

Evaluación de la citotoxicidad de extractos marinos sobre un panel de líneas celulares

Evaluation of cytotoxicity of different marine extracts in a cell line panel

Hermis Rodríguez-Sánchez,^I Alexis Díaz-García,^{II} Yahima Frión-Herrera,^{III} Lianet Monzote Fidalgo^I

^I Instituto de Medicina "Tropical Pedro Kourí. La Habana, Cuba.

^{II} Laboratorios de Producciones Biológico-Farmacéuticas (LABIOFAM). La Habana, Cuba.

^{III} Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana. Cuba.

RESUMEN

Introducción: los extractos naturales provenientes de fuentes marinas representan una importante fuente en el descubrimiento de nuevos compuestos con potencialidades como anticarcinogénicos.

Objetivos: determinar el efecto de cinco extractos provenientes de diferentes organismos marinos sobre la viabilidad de un panel de cinco líneas celulares (A549, HÉp-2, MDA-MB-231, SiHa y MRC-5).

Metodos: el efecto de los extractos (*Physalia physali*, *Cassiopea xamachana*, *Tripneustes ventricosus*, *Echinometra lucunter*) se determinó mediante el ensayo colorimétrico con el empleo de bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio. Mediante de RT-PCR se determinó adicionalmente el efecto del extracto de *Echinometra lucunter* sobre la expresión de los genes apoptóticos p53, survivin, bcl-xL y noxa en SiHa.

Resultados: todos los extractos afectaron la viabilidad celular de la línea normal MRC-5 de pulmón humano. Sin embargo, no disminuyeron la viabilidad de las líneas celulares de origen tumoral con excepción del extracto de *Echinometra lucunter*. Este extracto solo afectó la viabilidad de la línea celular tumoral SiHa. Los valores de las concentraciones inhibitorias medias (CI₅₀) mostraron que solo para el extracto de *Echinometra lucunter*, la línea celular tumoral SiHa evidenció una CI₅₀ de 52,07±11 µg/mL que es significativamente inferior a MRC-5 con una CI₅₀ de 98,6±14 µg/mL, por lo que se muestra selectividad frente a las células tumorales. Adicionalmente, el extracto disminuyó significativamente la expresión de los genes

proapoptóticos lo que sugiere la muerte celular por necrosis en las células SiHa. **Conclusiones:** el extracto proveniente de *Echinometra lucunter* resultó selectivo frente a las células tumorales SiHa. Experimentos que incluyan otras líneas celulares de cáncer cérvicouterino podrían confirmar el potencial de este extracto frente a esta variedad histológica de cáncer.

Palabras clave: extractos marinos; líneas celulares; citotoxicidad.

ABSTRACT

Introduction : natural extracts from marine sources represent an important source for the discovery of new compounds with anti-carcinogenic potentialities.

Objectives: To determine the effect of five extracts from several marine organisms on the viability of a panel of five cell lines (A549, HEP-2, MDA-MB-231, SiHa y MRC-5).

Methods : the effects of the extracts (*Physalia physalis*, *Cassiopea xamachana*, *Tripneustes ventricosus*, *Echinometra lucunter*) were then determined by using the colorimetric assay with 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide. Additionally, the effect of extract of *Echinometra lucunter* was determined on the expression of apoptotic genes p53, survivin, bcl-xL and noxa in SiHa.

Results : all the extracts affected the cell viability of the normal cell line MRC-5 of the human lung. However, viability of tumoral cell lines did not decrease except for the extract from *Echinometra lucunter*. This extract just affected the viability of tumor cell line SiHa. The mean inhibitory concentrations (IC₅₀) showed that only for *Echinometra lucunter* extract, the tumor cell line SiHa revealed a IC₅₀ of 52.07±11 µg/mL that is significantly lower than that of MRC-5 with IC₅₀ of 98.6±14 µg/mL, therefore the selectivity against the tumor cells was shown. Moreover, the extract markedly decreased the expression of proapoptosis genes, thus indicating the cell death from necrosis in SiHa cells.

Conclusions: extract from *Echinometra lucunter* was selective against tumor cells SiHa. Other experiments that will include other cervix uterine cancer cell lines can confirm the potential of this extract to have an effect on this histological cancer type.

Keywords: marine extracts, cell lines, cytotoxicity.

INTRODUCCIÓN

Los organismos marinos son reconocidos como una fuente atractiva de compuestos farmacéuticos potenciales.^{1,2} La evaluación citotóxica de extractos provenientes de estos organismos constituye un campo de investigación científica relativamente reciente con amplias potencialidades, considerando que los océanos cubren las tres cuartas partes de la superficie terrestre.³

La biotecnología marina provee de una amplia variedad de productos anticancerígenos provenientes de diversos organismos marinos, que se encuentran en la actualidad en diferentes fases de desarrollo preclínico o fases clínicas.⁴⁻⁶ La

mayoría de las moléculas bioactivas en cáncer que se han aislado de organismos marinos provienen de invertebrados.^{7,8} Las características de un cuerpo o anatomía débil y su forma de vida libre en el agua demandan una alta presencia de compuestos químicos letales para la defensa. Estas características propician que existan compuestos interesantes con potencialidades farmacológicas en estas especies.⁹ Con estas evidencias científicas, se realizará en este trabajo la evaluación del efecto de varios extractos de organismos invertebrados marinos sobre la viabilidad celular en un panel de células tumorales.

MÉTODOS

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

Se emplearon cinco extractos obtenidos a partir de diferentes organismos marinos proporcionados por el Acuario Nacional de Cuba (Cuadro) y recolectados en distintas regiones del litoral habanero.

Cuadro. Especies de invertebrados marinos utilizados en este estudio

Especie	Familia	Extracto/ parte evaluada	Zona de colección	Número de espécimen
<i>Physalia physalis</i>	Physaliidae	Acuoso Cuerpo (m13)	Playa Jaimanitas	ANC.03.1.102
<i>Cassiopea xamachana</i>	Scyphozoe	Hidroalcohólico Cuerpo (m16)	Playa Santa fé	ANC.03.2.001
<i>Tripneustes ventricosus</i>	Toxopneustidae	Hidroalcohólico Parte interna (m17)	Litoral Acuario nacional	IDO.10.3.179
<i>Echinometra lucunter</i>	Echinometridae	Hidroalcohólico Parte interna (m18a)	Litoral Acuario nacional	IDO.10.3.072
<i>Echinometra lucunter</i>	Echinometridae	Hidroalcohólico Cuerpo (m18b)	Litoral Acuario nacional	IDO.10.3.072

Los extractos se prepararon por maceración con agitación ocasional durante una semana y empleando etanol al 80 %. Estos fueron secados, liofilizados y almacenados a -20 °C. A los organismos de *Physalia physalis* se les realizó un proceso de autólisis con agua destilada y regímenes intermitentes de homogenización mecánica con *Waring-Blender*. Posteriormente, el extracto se filtró con lana de vidrio y el filtrado se centrifugó a 3 200 g a 4 °C durante 1 hora y se liofilizaron. Los recipientes que contenían los extractos se sellaron y se almacenaron a -20 °C. Al momento de su uso los extractos secos se pesaron y se diluyeron en dimetilsulfóxido 100 % (DMSO) (*Sigma Chemical Co., St Louis, MO*) para obtener soluciones concentradas de 20 mg/mL. A partir de estas soluciones se prepararon soluciones de trabajo por dilución 1:20 extracto/medio de cultivo celular para quedar a 1 mg/mL.

LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares utilizadas para este estudio fueron: adenocarcinoma de pulmón humano (A549), carcinoma de laringe humano (HEp-2), carcinoma de mama

humano (MDA-MB-231), carcinoma de cuello uterino humano (SiHa) y células normales de pulmón humano (MRC-5). La línea celular A549 y MDA-MB-231 crecieron en medio *Dulbecco Modified Eagle (DMEM/Ham's F-12)* suplementado con 2mM de glutamina, aminoácidos no esenciales y 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB) (*SIGMA, EEUU*). Las líneas celulares HEp-2, SiHa y MRC-5 se cultivaron en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con 2mM de glutamina, aminoácidos no esenciales y 10% de SFB (*SIGMA, EEUU*). Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de 5 % CO₂. Para los ensayos, las células se desprendieron por tratamiento con 0,25 % tripsina-EDTA y se resuspendieron hasta una concentración de 2x10⁵ células/mL.

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Para los estudios de citotoxicidad se emplearon placas de 96 pozos para cultivos celulares (*Corning Inc. costar, EEUU*). Las líneas celulares A549 y HEp-2 se sembraron a 1x10⁴ células/pozo, las líneas celulares MDA-MB-231 y SiHa se sembraron a 5x10³ células/pozo mientras MRC-5 se sembró a 2x10⁴ células/pozo y se incubaron durante 24 h a 37 °C en una atmósfera de 5 % CO₂. A partir de las soluciones de trabajo de cada extracto, se realizaron cinco diluciones seriadas en DMEM, en relación 1:1 y se adicionó 100 µL/pozo de cada dilución para quedar a concentración final de 6,25; 12,5; 25; 50 y 100 µg/mL en cada pozo. Los tratamientos se aplicaron por triplicado y el experimento se realizó tres veces. El DMSO, el cual se empleó como solvente de los extractos de plantas, quedó disuelto en concentraciones entre 0,031 y 0,5 % en cada pozo, por lo que se evaluó individualmente para citotoxicidad de forma similar a los extractos. Cada concentración evaluada de los extractos se preparó por triplicado. El efecto de los extractos marinos después de 72 h de incubación se detectó mediante el ensayo colorimétrico del 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Se agregaron 10 µL de una solución de 5 mg/mL de MTT (*Sigma*) a cada uno de los pozos y se incubó a 37 °C durante 3 h. El medio fue eliminado y el formazán generado por la actividad de la deshidrogenasa en las células, fue disuelto en DMSO (150 µL/pozo). La cantidad de MTT-formazán, que es directamente proporcional al número de células vivas, se determinó midiendo la absorbancia (DO) en un lector de microplacas de ELISA (*MRX Revelation Dynex Technologies, Alemania*) a 560 nm empleando 630 nm como referencia. El porcentaje (%) de viabilidad celular se determinó mediante la ecuación DO (muestra)*100/DO (control). Los valores de CI₅₀ de cada extracto se determinaron a partir de las curvas de concentración-efecto (% viabilidad celular) mediante el análisis de regresión lineal con el empleo del paquete estadístico *GraphPad Prism* versión 4.03 (*GraphPad Software, Inc.*).

AISLAMIENTO DEL ARN TOTAL Y ANÁLISIS POR TRANSCRIPCIÓN INVERSA DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA APOPTOSIS EN LAS CÉLULAS TUMORALES HUMANAS SIHA.

Las células tumorales SiHa (1x10⁵/pozo) se cultivaron durante 24 h en placas de 24 pozos de fondo plano para cultivos celulares. Al cabo de este tiempo se trataron con la CI₅₀ del extracto m18a (*Echinometra lucunter*) por 24 h y 48 h. La aplicación del extracto se realizó por triplicado incluido los pozos controles sin tratamiento. Al final de cada período de incubación las células se trataron con 1 mL de Trizol (*Invitrogen, EEUU*) para obtener el ARN total. La concentración del ARN total en las muestras se determinó empleando un Biofotómetro (*Eppendorf, Alemania*).¹⁰ La transcripción inversa de 1 µg de ARN total de cada muestra se realizó empleando el sistema de la reverso transcriptasa según las recomendaciones del fabricante (*Promega Inc. EEUU*), para obtener el ADN complementario (ADNc).

La reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) se realizó en una mezcla de reacción conteniendo una solución tampón 1X Green Go taq Flexi, 2 mM MgCl₂, 10 mM dNTPs and 1,25 U de ADN polimerasa GoTaq (Promega Inc. EEUU), 0,2 mM de cada cebador y 5 µl del ADNc en un volumen final de 25 µl. La amplificación de los oligonucleótidos se realizó en un termociclador (AUXILAB, Spain). Se empleó el gen de la gliceroaldehído fosfato 3-deshidrogenasa (GAPDH) como control de la reacción. Las secuencias de cada uno de los cebadores fueron p53-F 5'-GGGTTAGTTTACAATCAGCCACATT-3', p53-R 5'-GGCCTTGAAGTTAGAGAAAATTCA-3'; survivin-F 5'-CTTTCTCAAGGACCACCG-3', survivin-R 5'-TTTTATGTTCTCTATGGGGTC-3'; Bcl-xL-F 5'-ACCCCTTAGCCTCCCTGAAA-3', Bcl-xL-R 5'-CCATAAACAGCTCTGGGGCA-3'; Noxa-F 5'-TTCAATGTGTTCTGTTGGGC-3-, Noxa-R 5'-GTGACAAGGAGCATTTTCCGA-3'. Las condiciones de la PCR fueron desnaturalización a 94 °C por 5 min, 30 ciclos a 94 °C por 1,5 min, a 56 °C por 30 sec a 72 °C por 1 min, la elongación final se realizó a 72 °C por 7 min.¹⁰ Los productos de la PCR se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % (p/v) a 70 V y se visualizaron con bromuro de etidio. La intensidad de las bandas se determinó empleando el software libre *Image J* versión 1.46.

ANALISIS ESTADISTICO

Para las comparaciones de los valores de CI₅₀ se realizó el *test* no paramétrico *Kruskal-Wallis* para comparación de datos múltiples y el *post test de Dunns*. Los valores densitométricos se normalizaron a partir de los valores de densidad de GAPDH. La comparación de la intensidad de las bandas se realizó mediante la prueba *U-Mann Whitney*. En todos los casos se consideró la diferencia significativa para $p < 0,05$. Todo el análisis estadístico se realizó empleando el programa estadístico *GraphPad Prism 5.0* (*GraphPad Software Inc., San Diego, CA*).

RESULTADOS

El efecto de los cinco extractos marinos frente a las líneas celulares A549, HEp-2, MDA-MB-231, SiHa y MRC-5 se determinó a través del ensayo colorimétrico MTT. Todos los extractos afectaron la viabilidad celular de la línea MRC-5 de pulmón humano. Sin embargo, no disminuyeron la viabilidad de las líneas celulares de origen tumoral con excepción del extracto m18a. Los valores de las concentraciones inhibitorias medias (CI₅₀) mostraron que solo para el extracto de *Echinometra lucunter*, la línea celular tumoral SiHa evidenció una CI₅₀ de 52,07±11 µg/mL significativamente inferior a MRC-5 con una CI₅₀ de 98,6±14 µg/mL. Entre todos los extractos evaluados, solo m18a evidenció una afectación significativa a la viabilidad celular frente a las células tumorales SiHa con valores de CI₅₀ de 52,07±11 µg/mL. (tabla) Estos valores para las células tumorales SiHa resultaron significativamente inferiores ($p < 0,05$) a la CI₅₀ obtenida de este extracto en las células normales MRC-5 (98,6±14 µg/mL) (figura 1).

Tabla. Valores de CI_{50} de los extractos marinos frente a las líneas celulares evaluadas.
 ND: No se pudo determinar en el intervalo de concentraciones empleado.
 Valores representan la media \pm DE de tres experimentos

Líneas celulares	Extractos				
	m13	m16	m17	m18a	m18b
	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)				
A549	ND	ND	ND	ND	ND
HEp-2	ND	ND	ND	ND	ND
MDA-MB-231	ND	ND	ND	ND	ND
SiHa	ND	ND	ND	52,07 \pm 11	ND
MRC-5	100,02 \pm 17	81,64 \pm 10	62,95 \pm 18	98,6 \pm 14	64,7 \pm 21

El extracto m18a a la CI_{50} se evaluó en las células tumorales SiHa y se determinaron los niveles de expresión de genes relacionados con los eventos de muerte celular. En la figura 2 se observan las fotos del efecto del extracto m18a a la CI_{50} frente a SiHa. En los controles se observan las células con la morfología característica y la monocapa celular confluyente (figura 2). A las 24 h de tratamiento se observa la ruptura total de la monocapa celular, pérdida de la morfología y una elevada proporción de células redondeadas en el sobrenadante de cultivo (figura 2). A las 48 h de tratamiento se incrementó el efecto tóxico sobre las células tumorales y se observó una gran cantidad de restos celulares en el medio de cultivo, lo cual evidencia la elevada toxicidad del extracto m18a sobre las células tumorales SiHa (figura 2).

El análisis de los niveles de expresión de los genes relacionados con los eventos de muerte celular revela una disminución significativa ($p < 0,05$) de la expresión del gen p53 a las 24 h y 48 h de tratamiento. De forma similar los restantes genes proapoptóticos (noxa) y los genes antiapoptóticos (*bcl-xL*, *survivin*) mostraron una disminución significativa ($p < 0,05$) de la expresión comparados con el control sin tratamiento (figura 3).

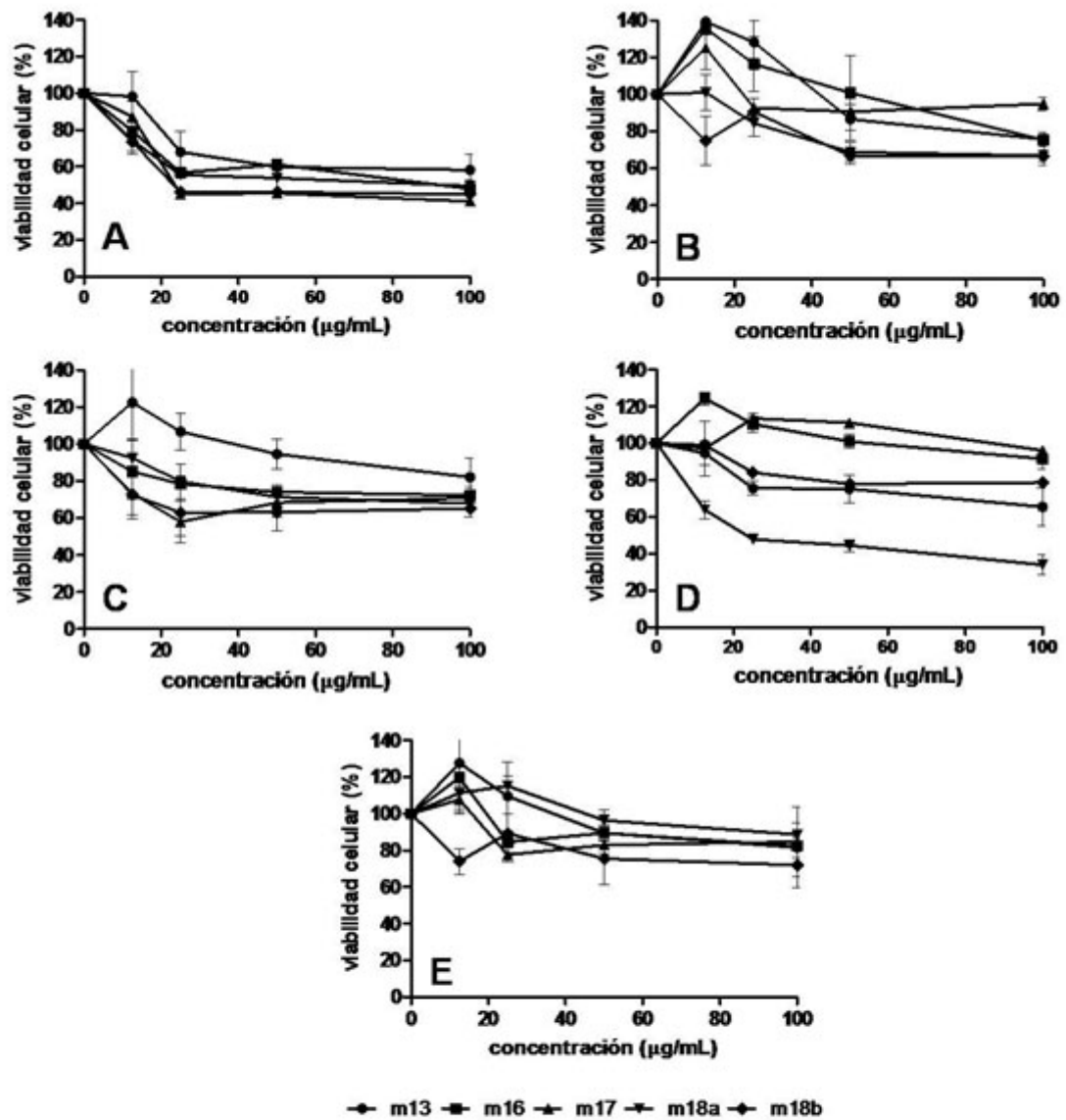


Fig. 1. Gráficos del comportamiento de la viabilidad celular frente a los diferentes extractos marinos. Las células se incubaron durante 72 h a concentraciones entre 12,5-100 µg/ml. A) Línea celular de fibroblastos de pulmón humano MRC-5 B) Línea celular tumoral de pulmón humano A549 C) Línea celular tumoral de mamas humano MDAMB-231 D) Línea celular tumoral de cuello uterino humano SiHa E) Línea celular tumoral de laringe humano HEp-2.

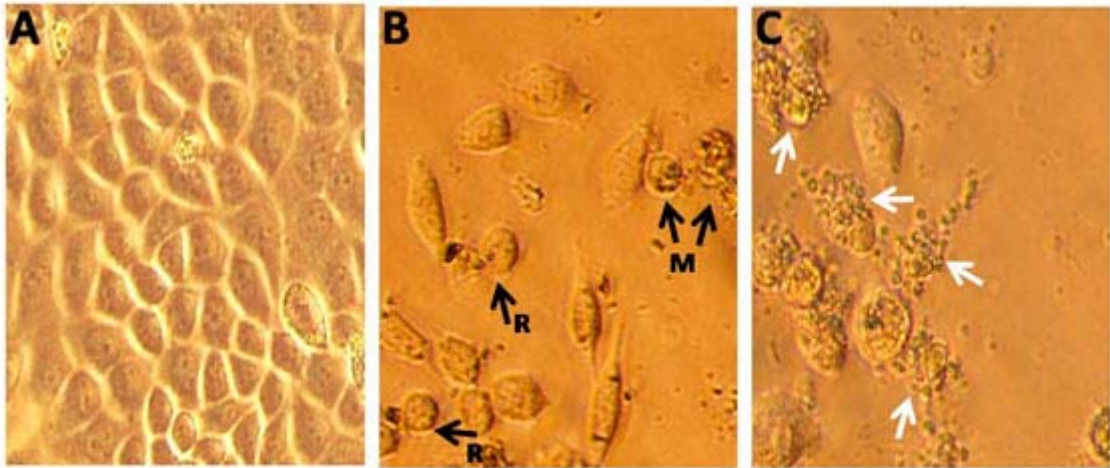


Fig. 2. Evidencias morfológicas del efecto del extracto m18a (*Echinometra lucunter*) sobre la línea celular SiHa. (R): Células redondeadas en el sobrenadante de cultivo. (M): Daños drásticos a la membrana celular.

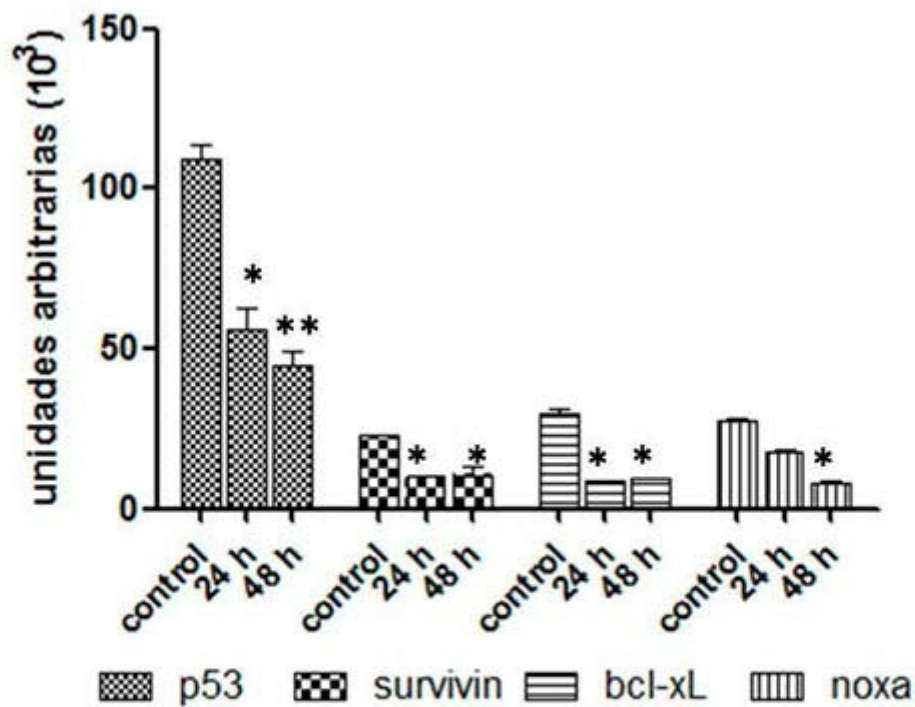


Fig. 3. Efecto del extracto m18a (*Echinometra lucunter*) sobre los niveles de expresión de los genes p53, *surviving*, bcl-xL y noxa en la línea celular SiHa. La expresión de los RNAm se detectó mediante RT-PCR a las 24 h y 48 h. Los valores representan la media±DE de 3 experimentos. Diferencia estadísticamente significativa respecto al control *p<0.05, **p<0.01.

DISCUSIÓN

La evaluación de extractos naturales sobre células tumorales *in vitro* brindan las primeras evidencias de las potencialidades de estos compuestos como antitumorales. En el presente estudio se evaluaron diferentes extractos marinos sobre células tumorales de variado origen histológico. Este panel de células permite identificar el espectro de respuesta diferencial a los diferentes tratamientos. Los diferentes extractos marinos evaluados mostraron mayoritariamente una ausencia de toxicidad hacia las líneas celulares tumorales. Este resultado sugiere que los extractos no presentan componentes que provoquen la disminución de la viabilidad celular en estas células. Sin embargo, la célula normal empleada en el estudio, sí resultó significativamente sensible a la exposición de los cinco extractos. Estas evidencias resultan congruentes si tenemos en cuenta que estos extractos resultan tóxicos al contacto con los seres humanos, provocando una serie de eventos fisiopatológicos.¹¹⁻¹³ La especie *Cassiopea xamachana* induce hemólisis de eritrocitos y toxicidad en animales sanos probablemente por la presencia entre sus componentes de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) y además de toxinas que interactúan con receptores de membrana como los de acetilcolina muscarínicos.¹¹ Adicionalmente, las toxinas presentes en el extracto de *Echinometra lucunter* son las principales responsables de los efectos proinflamatorios observados en los animales y las personas.^{12,13}

Las células tumorales SiHa resultaron significativamente sensibles al extracto obtenido de la parte interna del erizo negro de puntas cortas *Echinometra lucunter*. La CI₅₀ en SiHa para este extracto fue inferior incluso a la obtenida para las células normales MRC-5 lo que sugiere una potencial selectividad de este extracto hacia estas células tumorales. No existen informes previos, hasta donde conocemos, de efectos de esta especie sobre células tumorales. Por tanto, los resultados del presente trabajo representan evidencias iniciales del efecto sobre células tumorales. SiHa es una línea celular proveniente del cáncer cérvicouterino que contiene el virus del papiloma humano subtipo 16 (VPH).¹⁴ Este virus se considera como el mayor factor de riesgo para la transformación maligna en las células de cérvix.¹⁴ Además, el VPH induce la producción de las proteínas oncogénicas virales E6 y E7 las que permiten mantener el fenotipo maligno debido a que posibilitan la degradación de la proteína p53 y además bloquean la unión de la proteína del retinoblastoma (Rb) al factor de transcripción E₂F.¹⁵ Como consecuencia esto provoca bajos niveles de la proteína p53 en el citoplasma y disminuye significativamente la posibilidad de la inducción de la apoptosis.^{14,15} La baja expresión de p53 por las proteínas E6 virales conjuntamente con las elevadas concentraciones de enzimas antioxidantes presentes en SiHa contribuye al fenotipo de resistencia a la quimioterapia inductora de la apoptosis.¹⁶ Estas características provocan el fallo terapéutico de las terapias anticancerosas que inducen la apoptosis vía p53-dependiente. Otros eventos de muerte celular como la inducción de apoptosis p53-independiente, la restauración de las funciones de p53 ó la necrosis¹⁷⁻¹⁹ podrían representar alternativas que podrían revertir el efecto de la presencia del VPH en el cáncer cérvicouterino e inducir la muerte de las células tumorales. En este estudio el extracto de *E. lucunter* indujo necrosis en las células SiHa. La necrosis se caracteriza por el aumento del volumen celular, picnosis nuclear y ruptura celular y es inducida por estrés, radiación, calor, carencia de oxígeno o por toxinas naturales.²⁰ La presencia de toxinas como componentes principales del extracto de *E. lucunter* podrían ser las responsables de la inducción de la muerte celular por necrosis en las células SiHa.

Por otro lado a pesar de que los restantes extractos no afectaron la viabilidad de las células tumorales evaluadas, algunos de ellos muestran potencialidades como antitumorales. La especie *Cassiopea xamachana* muestra disminución de la

aparición de tumores cerebrales en ratas por administración intracerebral.²¹ La evaluación de otras líneas celulares tumorales podría definir el potencial antitumoral de este extracto. Los extractos de *Physalia physali* y *Tripneustes ventricosus* empleados en el presente estudio, no evidencian hasta donde se conocen las potencialidades antitumorales para estas células tumorales u otras existentes en otros paneles de células. Debido a esto se deben evaluar en futuros estudios células tumorales de origen hematopoyético, sarcomas o del sistema nervioso para determinar su potencial efecto farmacológico.

El extracto de *E. lucunter* demostró efecto citotóxico sobre las células de cáncer cérvicouterino SiHa. Futuros estudios en un panel ampliado de células tumorales de origen cérvicouterino deben ser realizados conjuntamente con el aislamiento de los principios activos, provenientes de la cavidad interna del erizo negro de puntas cortas (*Echinometra lucunter*) para confirmar la selectividad hacia estas células.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. León CJ, Gómez SM, Morantes SJ, Cordero CP, Ancízar F. Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad in vitro. *Biomédica*. 2006; 26:161-8.
2. Faulkner D. Marine natural products. *Nat Prod*. 2002;19:1-48.
3. Valdés-Iglesias O, Pérez-Gil R, Colom Y. Actividad antitumoral de los organismos marinos. *Cub@: Medio Ambiente y Desarrollo; Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente*. 2010. 19. Disponible en: <http://ama.redciencia.cu/articulos/19.04.pdf>
4. Lee JC, Hou MF, Huang HW, Chang FR, Yeh CC, Tang JY, et al. Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. *Cancer Cell Int*. 2013;13(1):55.
5. Murugan K, Iyer VV. Differential growth inhibition of cancer cell lines and antioxidant activity of extracts of red, brown, and green marine algae. *In Vitro Cell DevBiol Anim*. 2013; 49(5):324-334.
6. Ebrahimi Nigjeh S, Yusoff FM, Mohamed Alitheen NB, Rasoli M, Keong YS, Omar AR. Cytotoxic effect of ethanol extract of microalga, *Chaetoceros calcitrans*, and its mechanisms in inducing apoptosis in human breast cancer cell line. *Biomed Res Int*. 2013; doi: 10.1155/2013/783690.
7. Concetta I, Anna A, Filomena D' A, Maria S, Marialuisa M. Alkaloids from Marine Invertebrates as Important Leads for Anticancer Drugs Discovery and Development. *Molecules* 2014;19: 20391-20423; doi:10.3390/molecules191220391.
8. Wamtinga RS, Rainatou B, Claudia C, Marie HT, Mario D, Marc D. A Survey of Marine Natural Compounds and Their Derivatives with Anti-Cancer Activity Reported in 2012. *Molecules*. 2015; 20, 7097-7142; doi:10.3390/molecules20047097.
9. William HG, Bradley SM. Lessons from the Past and Charting the Future of Marine Natural Products Drug Discovery and Chemical Biology. *j.chembiol*. 2011;12:0-14.

10. Díaz-García A, Morier-Díaz L, Frión-Herrera Y, Rodríguez-Sánchez H, Caballero-Lorenzo Y, Mendoza-Llanes D et al. 2013. In vitro anticancer effect of venom from Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* against a panel of human cancer cell lines. *J. Venom Res.* 2013;4:5-12.
11. Radwan FF, Román LG, Baksi K, Burnett JW. Toxicity and mAChRs binding activity of *Cassiopea xamachana* venom from Puerto Rican coasts. *Toxicon.* 2005;45(1):107-112.
12. Sciani JM, Zychar BC, Gonçalves LR, Nogueira Tde O, Giorgi R, Pimenta DC. 2011. Pro-inflammatory effects of the aqueous extract of *Echinometra lucunter* sea urchin spines. *Exp Biol Med* 236(3):277-280.
13. Vidal HJ. Observation of initial clinical manifestations and repercussions from the treatment of 314 human injuries caused by black sea urchins (*Echinometra lucunter*) on the southeastern Brazilian coast. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2012;45(3):390-92.
14. Roa JC, Garcia P, Gomez J, Fernández W, Gaete F, Espinoza A, et al. HPV genotyping from invasive cervical cancer in Chile. *Int J Gynaecol Obstet.* 200;105:150-153.
15. Huh K, Zhou X, Hayakawa H, Cho JY, Libermann TA, Jin J, et al. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Virol.* 2007;81: 9737-9747.
16. Maria F, Valery F, Vonetta M., Kangling Z, Anatolii K, Svetlana B, et al. Cellular Levels of Oxidative Stress Affect the Response of Cervical Cancer Cells to Chemotherapeutic Agents. *BioMed Research International*, 2014. Article ID 574659, Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/574659>
17. Choudhari AS, Suryavanshi SA, Kaul-Ghanekar R. The Aqueous Extract of *Ficus religiosa* Induces Cell Cycle Arrest in Human Cervical Cancer Cell Lines SiHa (HPV-16 Positive) and Apoptosis in HeLa (HPV-18 Positive). *PLoS One.* 2013; 8(7): doi:10.1371/journal.pone.0070127.
18. Hernandez-Flores G, Ortiz-Lazareno PC, Lerma-Diaz JM, Dominguez-Rodriguez JR, Jave-Suarez LF, Aguilar-Lemarroy Adel C, et al. Pentoxifylline sensitizes human cervical tumor cells to cisplatin-induced apoptosis by suppressing NF-kappa B and decreased cell senescence. *BMC Cancer.* 2011;11:483. doi: 10.1186/1471-2407-11-483.
19. Lee YS, Bae SM, Kwak SY, Park DC, Kim YW, Hur SY, et al. Cell cycle regulatory protein expression profiles by adenovirus p53 infection in human papilloma virus-associated cervical cancer cells. *Cancer Res Treat.* 2006;38(3):168-177.

20. Ju Z, Xiaomin L, Longyu J, Rongjia Z, Siqi L, Ningzhi X, et al. Necrosis, and then stress induced necrosis-like cell death, but not apoptosis, should be the preferred cell death mode for chemotherapy: clearance of a few misconceptions. *Oncoscience*, 2014;1(6):407-22.

21. Karina O, Lourdes S, Judith S, Azael M, Concepción N-R, Daniel R, et al. Possible Antitumoral Effect of the Crude Venom of *Cassiopea xamachana* (Cnidaria: Scyphozoa) on Tumors of the Central Nervous System Induced by N-Ethyl-N-Nitrosourea (ENU) in Rats. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 2003;46:85-87.

Recibido: 19 de diciembre de 2014

Aprobado: 19 de octubre de 2015

Alexis Díaz-García . Laboratorios de Producciones Biológico-Farmacéuticas (LABIOFAM). Ave. Independencia, Km 16 ½, Santiago de las Vegas, Boyeros. La Habana, Cuba. Correo electrónico: alediaz@ipk.sld.cu