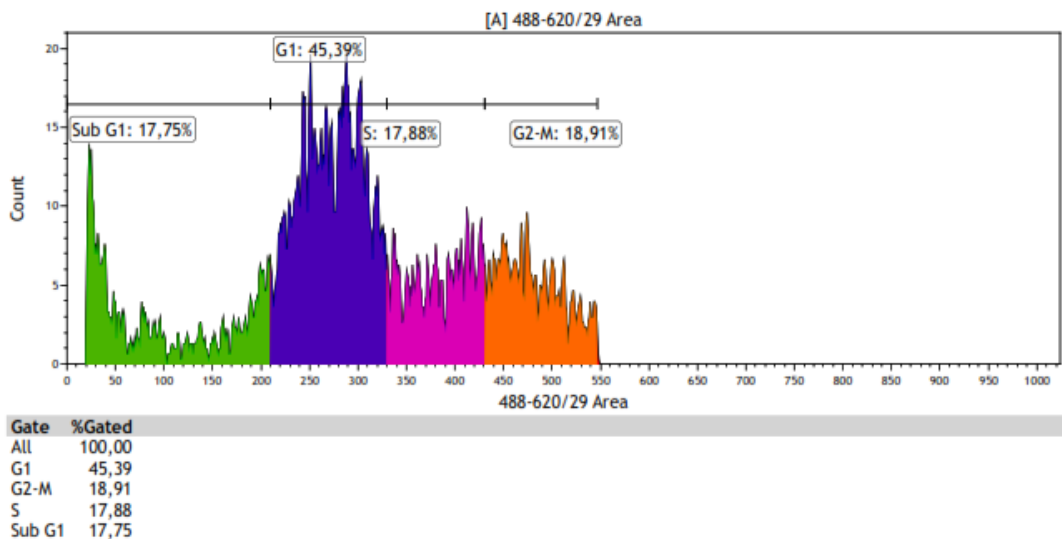


Figura 1. Exclusión de dobletes en el gráfico 620/29 Width vs 620/29 Area.

3) Luego se analizó esa región A en el histograma para yoduro de propidio en 620/29 Area y se colocaron los marcadores Sub-G1, G1, S y G2/M tratando de mantener la referencia del control (Figura 2).



Muestra 1



Muestra 3

Figura 2 Histograma para yoduro de propidio en 620/29 Area

Análisis de apoptosis empleando un kit de Anexina V

El estudio de inducción de apoptosis se realizó en un citómetro de flujo y clasificador celular *Mo Flo Astrios EQ* (Beckman Coulter) del Servicio de Citometría de Flujo del IIBCE.

- 1- Se capturaron más de 10000 eventos para cada región donde se encontraban nuestras células (R1).
- 2- Inicialmente, las poblaciones fueron determinadas empleando el gráfico FSC vs SSC (Figura 3 a). Posteriormente, se realizó un gráfico FSC1-Area vs FSC|Width para excluir dobletes (Figura 3 b). En los gráficos a continuación se presenta el análisis realizado con la muestra 1 (control negativo) y la muestra 3 (tratamiento con 300 nM de violaceína). A la derecha de la región 1 se encuentran los dobletes.

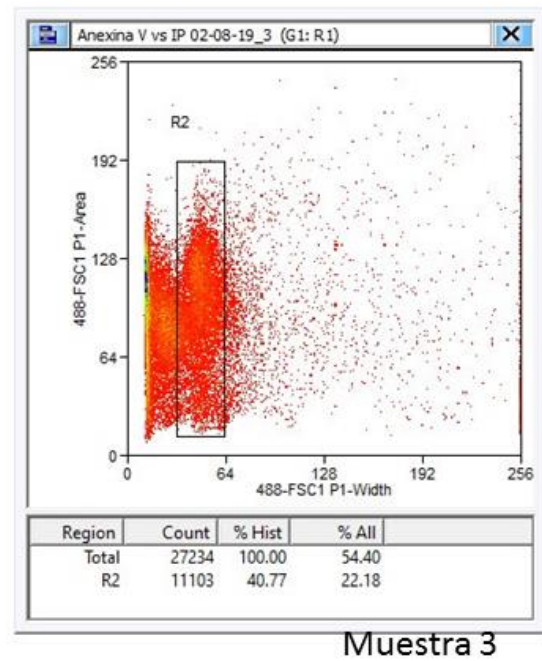
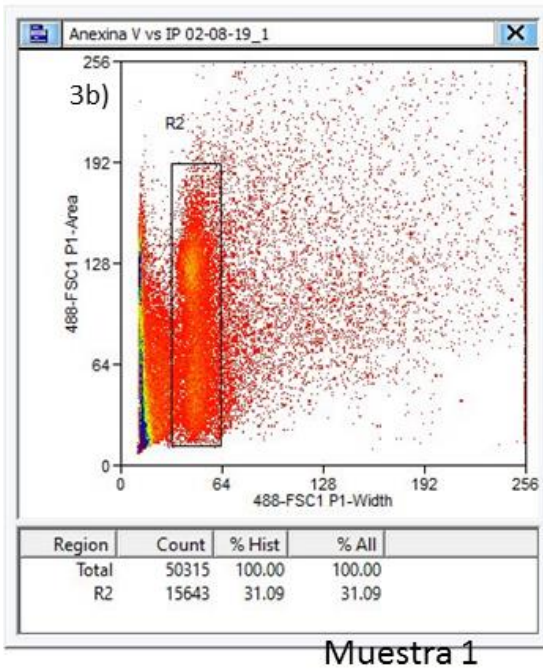
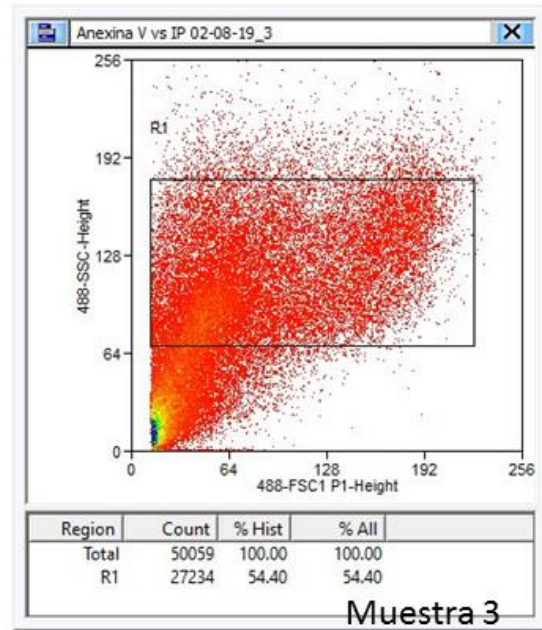
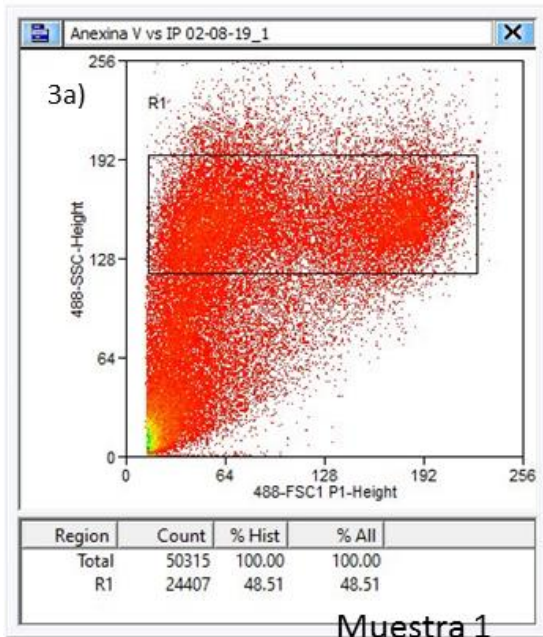
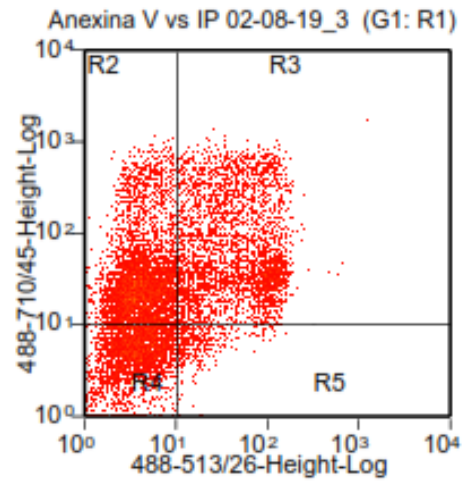
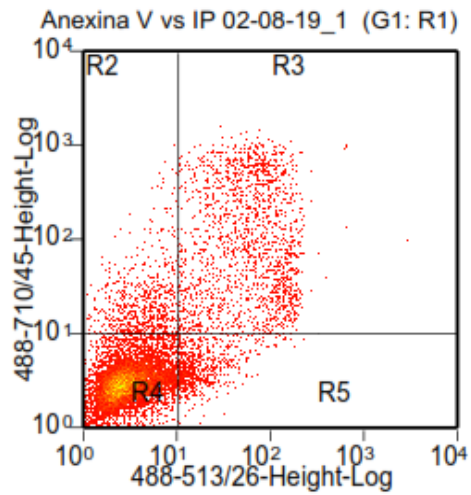


Figura 3 a) Identificación de las poblaciones celulares empleando el grafico de FSC vs SSC -1 y b) exclusión de acúmulos celulares empleando el grafico FSC-Area vs FCS-Width, para la muestra de T24 tratada con DMSO 1 y violaceína 300 nM 3.

3- Luego se realizó un análisis por cuadrante para analizar los porcentajes relativos de la comparación de ambos parámetros. Los datos citométricos se adquirieron y analizaron con el programa Summit (versión 6.3.1 de Beckman Coulter). La señal de FITC se detectó con el filtro 513/26 y la señal del IP con el filtro 710/45. Ambos detectores operaron en escala logarítmica (4 décadas). Gráficos IP vs FITC para las muestras 1 y 3 se presentan a continuación con sus respectivos recuentos para cada cuadrante: 4= doble negativo, células viables; 2= positivo para IP, células necróticas; 5= positivo para FITC, células apoptóticas tempranas y 3= doble positivo (IP+FITC), células apoptóticas tardías (Figura 4). Se obviaron los controles teñidas solo con IP o con FITC o no teñidas, debido a la separación de los filtros empleados en los detectores 513/26 y 710/45 por lo que las fluorescencias de los fluoróforos no se superponen como se observa en el “Fluorescence SpectraViewer” de ThermoFisher Scientific de la Figura 5. Sin embargo, teniendo en cuenta el fenómeno de autofluorescencia hubiera sido deseable realizar el análisis inicialmente con muestras controles teñidos solo con IP o con FITC o no teñidos, de modo de poder obtener una adecuada compensación para cada uno de ellos.



Region	Count	% Hist	% All
Total	13479	100.00	26.79
R2	638	4.73	1.27
R3	1624	12.05	3.23
R4	10512	77.99	20.89
R5	705	5.23	1.40

Region	Count	% Hist	% All
Total	11850	100.00	23.67
R2	4632	39.09	9.25
R3	3334	28.14	6.66
R4	3475	29.32	6.94
R5	409	3.45	0.82

Muestra 1

Muestra 3

Figura 4. Análisis de poblaciones marcadas con anexina y yoduro de propidio para la muestra 1 (DMSO) y 3 (violaceína 300 nM).

Fluorescence SpectraViewer



Figura 5. “Fluorescence SpectraViewer” de ThermoFisher Scientific.

Cálculo de costo de producción de violaceína, a partir de un aislamiento antártico UV13 al 16/05/2020.

Es necesario recordar que en esta tesis se trabajó en un primer abordaje del proceso de optimización de los procesos de producción y purificación de violaceína a partir de la cepa UV13 con fines de obtener la cantidad suficiente de violaceína para su estudio en líneas celulares derivadas de cánceres humanos, por lo que ambos procesos pueden ser aún más optimizados. Además es necesario destacar que otros estudios económicos son necesarios, como por ejemplo cual sería el objetivo mínimo que el mercado puede precisar o absorber. Igualmente a modo de ejemplificar se calculará el costo aproximado de producción de un miligramo de violaceína con el proceso actual asumiendo que se realizará una producción en fermentador semanal.

Podemos definir que el costo de producción de un bioproducto se divide en dos partes: la parte aguas arriba contiene sustratos, incluidos los pretratamientos de sustrato, la energía del proceso, incluida la esterilización, agitación, aireación, enfriamiento y calentamiento. Por otro lado, la parte aguas abajo requiere equipo y energía para separar las bacterias de su medio de crecimiento, extraer y purificar productos intracelulares o extracelulares. Cualquier intento de reducir el consumo de energía es beneficioso para la reducción de los costos de producción (Chen & Jiang, 2018).

Se estudió una aproximación económica del costo de producir un mg de violaceína de UV13 en Uruguay. Para hacer este análisis se realizaron los siguientes supuestos: (1) Se alquilará un local de 450 m², que se readecuara. La planta tendrá una vida operativa de 10 años, todos los procesos se basarán en operaciones por lotes y la planta funcionará durante 8 h/día, cinco días a la semana o 260 días/año. (2) Se realizará una fermentación semanal de 1,5 L como se describió en la tesis y se utilizarían las 52 semanas del año, utilizando el rendimiento de 141,5 mg de

violaceína pura por fermentador, obtendríamos 7,3 g de violaceína pura por año (73 g en el ciclo operativo). (3) Se compraran los equipamientos necesarios: autoclave, cabina de flujo horizontal, balanza de laboratorio, incubadora orbital refrigerada, espectrofotómetro, fermentador, rotavapor. La pureza del producto será validada en un laboratorio externo por HPLC. (4) Los reactivos se calcularon de acuerdo al protocolo inicial, se comprarían en exceso (al menos 1,5 veces) ante cualquier imprevisto. (5) Se contratarán dos operarios calificados que trabajaran en la producción y purificación de la bacteria UV13 y un administrativo (3 sueldos equivalente grado 2 UdelaR 40 h). (6) por conceptos de servicios (electricidad, agua, internet y otros) se calculará un ficto de US\$ 5000 mensual, US\$ 60000 anual, US\$ 600000. (7) Se destinara un 20% del proyecto para imprevistos y mantenimiento. (8) El dólar de los Estados Unidos (US\$) se tomó a cuarenta y cinco pesos uruguayos (\$). Los valores de los inmuebles, equipamientos, reactivos y productos son correspondientes al día 15/08/2022.

Se ponen ejemplos obtenidos en internet a modo ilustrativo, se trató de colocar equipamiento similar al usado en la tesis. Los casos que no se encontraron datos se asignaron costos mayores. Se priorizó sitios que mostrarán el precio en línea.

Los precios se calcularon obviando las cargas impositivas tanto para los costos de producción de violaceína partiendo de UV13, como el costo de adquirirla en la empresa Sigma.

Costo edilicio

Se alquilaría un local de 450 m²

Local 450 m2 https://inmueble.mercadolibre.com.uy/MLU-472041005-excelente-local-450-m2-deposito-comercio-etc- JM#position=24&type=item&tracking_id=d472a678-c8df-4bae-bfdd-932b34d75471. Precio \$ 45000 mes. US\$ 1000. 12 meses US\$ =12000. 10 años US\$ 120000.

Además se proyecta una partida de US\$ 100000 para adecuaciones edilicias (Áreas de laboratorio, oficinas, deposito, baños).

Servicios (electricidad, agua, internet, etc)

Se asumirá un ficto de US\$ 2000 mensuales (\$90000).

Equipamientos

Asumiendo que se comprarían equipos similares a los usados en este trabajo.

El costo de un autoclave similar al usado en este trabajo en la web https://www.alibaba.com/product-detail/ZT-AS-V2-Series-35L-to_62451348798.html?spm=a2700.7735675.normalList.2.72967c427TiHom&bypass=true es de US\$ 2000.

El costo de un cabina de flujo laminar similar al usado en este trabajo en la web

https://www.amazon.com/HEMCO-93028-Phenolic-Surface-Universal/dp/B079ZKB1R9/ref=pd_sbs_328_2/144-3625736-3025768?encoding=UTF8&pd_rd_i=B079ZKB1R9&pd_rd_r=83c4a975-53ef-4134-87cc-915bad6b5fd1&pd_rd_w=7cCQQ&pd_rd_wg=wjYCE&pf_rd_p=12b8d3e2-e203-4b23-a8bc-68a7d2806477&pf_rd_r=AAHRF1PXRE4F0MNXX49B&psc=1&refRID=AAHRF1PXRE4F0MNXX49B. US\$ = 500

El costo de la incubadora con agitación (shaker) para matraces, rango de temperatura de 0 a 70 °C. <https://www.alphaomega-electronics.com/en/incubadoras/1444-lom-150-series-incubadora-agitadora-de-laboratorio-refrigerada-0c70c.html>. Al no encontrarse en internet el costo de este equipo se estimará en US\$ 10000

El costo de un fermentador similar al usado en este trabajo en la web (<https://www.biotechequipmentsales.com/component/virtuemart/fermentor/sartorius-biostat-a-plus-bioreactor-system-detail>) es de US\$ 11.000.

El costo de una centrifuga similar a la utilizada (rotor incluido).
https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/ep022628188?lang=en®ion=UY&cm_sp=Insite-_-caContent_prodMerch_coocuranceModel-_-prodMerch10-1 US\$ 16.100

El costo de un rotavapor similar al usado en este trabajo en la web
<https://us.vwr.com/store/product/18697399/rotavapor-r-300-rotary-evaporator-standalone-buchi>
es de US\$ 8.000.

El espectrofotómetro se estimó en US\$ 5000, la balanza de laboratorio en US\$ 1000

El costo de los reactivos se calculó por año (52 semanas), luego se multiplicó por 10 años.

Reactivos para la producción

Medio de cultivo TSB Sigma- Aldrich. Se trabajó con 3 g/L, 2 L por corrida (asumiendo precultivo etc). Total 52 semanas = 312 g.

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/22092?lang=en®ion=UY>

Medio de cultivo TSB Sigma- Aldrich (500g) =US\$ 50

D+ glucosa Merck. Se trabajó a 3,6 g/L, 2 L por corrida (asumiendo precultivo etc). Total 52 semanas = 374 g.

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g7021?lang=en®ion=UY>.

D+ glucosa Merck 1kg = US\$ 65

Reactivos para la purificación

n-Butanol 200 mL cada 1,5 L. 52 fermentadores = 10.4 L.

https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/b7906?lang=en®ion=UY&gclid=Cj0KCQjwnv71BRCOARIsAikxW9GHZSRuTSZ7yanWh4a_NcxRxNQgB0R85fAmpIsPNV2XY5MDxy_sKAaAtAuEALw_wcB. Precio 500 mL US\$ 56,26. 20 L US\$ = 2250,4

n hexano 100 mL cada 1,5 L. % 52 fermentadores = 5,2 L

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/296090?lang=en®ion=UY>

Precio 6 L US\$ 540 x2 = US\$ 1080

Diclorometano 100 mL cada 1,5 L. % 52 fermentadores = 5,2 L

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/296090?lang=en®ion=UY>

Precio 8 L US\$ 354 x2 = US\$ 708

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/270997?lang=en®ion=UY>

El análisis de calidad de cada lote se realizará por servicio en laboratorio privado por estudio de HPLC. Aproximadamente US\$ 100 cada análisis. 52 análisis US\$ 5200

Capital humano

Se contrataría: 3 contratos equivalente a grado 2 UdelaR 40 h. \$ 61000. US\$ 1356. 12 meses US\$ 16272. 3 contratos US\$ 48816.

Perfil 1: Biólogo o Bioquímico o Ingeniero Químico. Operario de parte producción y mantenimiento del laboratorio.

Perfil 2: Químico farmacéutico. Encargado de la purificación y control de calidad.

Administrativo.

Imprevistos y mantenimiento

Se reservará un 20% de la inversión anual para imprevistos y mantenimiento

Basados en estos supuestos se calculó el precio de un mg de violaceína (Tabla 1), obteniéndose un presupuesto total anual de US\$ 299.122, y un presupuesto a 10 años de US\$ 1.370.142.

Tabla 1. Cálculo del costo de total de producción de violaceína según la planta esté operativa uno o diez años. US\$ 1= \$45

	Cálculo para un año		Cálculo para 10 años	
	US\$	\$	US\$	\$
Equipamiento				
Autoclave	2000	90000	2000	90000
Fermentador	11000	495000	11000	495000
Rotavapor	8000	360000	8000	360000
Centrifuga	12600	567000	12600	567000
Camara de cultivo	500	22500	500	22500
Incubadora 0 a 70 °C	10000	450000	10000	450000
Espectrofluorimetro	5000	225000	5000	225000
Balanza laboratorio	1000	45000	1000	45000
Reactivos				
Material de laboratorio	5000	225000	50000	2250000
Medio de cultivo	49,13	2210,85	491,3	22108,5
Glucosa	65	2925	650	29250
n-butanol	2250,4	101268	22504	1012680
Hexano	1080	48600	10800	486000
Diclorometano	708	31860	7080	318600
Analisis HPLC	5200	234000	52000	2340000
Edilicia				
Alquiler local	12000	540000	120000	5400000
Adecuación edilicia	100000	4500000	100000	4500000
Luz y agua	24000	1080000	240000	10800000
Capital humano				
3 contratos grado 2 UdelaR	48816	2196720	488160	21967200
Subtotal	249268,53	11217083,9	1141785,3	51380338,5
Imprevistos 20%	49853,71	2243416,77	228357,06	10276067,7
Total	299122	13460501	1370142	61656406

Al calcular la cantidad de violaceína producida según el esperado calculado con la optimización actual (141,5 mg/ fermentador). En la Tabla 2 observamos los valores que anualmente se recuperarían 7,4 gramos de violaceína alta pureza y 74 g en 10 años.

Tabla 2. Valores de producción de violaceína esperados según los parámetros actuales

Violaceína obtenida	mg
1 corrida	141,5
52 fermentadores (un año)	7358
	g
En g un año	7,4
En g 10 años	74

Finalmente en la Tabla 3 se calcula el precio de un mg de violaceína según se produzca por un año o diez. Es razonable pensar que una producción de este tipo sea pensada en un tiempo de diez años. Además se observa el costo de un mg de violaceína producida por la empresa Sigma.

Tabla 3. Precio del miligramo de violaceína estimada de este estudio en US\$ y \$, precio de violaceína al precio de venta de Sigma.

	US\$	\$
Precio por mg un año	40,65	1829,37
Precio por mg 10 años	18,62	837,95
Precio Sigma	415,72	18707,4

Al hacer la comparativa resulta que el costo estimado de la violaceína en el presente trabajo (Tabla 4), se observa que la violaceína de UV13 con estos parámetros de optimización resultaría 10,42 veces menor al de la violaceína comercial vendida por la empresa si se produce durante un año, y sería 22,76 veces menor si se produce por 10 años.

Tabla 4. Relación de costo entre violaceína UV13 y precio ofrecido por Sigma

	violaceína Sigma/violaceína UV13 calculada	
Tiempo de producción	1 año	10 años
Coefficiente	10,23	22,33

Es de destacar que el costo podría ser probablemente aún menor si el proyecto se instalase en un Polo Tecnológico donde se alquilan laboratorios o áreas de trabajo. A modo de ejemplo

Parque Científico Tecnológico de Pando alquila laboratorios para la instalación de empresas con base tecnológica e instituciones de I+D. <http://www.pctp.org.uy/es/proyecto-urbanistico>. No existen datos en la página web del alquiler pero estimamos que será menor al costo de alquiler de un local y refacciones. El costo de los reactivos y productos se estimaron según la oferta del proveedor, este sería otro punto a optimizar de acuerdo a las posibilidades logísticas.