

Actividad antitumoral en tumores experimentales; purificación y caracterización parcial de biopolímeros extraídos de fermentados de bacterias marinas

Rita M Pérez G, Ana Digna Avila C,* Mario Cruz,* María E Miravet,** Carlos F Calderón,* Martha Montalvo,* José L Bello*

RESUMEN

Se reporta la separación, caracterización química parcial y actividad antitumoral de dos biopolímeros producidos por cepas de bacterias marinas en un medio a base de glucosa y agua de mar estéril. Los productos 21NM142a y 21NM156 se separaron del sobrenadante del cultivo de las bacterias *Micrococcus sp.* y *Pseudomonas sp.* Estos compuestos están constituidos por proteínas y carbohidratos, según fue determinado utilizando los métodos de Loubry (método de Dubois), así como análisis de aminoácidos y cromatografía gas líquido. Los compuestos fueron homogéneos por cromatografía de filtración con gel, resultando 20 kDa como peso molecular aparente. La caracterización parcial hace pensar en la naturaleza glicoproteica de estos compuestos. El biopolímero 21NM142a aumenta el tiempo de supervivencia en ratones inoculados con células tumorales de Sarcoma 180 y Sarcoma 37.

Palabras clave: Biopolímeros, bacterias marinas, actividad antitumoral, carbohidratos, *Micrococcus sp.* y *Pseudomonas sp.*

ABSTRACT

This paper reports the production of biopolymers with antitumor activity from marine bacteria strains. The 21NM142a and 21NM156 products were isolated from culture supernatant by precipitation with ammonium sulfate or ethanol. Preliminary analyses shown that proteins and carbohydrates were present in these compounds. Our results, using gas-liquid chromatography and aminoacids analyses, confirmed it. The homogeneity was determined by gel filtration chromatography. The chromatogram shown a single peak in optical density at 280 nm, coincident with the peak of carbohydrates content determined by phenol-sulfuric method at 490 nm. Both compounds shown identical believe. Partial characterization indicated that these biopolymers could be glycoproteins. Molecular size by SDS-Poliacrylamide-gel electrophoresis was estimated, about 20 KDa was obtained for both. The biopolymer 21NM142a increases the survival time of mice tumor-bearing (Sarcoma-180, Sarcoma-37).

Key words: Biopolymers, marine bacteria, antitumor activity, carbohydrates, *Micrococcus sp.* y *Pseudomonas sp.*

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos marinos constituyen una fuente para la producción de sustancias biológicamente activas aún poco explotada, ya que las condiciones del mundo marino resultan totalmente diferentes del medio terrestre, de ahí el enorme interés que en las últimas cinco décadas muestran muchos investigadores tanto en los macroorganismos como en los microorganismos que habitan en el fondo marino.

Se han aislado diversos compuestos con actividad neurotóxica, anticoagulante, cardiotónica, etcétera, de organismos marinos tales como esponjas, tunicados,

celenterados y otros;^{1,2} sin embargo, la producción de metabolitos por estos organismos no siempre es repetible, además de la dificultad que representan las sucesivas colectas para la continuación de estos estudios.

En contraste con esto, se abren paso los microorganismos del mar que tienen la ventaja de que pueden ser cultivados sucesivamente y la producción de compuestos activos pueden ser repetibles a escala industrial o de laboratorio.

En la actualidad resulta de gran interés evaluar las posibilidades de los microorganismos marinos aislados en las aguas del litoral cubano como fuente, tanto de agentes antitumorales como de inhibidores de enzimas asociadas a los procesos que conllevan al desarrollo de los tumores.

De los microorganismos marinos se han aislado compuestos antibacterianos y antibióticos,^{3,4} con actividad inmunoestimulante y antitumoral,^{5,6} protec-

* Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, 29 y E, Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba.

** Instituto de Oceanología, calle 216 s/n, Reparto Flores, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

toras de los linfocitos T contra la replicación del virus HIV responsable del síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA)⁷ y contra el herpes virus.⁸

En este trabajo se valora la posibilidad de aislar productos con actividad antitumoral o inmunomoduladora a partir de la evaluación de dos extractos obtenidos por fermentación de dos bacterias de origen marino.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismos y condiciones de cultivo:

Las bacterias marinas (*Micrococcus sp.*) y (*Pseudomonas sp.*) pertenecen al cepario del Instituto de Oceanología de la Academia de Ciencias de Cuba.

La preparación de los caldos de cultivo de las bacterias se llevó a cabo en condiciones estériles, distribuyendo las células correspondientes de cada una de las bacterias en 250 mL de un medio de cultivo con agua de mar estéril que contenía D-glucosa como fuente de carbono, incubándose durante 24 horas a temperatura ambiente con agitación. Finalmente, las células resultantes se inocularon en cuatro litros del medio de cultivo definido para cada bacteria y se agitó constantemente durante 72 horas a temperatura ambiente.

Una vez concluida la fermentación, el caldo de cultivo (cuatro litros) se centrifugó durante 30 minutos a una velocidad de 400 g, removiéndose así las células y sólidos remanentes. El sobrenadante se filtró a través de un filtro bacteriológico de 0.2 mm para eliminar posibles restos de células.

El filtrado se concentró en un evaporador rotatorio, manteniendo la temperatura de evaporación por debajo de 40° C.

Extracción de los productos de la fermentación:

- *Precipitación con sulfato de amonio:* El filtrado concentrado (30 mL) de las bacterias *Micrococcus sp.* se precipitó con una solución saturada de $(\text{NH}_4)_2$ hasta una concentración final de 70%. Se dejó en reposo durante 24 horas 4° C y, después de este tiempo, se centrifugó a 400 g durante 30 minutos a 4° C, obteniéndose un precipitado de color blanco amarillento que se redissolvió en el mínimo volumen de agua destilada, se dializó frente a agua destilada y se liofilizó. A este producto se le denominó 21NM142a.
- *Precipitación con etanol:* El filtrado concentrado (500 mL) de las bacterias *Pseudomonas sp.* se precipitó con etanol frío al 70% (3:1 v/v) y se dejó reposar durante 16 horas a 4° C. Se centri-

fugó a 400 g durante 30 minutos a 4° C, obteniéndose un precipitado de color beige que se redissolvió en el mínimo volumen de agua destilada, se dializó frente a agua destilada y se liofilizó. A este producto se le denominó 21NM156. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry,⁹ utilizando albúmina de suero bovino como estándar primario.

Las determinaciones del contenido de carbohidratos totales se realizaron por el método de fenol-sulfúrico,¹⁰ utilizando D-galactosa como estándar primario.

Las determinaciones del contenido de ácidos urónicos se realizaron según el método del Carbazol.¹¹

- *Cromatografía líquida de alta presión (HPLC):* Para la determinación de la pureza y homogeneidad molecular de los extractos obtenidos se utilizó una columna con una matriz de filtración en gel TSK 3000 de un volumen total de 13 mL (7.5 mm x 30 cm). El buffer utilizado fue PBS (buffer fosfato salino) a una presión de 0.8 Bar. También se utilizó una cromatografía de filtración en gel en FPLC para la determinación de la pureza y homogeneidad molecular de los extractos obtenidos. Esta determinación se realizó en matrices de Superosa 12 (Pharmacia, Suecia) de un volumen total de 25 mL. El buffer utilizado fue PBS (buffer fosfato salino). El perfil de carbohidratos se obtuvo por la evaluación de cada una de las fracciones colectadas por el método de fenol-sulfúrico.¹⁰ También se midió la densidad óptica a 280 nm a cada una de las fracciones.

- *Electroforesis en gel de acrilamida:* Se realizó en un gradiente de poliacrilamida de 8-25% con SDS con azul de Comassie en un equipo Phast System (Pharmacia, Suecia).¹² Las muestras (20 mg de proteína) se mezclaron con igual volumen del buffer de muestra [Tris-HCl 120 mM (pH = 6.8), SDS 4.8% (w/v), glicerol 20% (v/v)] y se calentaron en baño de agua a 100° C por 3 minutos. Se utilizó un kit de marcadores de bajos pesos moleculares comercial que contenía fosforilasa a (94 kDa); albúmina de suero bovino (PM = 67 kDa), ovoalbúmina (PM = 43 kDa), anhidrasa carbónica (PM = 30 kDa). Inhibidor de tripsina de frijol de soya (PM = 20 kDa) y α -lactoalbúmina (PM = 14 kDa).

- *Determinación de la composición de aminoácidos:* Se realizó una hidrólisis de 24 horas a 110° C

en HCl 6N que contenía 0.1% de fenol y 0.1% de b-mercaptopetanol a 1 mg de cada una de las muestras y se utilizó un analizador de aminoácidos automático LKB ALPHA PLUS de separación con resinas de intercambio catiónico. La detección se realizó pos columna con ortoftalaldehído.

- *Hidrólisis ácida:* Para el análisis del contenido de azúcares 20 mg de cada una de las muestras fueron hidrolizadas con ácido sulfúrico 1N a 100° C por 18 horas para su posterior análisis en cromatografía de papel.
- *Cromatografía de papel:* Se realizó la cromatografía de papel descendente de los hidrolizados en papel Whatman No. 1 con n-butanol:piridina:agua (6:4:3 v/v). Las manchas fueron reveladas con ftalato de anilina calentado durante 5 min a 105° C.
- *Identificación de azúcares neutros:* Para el análisis del contenido de azúcares neutros 20 mg de cada una de las muestras fueron hidrolizadas con Ácido Sulfúrico 1N a 100°C por 18 horas. Los azúcares neutros fueron preparados en forma de acetato de alditoles¹³ e identificados mediante un cromatógrafo de gases Pye Unicam con una columna de vidrio (0.3 x 120 cm) preparada con 3% de ECNSS-M en gas Chrom Q (100-120 mesh). Se utilizó como estándar interno inositol. La temperatura fue programada entre 160°C y 210°C la velocidad se programó a 3°/min. La velocidad de flujo del gas nitrógeno fue de 50 mL/min.
- *Actividad antitumoral en tumores experimentales:* Teniendo en cuenta que la actividad antitumoral de biopolímeros ricos en polisacáridos ha sido asociada con la estimulación de los sistemas de defensa del organismo y dado que el producto obtenido por nosotros 21NM142a no presentó actividad citotóxica *in vitro* en la línea celular KB de carcinoma de labio humano (datos no publicados) decidimos realizar los estudios en tumores trasplantados en animales de experimentación. Al resultar el producto 21NM156 más tóxico que el resto de los polisacáridos estudiados por nosotros hasta el momento se decidió evaluarlo en un tumor de crecimiento más rápido, la leucemia linfocítica P388.
- *Actividad antitumoral del producto 21NM142a en los tumores experimentales sarcoma 180 y sarcoma 37:* Se utilizaron 10 ratones NMRI de

22-25 g de peso corporal, para la evaluación de cada una de las concentraciones del producto 21NM142a y el grupo denominado control positivo el cual fue tratado con 5-fluorouracilo (5FU), así como 20 ratones para el grupo denominado control negativo tratado con solución salina fisiológica, calculado según la formula N = nÖK, (donde N es cantidad de animales del grupo control, n la cantidad en los grupos tratados y K es la cantidad de grupos experimentales)¹⁴ los cuales fueron inoculados por vía subcutánea con los tumores experimentales sarcoma 180 y sarcoma 37 a razón de 2 x 10⁶ células tumorales por ratón. Después de transcurridas 24 horas del trasplante se comenzó la administración del producto diariamente durante nueve días por vía intraperitoneal; las dosis empleadas fueron 90, 45 y 22.5 mg/kg para los animales inoculados con el sarcoma 180 y 40 mg/kg para los inoculados con el sarcoma 37. El control positivo fue tratado con una dosis de 20 mg/kg por día y los animales del control negativo recibieron 0.2 más de solución salina fisiológica, ambos por el mismo periodo de tiempo. Los ratones fueron observados diariamente y el efecto antitumoral se evaluó al morir todos los animales de los diferentes grupos experimentales.

- *Actividad antitumoral del producto 21NM156 en el tumor experimental leucemia P388:* Se utilizaron 10 ratones B6D2F1 de 18-20 g de peso corporal, por grupo experimental y se inocularon por vía intraperitoneal con 1 x 10⁶ células tumorales por animal. Después de 24 horas de transplantados, los animales fueron inyectados con una dosis única de 2.5 mg/kg del producto 21NM156. Se utilizó un grupo de 10 animales tratados con 5FU como control positivo en una dosis de 20 mg/kg y otro grupo de 20 animales como control negativo tratados con 0.2 mL de solución salina fisiológica. Los ratones fueron observados diariamente y el efecto antitumoral se evaluó al morir todos los animales de los diferentes grupos experimentales. La evaluación de la actividad antitumoral en todos los experimentos se realizó por la comparación de la supervivencia promedio de los animales tratados con los productos y la supervivencia promedio del control negativo.^{14,15,17} El análisis estadístico de la supervivencia se realizó comparando las curvas de supervivencia por el método de Log-ran.¹⁶

El índice del porcentaje del aumento de la supervivencia se calcula mediante la expresión siguiente:¹⁴

$$A.S.(\%) = (S_t - S_c)/S_c \times 100$$

donde: S_t : Promedio de la supervivencia de los animales tratados con el producto; S_c : Promedio de la supervivencia de los animales tratados con solución salina.

RESULTADOS

Producto de la fermentación y posterior precipitación con sulfato de amonio del caldo de cultivo de la bacteria *Micrococcus sp.* se obtuvo un precipitado de color blanco amarillento al cual, después de dializado y liofilizado, se le determinó el contenido de proteínas, polisacáridos y ácidos urónicos.

Se obtuvieron 890 mg del producto llamado **21NM142a**.

De la fermentación y precipitación del caldo concentrado de la bacteria *Pseudomonas sp.* con etanol al 70% se obtuvo un producto de color beige que, una vez dializado y liofilizado, se le determinó el contenido de proteínas, polisacáridos y ácidos urónicos. Se obtuvieron 950 mg del producto llamado **21NM156**.

En el cuadro I se presentan los resultados de las características químicas de los compuestos 21NM142a y 21NM156 obtenidos, en cuanto a sus contenidos de proteínas, polisacáridos y ácidos urónicos.

La cromatografía de papel mostró que los compuestos presentan residuos de glucosa, galactosa, arabinosa, y en el caso del producto 21NM142a la xilosa también está presente; no hubo evidencias de metil azúcares o de deoxiazúcares.

En los cuadros II y III se presentan los resultados obtenidos en cuanto a la composición de aminoácidos y azúcares, respectivamente para ambos compuestos.

Para conocer el grado de homogeneidad y pureza, se utilizó cromatografía en matrices de filtración en gel, tanto por HPLC (*Figuras 1a y 1b*) como FPLC (*Figuras 2a, 2b*) y en todas las matrices probadas dio un solo máximo de absorción a D.O. 280 m en el cual

Cuadro I. Características químicas de los productos 21NM142 y 21NM156.

	21NM142	21NM156
% de proteínas	55	45
% de carbohidratos	9	11
% de ácidos urónicos	2.5	1.8

coincidió el contenido de proteínas y polisacáridos (*Figuras 3a y 3b*) para ambos extractos.

El tiempo de retención obtenido en la matriz de superosa 12-FPLC fue de 31.4 minutos, en superdex 200 fue de 108 minutos y en la columna de TSK 3000-HPLC fue de 11.7 minutos para el producto 21NM142.

El tiempo de retención obtenido en la matriz de superosa 12-FPLC fue de 34.6 minutos y en la columna de TSK 3000-HPLC fue de 16.0 minutos para el producto 21NM156.

La electroforesis en gel de acrilamida (*Figura 4*) mostró sólo una banda de alrededor de un peso molecular de 20 kDa tanto para el 21NM142 como para el 21NM156, lo cual nos indica que en los dos casos se trata de un solo componente que es secretado por las bacterias al medio extracelular.

Cuadro II. Composición de aminoácidos de los productos 21NM142 y 21NM156.

Aminoácidos	21NM156 (mmol/mg)	21NM142 (mmol/mg)
Ac. aspártico + asparagina	0.640	0.930
Treonina	0.179	0.349
Serina	0.320	0.532
Ac. glutámico + Glutamina	0.882	1.319
Glicocola	1.840	3.759
Alanina	0.520	1.172
Valina	0.221	0.420
Metionina	0.046	0.055
Isoleucina	0.107	0.272
Leucina	0.172	0.528
Tirosina	0.057	0.100
Fenilalanina	0.095	0.267
Histidina	0.181	0.101
Lisina	0.398	0.430
Arginina	0.435	0.447
Triptófano	—	—
Cistina/2	—	—

Cuadro III. Composición de azúcares neutros.

Monosacáridos	21NM156(%)	21NM142(%)
Gliceraldehído	—	12.135
Eritrosa	0.518	26.260
Ribosa	—	2.037
Arabinosa	5.326	5.111
Xilosa	—	3.617
Manosa	1.900	4.575
Galactosa	2.079	3.247
Glucosa	3.150	9.458

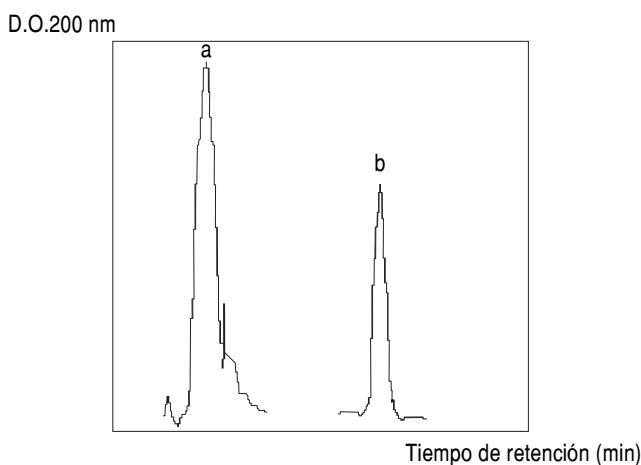


Figura 1. Filtración en gel de los productos 21NM142a (a) y 21NM156 (b) en una columna TSK 3000 SW-HPLC.

Se utilizaron las siguientes condiciones de corrida: En una columna TSK3000SW de filtración en gel en cromatografía líquida de alta presión se aplicaron 20 mL de cada una de las muestras; volumen total de matriz: 13 mL; velocidad de flujo de 1.0 mL/minuto; buffer de corrida: PBS pH = 7.3; presión = 0.8 Bar; dimensiones de la columna: 7.5 mm x 30 cm.

Todas las muestras y el buffer de corrida fueron filtradas con una membrana de 0.2 micras.

La ordenada representa la lectura a una densidad óptica de 200 nm y la abscisa el tiempo de retención en minutos.

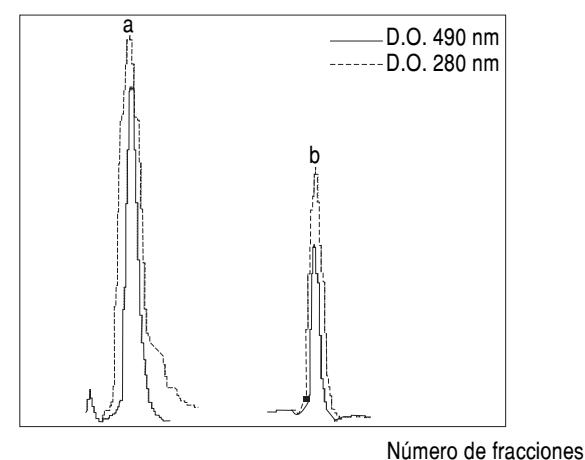


Figura 3. Perfil chromatográfico de proteínas y polisacáridos para los productos 21NM142a (a) y 21NM156 (b).

Se utilizó una matriz de filtración en gel con las siguientes condiciones de corrida: Matriz de Superosa-12; volumen total de matriz: 25 mL; volumen de aplicación: 0.2 mL de cada uno de los productos de bacterias; velocidad de flujo de 0.5 mL/minuto; buffer de corrida: PBS pH = 7.3. Todas las muestras y el buffer de corrida fueron filtrados con una membrana de 0.2 micras.

Se colectaron fracciones de 0.2 mL y a cada una se les determinó el contenido de polisacáridos mediante el método de fenol-sulfúrico y se les midió la densidad óptica a una longitud de onda de 280 nm.

La ordenada representa la lectura a una densidad óptica de 280 nm (---) y a 490 nm (—) y la abscisa el número de fracciones.

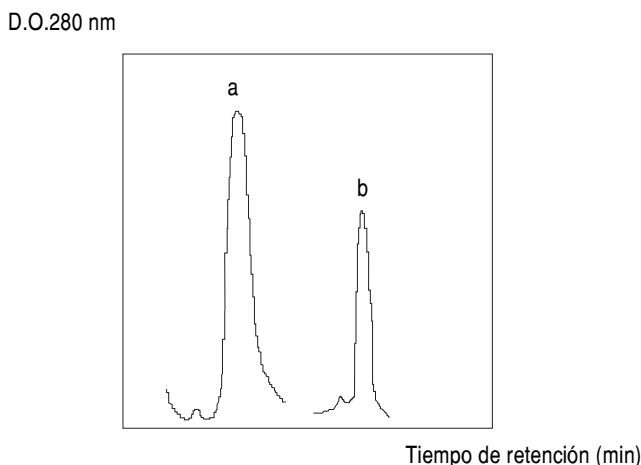


Figura 2. Filtración en gel de los productos 21NM142a (a) y 21NM156 (b) en Superosa 12-FPLC.

Se utilizaron las siguientes condiciones de corrida: Matriz de Superosa-12; volumen total de matriz: 25 mL; volumen de aplicación: 0.2 mL de cada uno de los productos de bacterias; velocidad de flujo de 0.5 mL/minuto, buffer de corrida: PBS pH = 7.3.

Todas las muestras y el buffer de corrida fueron filtradas con una membrana de 0.2 micras.

La ordenada representa la lectura a una densidad óptica de 280 nm y la abscisa el tiempo de retención en minutos.

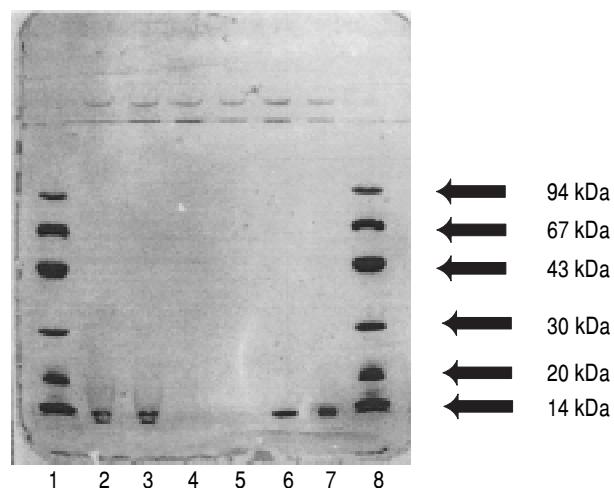


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los compuestos 21NM142a y 21NM156.

El estudio de la pureza y determinación del peso molecular de cada uno de los compuestos se realizó utilizando un gradiente de poliacrilamida de 8-25% con SDS. Se aplicaron 20 mg de proteína y se utilizó el método de tinción con azul de Comassie-R250.

(1 y 8) Marcadores de bajo peso molecular comerciales.

(2 y 3) 21NM156

(4-7) 21NM142a

Cuadro IV. Actividad antitumoral del producto 21NM142a en el tumor murino Sarcoma 180.

Producto	Dosis día mg/kg	Días de tratamiento	n	Supervivencia promedio	AS%
21NM142a	90	10	10	32.33 ± 5.20	51.9
21NM142a	45	10	10	31.22 ± 4.85	46.8
21NM142a	22.5	10	10	28.33 ± 5.02	33.2
5FU	20	10	10	32.33 ± 5.20	42.2
Solución salina fisiológica	0.2 mL	20	20	21.27 ± 4.33	-

Cuadro V. Actividad antitumoral del producto 21NM142a en el tumor murino Sarcoma 37.

Producto	Dosis día mg/kg	Días de tratamiento	n	Supervivencia promedio	AS%
21NM142a	40	9	10	21.0 ± 4.35	37.3
5FU	20	9	10	21.9 ± 3.25	43.1
Solución salina fisiológica	0.2 mL	9	20	15.0 ± 2.09	-

Cuadro VI. Actividad antitumoral del producto 21NM156 en Leucemia P388.

Producto	Dosis día Mg/kg	Días de tratamiento	n	Supervivencia promedio	AS%
21NM156	40	1	10	14.20 ± 4.21	17.4
5FU	20	9	10	20.89 ± 5.02	72.6
Solución salina fisiológica	0.2 mL	9	20	12.10 ± 1.92	-

La determinación de aminoácidos y carbohidratos que se relacionan en el *cuadro I*, conjuntamente con los resultados obtenidos de coincidir los perfiles de proteína y polisacáridos en la *cromatografía de filtración en gel* (*Figuras 3a y 3b*), corroboran la idea de que los productos obtenidos tienen una naturaleza glicoproteica.

Los resultados con respecto a la actividad antitumoral del producto 21NM142a en el tumor experimental Sarcoma 180 (*Cuadro IV*) muestran un aumento significativo $p < 0.05$ en la supervivencia de los animales tratados con respecto al control negativo en las dosis de 45 y 90 mg/kg al concluir el estudio. En ambas dosis, la mayoría de los animales sobrevivieron aun después de los treinta días de comenzado el tratamiento, lo cual puede ser indicativo del aumento de una resistencia del organismo contra el crecimiento del tumor. En los animales que fueron inoculados con el tumor sarcoma 37 y tratados con el producto 21NM142a (*Cuadro V*) también hay un aumento significativo $p < 0.05$ de la supervivencia de

los animales tratados con respecto al control negativo. En los ratones que fueron inoculados con la leucemia P388 y tratados con una dosis única del producto 21NM156 no se registran diferencias significativas $p < 0.05$ en el incremento de la supervivencia entre el grupo de ratones tratados y el grupo de ratones controles (*Cuadro VI*).

DISCUSIÓN

En el estudio de sustancias antitumorales obtenidas a partir de fermentación de microorganismos mariños hemos aislado los biopolímeros 21NM142A y 2lmnl56. El biopolímero 21NM142a manifestó actividad antitumoral contra los tumores trasplantables de ratón sarcoma 37, sarcoma 180; el 21NM156 no presentó actividad en la leucemia linfocítica P388. Estos biopolímeros que fueron homogéneos electroforéticamente y cuyo peso molecular aparente resultó de 20 kDa están constituidos por proteínas y azúcares que eluyen conjuntamente en matrices de fil-

tración en gel, siendo conformada la presencia tanto de proteínas, como de azúcares por el análisis de aminoácidos y la cromatografía gas-líquida, respectivamente. Su resistencia a la separación y su composición sugieren que estos biopolímeros pueden ser complejos entre polisacáridos y proteínas o ser glicoproteínas.

El hecho de que, en todas las matrices de filtración en gel probadas, los productos obtenidos aparezca sólo un máximo de absorción demuestra la homogeneidad de los mismos. El incremento de la supervivencia que se observa con el producto 21NM142a en los tumores sólidos sarcoma 180 y sarcoma 37 podría ser atribuible a que este producto actúa sobre el sistema inmune, activando los mecanismos de lucha contra el tumor del propio organismo, el cual ataca las células tumorales produciendo cierta regresión del tumor y, por consiguiente, una prolongación del periodo de vida de los animales.

El producto 21NM156 no fue efectivo en la leucemia P388, por lo que debe ser evaluado en tumores sólidos tales como el sarcoma 37 y el sarcoma 180.

Se conoce que el desarrollo de los tumores sólidos sarcoma 180 y 37 está relacionado con mecanismos en los que interviene el sistema inmune, no sucediendo así en el caso de la leucemia P388. Los hechos de que el 21NM142a sea activo en los tumores sólidos y que el 21NM156 no haya presentado actividad en la leucemia P388, así como la similitud de los compuestos estudiados, apuntan la idea de que la actividad encontrada en el primero esté relacionada o se manifieste de alguna manera con la participación del sistema inmune.

Con base en los resultados obtenidos, se concluye que las bacterias marinas pueden constituir una fuente de obtención de biopolímeros con actividad antitumoral, que según las condiciones de fermentación éstas expulsan al medio sólo un compuesto que parece ser de naturaleza glicoproteica, lo que facilita su purificación y reproducibilidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Faulkner DJ. Marine natural products. *J Nat Prod Rep* 1992; 9: 323-364.
- Cragg G, Newman DJ, Raymond BW. Coral reefs, forest and termal vents: The worldwide exploration of nature for novel antitumor agents. *Sem Oncol* 1997; Vol 24: 156-163.
- James SG, Holmstrom C, Kjelleberg S. Purification and characterization of a novel antibacterial protein from the marine bacterium D2. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62 (8): 2763-2788.
- Doshida J, Hasegawa H, Onuki H, Shimidza N. Exophilin A, a new antibiotic from a marine microorganism Exofialipisciphila. *J Antibiot Tokio* 1996; 49 (11): 1105-1109.
- Okami Y. Marine microorganisms, as a source of bioactive agents. *Biotechnology* 1986; 12: 67-68.
- Imamura N, Nishijima N, Takadera T, Adashi K, Sakai M, Sano H. New anticancer antibiotics pelagiomincens produced by a new marine bacterium Pelagrobacter variabilis. *J Antibiot Tokio* 1997; 50 (1): 8-12.
- Gustafson K, Roman M, Fenical W. The macrolactins, a novel class of antiviral and cytotoxic macrolides from a death sea marine bacterium. *J Am Chem Soc* 1989; 111: 7519-24.
- Okutani K. Antiviral activities of sulphate derivatives of a fucosamine-containing polysaccharides of marine bacterial origin. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1992; 58: 927-930.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- Dubois IL, Guilles K, Hamilton JK, Robers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugar a related substances. *Anal Chem* 1956; 28: 350-356.
- Blumenkrantz N, Asboe Hausen G. New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal Chem* 1973; 54: 484-489.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; (Lond) 227: 680-685.
- Sawardeker JS, Sloneker JH, Jeanes A. Quantitative determination Of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography. *Anal Chem* 1965; 37: 1602-1604.
- Geran RI, Greenberg NH, MacDonald MM, Shumacher AM, Abbott BJ. Protocols for screening Chemicals Agents and Natural Products against Animal Tumors and other biological systems. *Cancer Chemother Rep* 1972; 3 (2) Part 3.
- Williams DL, Preteus HA, Mc Namee RB et al. Development, physicochemical characterization preclinical efficacy evaluation of water soluble glucan sulfate derivated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Immunopharmacology* 1991; 22: 139-156.
- Cox DR, Oares D. *Analysis of survival data*, (London) 1984: 104-105.
- Harris LC, Marathi UK, Edwards CC, Houghton PJ. Retroviral transfer of bacterial alkyltransferrase gene into murine bone marrow protects against chloroethylnitrosourea cytotoxicity. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 1359-1368.

Dirección para correspondencia:

Rita María Pérez Gil

Instituto Nacional de Oncología
y Radiobiología
Calle 29 entre E y F, Vedado
Ciudad de La Habana, Cuba
Teléfono: 55 2586
E-mail: uninor@infomed.sld.cu
Fax: 537-552587, 537-662227

Fecha de recepción: 08/08/98.

Fecha de aceptación: 20/03/00.