



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA



CIHEAM
ZARAGOZA

MÁSTER UNIVERSITARIO EN CULTIVOS MARINOS

Las Palmas de Gran Canaria, España

**Análisis de la actividad antibacteriana y anticancerígena de
extractos de *Holothuria Sanctori* (Delle Chiaje, 1823)**

Realizado por:
Antonio Paule Manzano

**TESIS PRESENTADA Y PUBLICAMENTE DEFENDIDA
PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO OFICIAL DE
MÁSTER UNIVERSITARIO EN CULTIVOS MARINOS**

Las Palmas de Gran Canaria a 30 de junio de 2022

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a:

La Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) y al Centro Internacional de Estudios Agronómicos Mediterráneos (CIHEAM) por organizar este Máster de Cultivos Marinos.

A mis tutores Félix y Gercende por su ayuda y apoyo. También a Ana y José Javier ya que gracias a ellos fue posible mi estancia en Tenerife (IUBO-AG).

Al personal técnico e investigador del grupo GIA del IU- ECOAQUA por su disposición y ayuda incondicional, especialmente a Jimena y Carmen.

Y a mi familia y amigos, porque han sido un pilar fundamental durante todo el trayecto.

Índice

Resumen	I
Abstract	II
Abreviaturas	III
Lista de figuras	V
Lista de tablas	VIII
Graphical abstract.....	IX
Introducción.....	1
1. Panorama global de la acuicultura y pesca mundial	1
1.1 Especies producidas en acuicultura y pesca	2
1.2 Diversificación de especies en acuicultura.....	3
1.3 Técnicas de acuicultura integrada.....	4
2. Los pepinos de mar	5
2.1 Descripción taxonómica	5
2.2 Descripción biológica.....	6
2.3 Distribución y ecología	10
3. Usos de los pepinos de mar	11
3.1 Uso como alimento	11
3.2 Uso ornamental.....	12
3.3 Uso medicinal	12
4. Compuestos bioactivos del medio natural marino	13
4.1 El cáncer: un problema de salud pública. Metabolitos anticancerígenos de origen marino.....	15
4.2 Enfermedades bacterianas en humanos y acuicultura.....	18
5. El Filo Echinodermata: compuestos bioactivos procedentes de la clase Holothuroidea.	19
6. Ensayos requeridos para la creación de fármacos.....	20
Objetivos.....	22
Material y métodos	23
1. Obtención de muestras.....	23
1.1 Recolección de <i>Holothuria sanctori</i>	23

1.2 Obtención de túbulos de Cuvier.....	25
2. Sacrificio y procesado de <i>Holothuria sanctori</i>	26
3. Extracción química de compuestos.....	28
4. Ensayos de actividad biológica.....	30
4.1 Actividad antimicrobiana	30
4.2 Actividad frente a cultivos celulares	31
5. Estudio químico orientado a la identificación de compuestos bioactivos.....	34
5.1 Procedimientos cromatográficos	34
5.2 Resonancia magnética nuclear (RMN)	38
5.3 Ensayos de actividad anticancerígena.....	39
6. Análisis estadístico	39
Resultados	40
1. Obtención de biomasa	40
2. Pigmentos en las muestras tras la extracción química	41
3. Ensayos de actividad biológica.....	42
3.1 Actividad bacteriana.....	42
3.2. Análisis de la citotoxicidad frente a células SAF-1 y N2A.....	45
4. Compuestos bioactivos	51
4.1 Fraccionamiento del extracto de <i>n</i> -hexano de holoturias de biofiltro (HB)	51
4.2 Citotoxicidad frente a líneas tumorales	59
Discusión.....	63
1. Bacterias.....	64
2. Citotoxicidad frente a SAF-1 y N2A	67
3. Citotoxicidad frente a tumores	69
Conclusiones.....	76
Referencias	77
ANEXO I.....	89

Resumen

Los equinodermos son animales invertebrados exclusivamente marinos que han evolucionado en dicho ecosistema desde hace más de 600 millones. Los pepinos de mar u holoturias fueron descritos por primera vez en 1758 por Linnaeus y pertenecen al Phylum Echinodermata, a la clase Holothuroidea. Estos animales son organismos bentónicos que están expuestos a un gran número de agentes patógenos como bacterias, virus u hongos. Algunos de estos pueden causarles graves daños, por ello, es vital la producción de sustancias para combatirlos. Dichas sustancias son fuentes de productos naturales marinos (PNM) que son compuestos procedentes de organismos que habitan en el mar y desde hace décadas se han investigado como fármacos por su potencial frente a cáncer y enfermedades infecciosas. Aunque la mayoría de los fármacos proceden de recursos terrestres, la mayor variabilidad genética de organismos marinos hace que sean una mejor fuente de PNM. Actualmente hay más de 32.000 estudios que evidencian la actividad biológica de compuestos de holoturias, pero para hallar estas moléculas, el primer paso es testar los extractos. En este estudio se ha analizado la actividad biológica de extractos de pared corporal y túbulos de Cuvier de tres grupos de *Holothuria sanctori* (holoturias de cautividad, de biofiltro y silvestres) frente a bacterias patógenas en animales de acuicultura y humano y líneas celulares de tumores sólidos humanos ya que las infecciones bacterianas son la primera causa de pérdidas económicas en acuicultura, mientras que el cáncer es la segunda causa de muerte en humanos en el mundo. El amplio espectro de compuestos obtenidos de los pepinos de mar se ha llevado a cabo mediante extracciones químicas con *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol y agua. Algunos de estos extractos tuvieron actividad antimicrobiana frente a *Photobacterium damsela*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio anguillarum* y *Streptococcus agalactiae*. Dichos extractos con actividad positiva se probaron en células SAF-1 de *Sparus aurata* y N2A de ratón. Los extractos con actividad antimicrobiana y baja o nula citotoxicidad *in vitro* en cultivos celulares son candidatos potenciales para desarrollar fármacos frente a bacterias. Además, los extractos de diclorometano de HC (holoturias de cautividad) tuvieron gran actividad citotóxica frente a cinco líneas celulares tumorales: A549, HeLa, SW1573, T-47D y WiDr, con su máximo valor en cáncer de pulmón bronquio-alveolar SW1573, con una GI₅₀<0,625 µg/ml. Los extractos de diclorometano de HS (holoturias silvestres) y de metanol de HC y HS también mostraron cierta actividad frente a las anteriores células. Por último, se fraccionó en seis partes el extracto que produjo más mortalidad en células N2A, el de *n*-hexano de HB (holoturias de biofiltro), y la porción 6 del extracto resultó tener la mayor actividad frente a células de cáncer de mama humano (HBL-100) con una GI₅₀=2,7 µg/ml. De este mismo extracto se identificaron compuestos de la fracción 2 (un triglicérido de cadena larga con varias insaturaciones) y de la fracción 4 (colesterol y 24-metilcolesterol).

Palabras clave: Holoturias, *Holothuria sanctori*, bacteria, cáncer, fármaco y extracto

Abstract

Echinoderms are exclusively marine invertebrate animals that have evolved in this ecosystem for more than 600 million years. Sea cucumbers were first described by Linnaeus in 1758 and belong to the Phylum Echinodermata, from the class Holothuroidea. These animals are benthic organisms that are exposed to a lot of pathogenic agents such as bacteria, viruses or fungi. Some of these can be potentially harmful for echinoderms, therefore, the production of substances to combat them is vital. These can be source of natural marine products (NMP), compounds found in organisms that inhabit the sea and have been investigated for decades as drugs for their potential against cancer and infectious diseases. Although most drugs come from terrestrial resources, the greater genetic variability of marine organisms makes them an important source of NMP. There are currently more than 32,000 studies that demonstrate the biological activity of holothurian compounds, but to find these molecules, the first step is to test the extracts. In this study, the biological activity of extracts of body wall and Cuvier's tubules from three groups of *Holothuria sanctori* (captive, biofilter and wild) against pathogenic bacteria in aquaculture animals and humans, as well as in human solid tumor cell lines, has been analyzed, considering that bacterial infections are the first cause of economic losses in aquaculture, while cancer is the second cause of death in humans in the world. The wide spectrum of compounds obtained from sea cucumbers has been carried out by chemical extractions with *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanol and water. Some of these extracts had antimicrobial activity against *Photobacterium damsela*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio anguillarum* and *Streptococcus agalactiae*. These extracts with positive activity were tested on SAF-1 *Sparus aurata* and mouse N2A cells. Extracts with antimicrobial activity and low or no *in vitro* cytotoxicity in cell cultures are potential candidates to develop drugs against bacteria. In addition, the dichloromethane extracts of HC (captive holothuria) had great cytotoxic activity against five tumor cell lines: A549, HeLa, SW1573, T-47D and WiDr, with its highest value in bronchial-alveolar lung cancer, SW1573, with a GI₅₀<0.625 µg/ml. Dichloromethane extracts of HS (wild holothuria) and methanol extracts of HC and HS also showed some activity against the above cells. Finally, the extract with the highest mortality in N2A cells, the *n*-hexane extract from HB (biofilter holothuria), was divided into six parts, and portion 6 of the extract turned out to have the highest activity against human breast cancer cells (HBL-100) with a GI₅₀=2.7 µg/ml. From this extract, some compounds were identified, from fraction 2 (a long-chain triglyceride with various saturations) and from fraction 4 (cholesterol and 24-methylcholesterol).

Keywords: Holothurians, *Holothuria sanctori*, bacteria, cancer, drug and extract

Abreviaturas

ANOVA: Análisis de la varianza

BHIA: Agar de infusión cerebro-corazón

BHIB: caldo de infusión cerebro-corazón

CECT: Colección española de cultivos tipo

CLMP: Cromatografía de líquidos de media presión

DMSO: Dimetilsulfóxido

EM: Espectroscopía de masas

F1-6: Fracción 1-6

FBS: Suero fetal bovino.

GI50: Concentración de inhibición del crecimiento del 50%

HB: Holoturias de biofiltro

HC: Holoturias de cautivad

HS: Holoturias silvestres

L-15: medio de cultivo líquido Leibovitz's L-15

MIC: Concentración mínima inhibitoria

MTT: (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)

N: Novobiocina

O: Vibriostático O/129

PBS: Buffer de fosfato salino

PCTM: Parque Científico Tecnológico Marino

PNM: Productos naturales marinos

RMN: Resonancia magnética nuclear

RMN ¹³C: Resonancia magnética nuclear de carbono 13

RMN ¹H: Resonancia magnética nuclear de protón (¹H)

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RPMI: medio de cultivo líquido Roswell Park Memorial Institute

SPE: Extracción en fase sólida

SEC: Cromatografía de exclusión molecular

SABE: Servicio de Acuicultura y Biotecnología de Alta Especialización

SRB: Sulforhodamina B

TGI: Concentración de inhibición total del crecimiento

TLC: Cromatografía de capa fina

Lista de figuras

Figura 1. Producción mundial pesquera y acuícola desde 1950 hasta 2018.....	1
Figura 2. Producción mundial de organismos marinos de pesca y acuicultura de agua salada y dulce.....	2
Figura 3. Tendencias en la producción acuícola mundial: principales grupos de especies, 1980–2015.....	3
Figura 4. Especies producidas a nivel global en acuicultura ordenadas por grupos principales.....	4
Figura 5. Ilustración esquemática de la acuicultura basada en el principio de complementariedad mejorada a través de interacciones tróficas entre especies combinadas.....	5
Figura 6. Morfología externa (A y B) de una holoturia (<i>H. sanctori</i>).....	7
Figura 7. Anatomía interna de una holoturia.....	9
Figura 8. Pepinos de mar secos: Bêche-de-mer.....	11
Figura 9. Manzana de mar o pepino manzana de mar (<i>Pseudocolochirus violaceus</i>) en acuario.....	12
Figura 10. Compuestos anticancerígenos derivados de PNM.....	17
Figura 11. Potencial biomédico de las saponinas (A) y actividades biológicas de compuestos aislados de equinodermos (B).....	19
Figura 12. Holoturias en cautividad. Se aprecian ejemplares en el fondo del tanque (A) y otros adheridos en las paredes (B) nutriéndose de desechos que produce el abalón que se encuentran en cestas.....	23
Figura 13. Holoturias en biofiltro. Se observa el biofiltro artificial en el que viven (A) así como numerosos ejemplares de <i>Holothuria sanctori</i> (B) en el fondo.....	24
Figura 14. Pepinos de mar extraídos del medio marino y transportados en nevera (A) a tanques de mantenimiento (B).....	25
Figura 15. Obtención de túbulos de Cuvier separados de agua.....	25

Figura 16. <i>Holothuria sanctori</i> antes de ser pesados.....	26
Figura 17. Proceso de sacrificio de <i>Holothuria sanctori</i>	27
Figura 18. Proceso de disección de <i>Holothuria sanctori</i>	27
Figura 19. Proceso de fraccionamiento de la pared corporal (A) y liofilización de la muestra (B).....	28
Figura 20. Cartucho de papel de filtro (A) con la muestra en polvo y recipientes donde se llevaron a cabo las extracciones químicas (B).....	29
Figura 21. Proceso completo de obtención de los extractos concentrados a partir de solventes sobre la muestra.....	30
Figura 22. Molécula del ensayo MTT en su forma oxidada y reducida.....	33
Figura 23. Columna de cromatografía de exclusión molecular de Sephadex LH-20.....	35
Figura 24. Cromatografía de capa fina. Se observa la fase estacionaria (A) y la cámara de vidrio (B) en la que se produce el arrastre de los compuestos por la fase móvil.....	37
Figura 25. Sistema de cromatografía de media presión.....	38
Figura 26. Producto obtenido de la extracción química de la muestra con diclorometano.....	42
Figura 27. Antibiograma de extractos de <i>Holothuria sanctori</i> frente a <i>Streptococcus agalactiae</i>	44
Figura 28. Antibiograma de extractos de <i>Holothuria sanctori</i> frente a <i>Vibrio alginolyticus</i>	45
Figura 29. Gráficas de citotoxicidad de los extractos de <i>n</i> -hexano (A), diclorometano (B), acetato de etilo (C), metanol (D) y agua (E) de <i>H. sanctori</i> en células SAF-1.....	47
Figura 30. Gráficas de citotoxicidad de los extractos de <i>n</i> -hexano (A), diclorometano (B), acetato de etilo (C) y metanol (D) de <i>H. sanctori</i> en células N2A.....	50
Figura 31. Columna cromatográfica de exclusión molecular Sephadex LH-20.....	51
Figura 32. Fracciones concentradas del extracto de <i>n</i> -hexano de HB.....	52

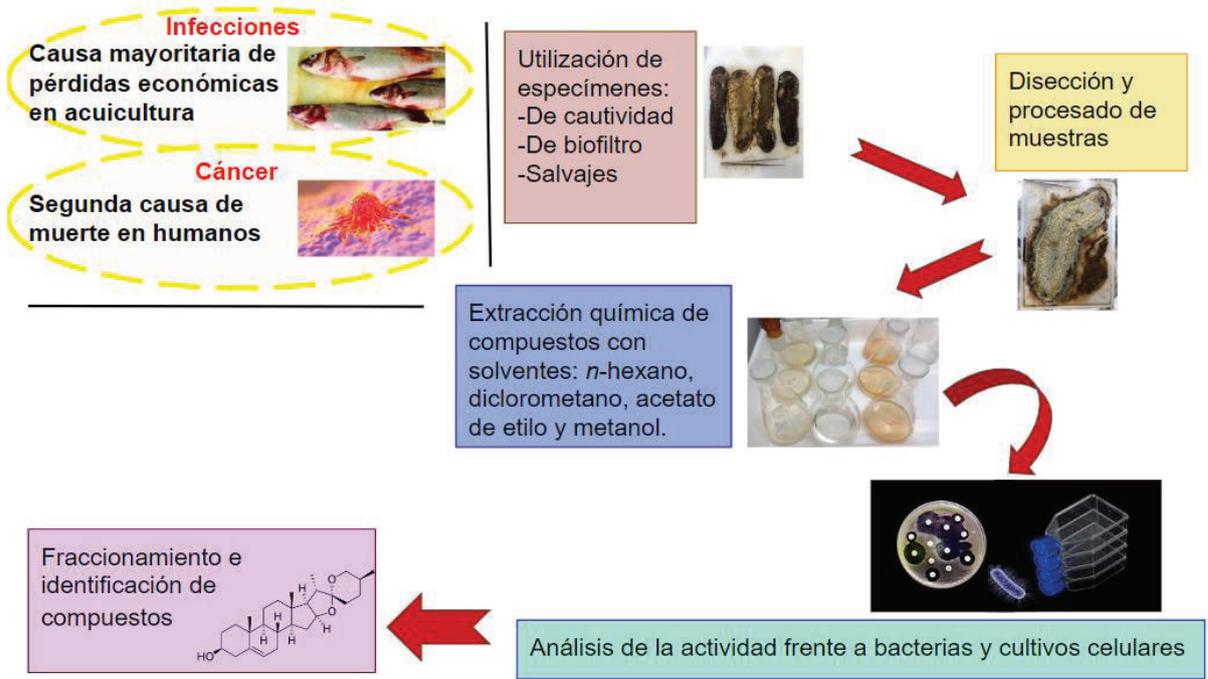
Figura 33. TLC de las 6 fracciones obtenidas del fraccionamiento del extracto de <i>n</i> -hexano de HB. (A) y (B) se diferencian en el tiempo de exposición a la fuente de calor.	52
Figura 34. TLC de las 7 fracciones obtenidas.....	53
Figura 35. TLC de F2 del extracto de <i>n</i> -hexano de HB con fase móvil <i>n</i> -hexano: acetato de etilo (95:5).....	54
Figura 36. TLC de F2 fragmentada con SPE y tres solventes: <i>n</i> -hexano (de 1 a 15), acetato de etilo (de 16 a 19) y metanol (de 19 a 21).....	54
Figura 37. TLC de la porción apolar de F2 en fase móvil con <i>n</i> -hexano: acetato de etilo 3:1 (A) y con <i>n</i> -hexano: acetato de etilo 95:5 (B).....	55
Figura 38. Espectro de RMN de ^1H de la F2, tubos 20-21-22 (CDCl_3 , 600 MHz, 298K).....	56
Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C de la F2, tubos 20-21-22 (CDCl_3 , 150 MHz, 298K).	57
Figura 40. Gráfica de citotoxicidad de la fracción 2 del extracto de <i>n</i> -hexano de HB de <i>H. sanctori</i> en células N2A.....	58
Figura 41. TLC del compuesto mayoritario detectado en F4.....	58
Figura 42. Espectro de RMN de ^1H de la F4 (CDCl_3 , 600 MHz, 298K).....	59
Figura 43. Datos de la citotoxicidad causada por las fracciones del extracto de <i>n</i> -hexano de HB en distintas líneas celulares tumorales, representados en gráfico de barras	60
Figura 44. Datos de la citotoxicidad medida con GI50 ($\mu\text{g/ml}$) producida por cada extracto de pared corporal y túbulos de Cuvier de <i>Holothuria sanctori</i> en distintas líneas celulares tumorales, representados en tabla de valores.....	61
Figura 45. Datos de la inhibición total del crecimiento medida con TGI ($\mu\text{g/ml}$) producida por cada extracto de pared corporal y túbulos de Cuvier de <i>Holothuria sanctori</i> en distintas líneas celulares tumorales, representados en gráfico de barras.....	62

Lista de tablas

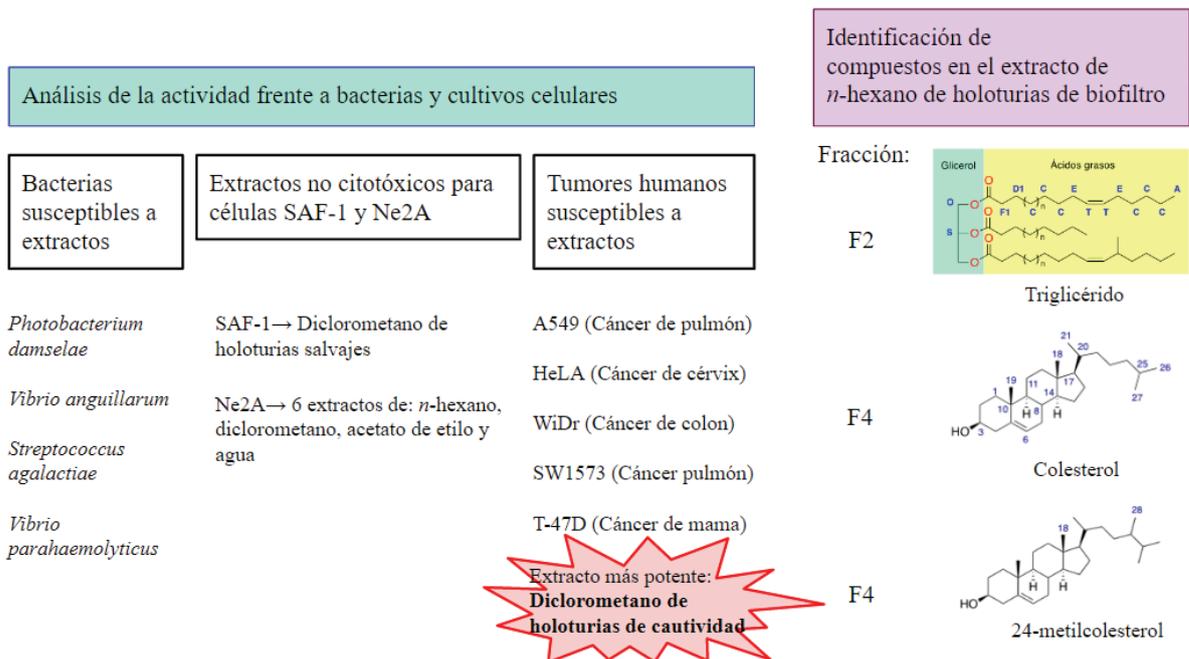
Tabla I. Compuestos aislados de holoturoideos y sus funciones biológicas.....	20
Tabla II. Tiempo experimental de evaporación de los solventes.....	29
Tabla III. Peso de muestras de pared corporal de <i>Holothuria sanctori</i>	40
Tabla IV. Peso de muestras de Túbulos de Cuvier de <i>Holothuria sanctori</i>	41
Tabla V. Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>H. sanctori</i> frente a bacterias que afectan a animales de acuicultura y humanos.	43
Tabla VI. Recopilación de extractos de distintas especies de la clase Holothuroidea y sus actividades biológicas.....	63
Tabla VII. Recopilación de extractos de distintas especies de la clase Holothuroidea frente a líneas tumorales de humanos.....	72

Graphical abstract

(I) Obtención de extractos de *H. sanctori* y análisis de su actividad



(II) Potencial biológico y composición de extractos de *H. sanctori*



Introducción

1. Panorama global de la acuicultura y pesca mundial

La agricultura lleva abasteciendo de alimento terrestre a humanos desde hace 5.000 años, mientras que los peces y otros alimentos de origen marino debían ser pescados del medio natural. Se conocen cultivos de algunas especies acuáticas desde hace 2.000 años, pero hasta el siglo X, la acuicultura no fue un recurso proteico suficiente en niveles de producción (Boyd *et al.*, 2022). Para lograr la nutrición y la seguridad alimentaria mundial, todas las personas necesitan tener acceso en todo momento a una provisión adecuada y absorción de nutrientes de alimentos para que puedan vivir una vida sana y activa. Eso implica disponibilidad de alimento, seguridad para comerlo, y capacidad económica de obtenerlo (Norman *et al.*, 2019).

Actualmente el océano se encuentra sobreexplotado por diversos factores, uno de ellos es la pesca intensiva. Costello *et al.*, (2020) proponen que la maricultura en combinación de medidas adecuadas de conservación del océano permitiría al océano proporcionar más proteína al humano (Boyd *et al.*, 2022). Se ha estimado que el aporte de la pesca y acuicultura en el consumo humano global de proteínas es del 17% (FAO, 2020a).

El desarrollo de la acuicultura se ha incrementado en gran medida en los últimos años debido a la creciente demanda mundial de pescado y otros alimentos provenientes del mar. Actualmente es el sector que más crece en la industria animal (Cao *et al.*, 2007). Del año 1950 al 1990 la mayoría de la producción de animales acuáticos para alimento se obtenían mediante pesca, pero esta tendencia creciente se paralizó a principios de los 90 (Fig. 1).

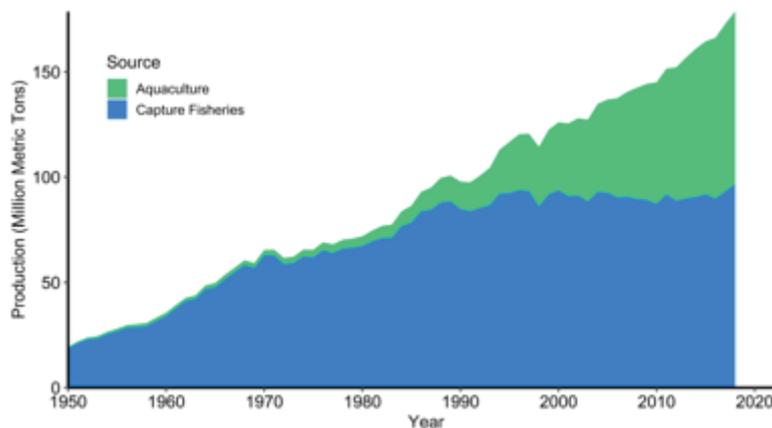


Figura 1. Producción mundial pesquera y acuícola desde 1950 hasta 2018 (FAO, 2020b).

A partir de este momento se incrementó la producción de organismos de acuicultura hasta que, en 2016, sobrepasó a la producción pesquera para consumo humano (FAO, 2020a). Además, se observa una gran direccionalidad ascendente en la producción acuícola hasta el año 2018, contribuyendo un 52% de la cosecha acuícola para consumo humano (FAO, 2020c).

Del total de capturas de especies acuáticas destinadas para consumo humano a lo largo de los años, la inmensa mayoría era de origen marino (Fig. 2). No obstante, se aprecia un lento pero constante incremento de la producción de capturas en aguas continentales. En cuanto a la producción acuícola para consumo humano, las especies marinas y continentales presentan datos similares, con un ligero predominio de las últimas (FAO, 2022).

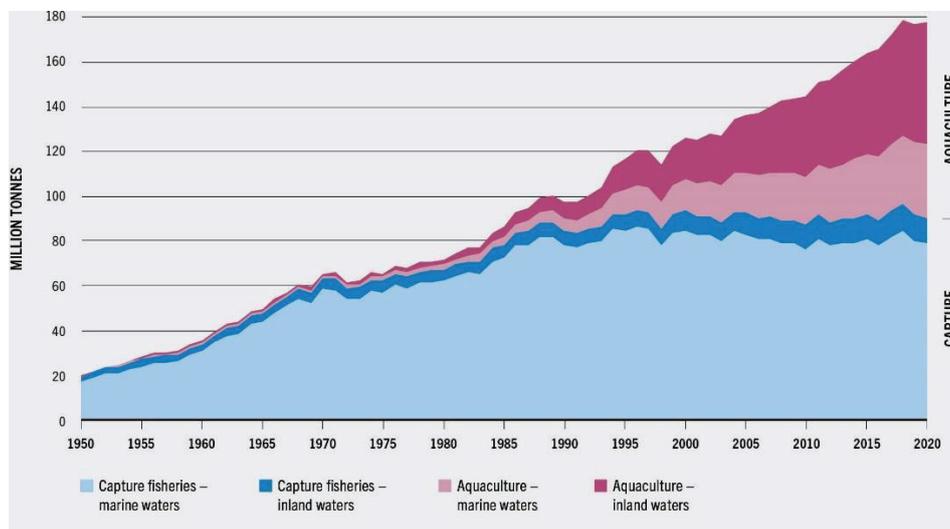


Figura 2. Producción mundial de organismos marinos de pesca y acuicultura de agua salada y dulce (FAO, 2022).

1.1 Especies producidas en acuicultura y pesca

En la producción de la acuicultura mundial se pueden diferenciar distintos grupos de especies (Fig. 3). Los grupos que más destacan hasta 2015, en términos de producción, son los peces de agua dulce (57%) seguidos de los moluscos (21%). Cabe destacar que ambos grupos tenían una contribución similar a la producción en 1980, pero a partir de la década de los 90, se disparó la producción acuícola de peces de agua dulce hasta duplicar la de moluscos. Los crustáceos tienen una aportación del 10%, mientras que los peces marinos todavía contribuyen menos del 5% de la cantidad global total en 2015 (FAO, 2017).

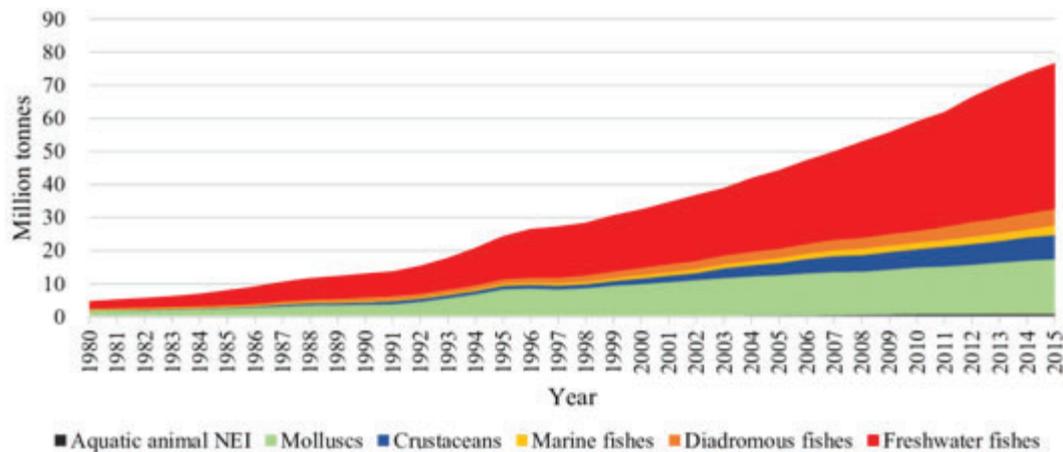


Figura 3. Tendencias en la producción acuícola mundial: principales grupos de especies, 1980–2015 (FAO, 2017)

Además, es interesante destacar, que, aunque los crustáceos y los peces de agua salada sean productos de alto valor económico, sólo representan un 24 y 6%, respectivamente, del valor total de la producción en 2015 (Subasinghe *et al.*, 2017). En términos de producción pesquera de animales marinos, los principales grupos son los pelágicos pequeños como arenques, sardinas, anchoas (22%), y pelágicos grandes como atunes y marlines (19%), aunque los peces demersales también tienen protagonismo (12%). El grupo que menos aportó a la producción pesquera marina en 2009 fue el de tiburones y rayas con un 1% (FAO, 2011).

1.2 Diversificación de especies en acuicultura

La diversificación de especies se plantea como una opción para lograr el desarrollo sostenible de la acuicultura para el futuro. La diversificación se puede abordar de muchas maneras, incluidos los sistemas de producción, mercados y especies criadas (Metian *et al.*, 2020). Además, se puede abordar a través de varios enfoques principales: aumentando el número de especies cultivadas, incrementando la uniformidad de las especies cultivadas y aumentando la diversidad dentro de las especies actualmente cultivadas mediante el desarrollo de nuevas cepas (FAO, 2016). En la siguiente tabla (Fig. 4) se muestra la variación en el número de especies de acuicultura cultivadas desde 1980 a 2017.

	1980	2000	2017
Fish	64	146	212
Crustaceans	13	28	30
Molluscs	25	53	65
Amphibians and Reptiles	3	3	3
Other invertebrates	0	0	2
Aquatic plants	9	8	20
Total	114	238	332

Figura 4. Especies producidas a nivel global en acuicultura ordenadas por grupos principales (FAO, 2019)

Se aprecia que el grupo que presenta mayor diversificación atendiendo al incremento del número de especies es el de los peces ya que aumenta de 64 a 212. La acuicultura de anfibios y reptiles no ha aumentado nada con el paso del tiempo ya que la cifra de especies sigue paralizada en 3. Sumando las especies de todos los grupos puede verse que casi hay tres veces más especies introducidas al cultivo en acuicultura en 2017 respecto a 1980 (FAO, 2019). Este fenómeno, en parte, es posible gracias a la capacidad de inducir desove en algunas especies, pero al no conocerse los métodos en todas las especies, es un tema sujeto a investigación. Esto fomenta que la acuicultura sea la práctica de cultivo más diversa del mundo en términos de número de especies, métodos de cultivo y ambientes utilizados (Metian *et al.*, 2020). La investigación en reproducción y nutrición en acuicultura ha hecho posible que actualmente haya cultivos de especies de rápido crecimiento como el medregal o cultivo de especies ornamentales con alto valor económico.

1.3 Técnicas de acuicultura integrada

Gracias a esta diversificación, se ha producido un notable avance en acuicultura, no sólo por la capacidad de cultivar nuevas especies, sino también la utilización de nuevos métodos de cultivo y entornos que permiten cultivar varias especies juntas. Hoy en día existen policultivos donde cohabitan más de una especie y son especialmente interesantes para aumentar la productividad (Kim *et al.*, 2022).

Se puede establecer una complementariedad de producción de especies sobre la base de interacciones multitroóficas, que implican una perspectiva integrada de agroacuicultura. Los desechos orgánicos de un sistema de cultivo sirven como fuente de alimentación para otro sistema con mayor integridad ecológica (Fig. 5), lo que aumenta el rendimiento de los sistemas de acuicultura (Kim *et al.*, 2022). A finales del siglo XX, la aplicación de prácticas de acuicultura integrada contribuyó a la mejora de la acuicultura

multitrófica integrada (IMTA) y la agricultura-acuicultura integrada (IAA) (Metian *et al.*, 2020).

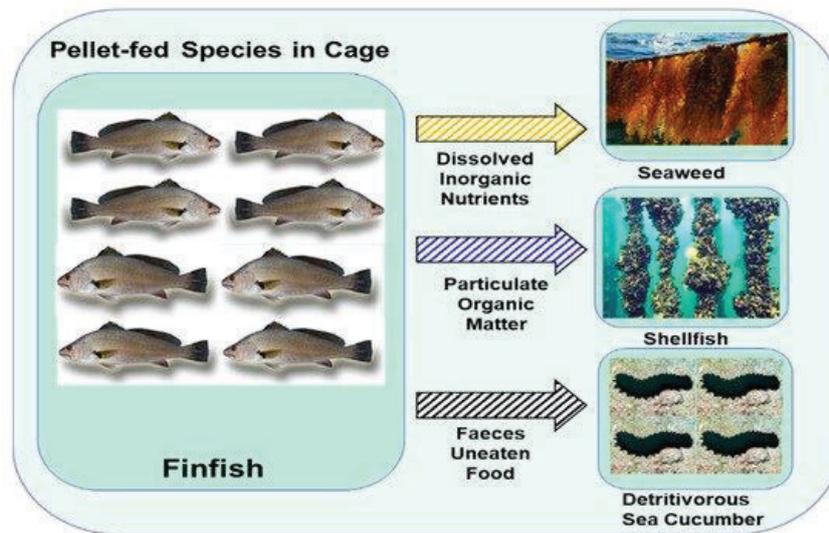


Figura 5. Ilustración esquemática de la acuicultura basada en el principio de complementariedad mejorada a través de interacciones tróficas entre especies combinadas (Kim *et al.*, 2022).

En IMTA, el flujo de agua apoya las interacciones multitróficas. Este principio permite la utilización de los desechos de un sistema acuícola como fuente de alimento para otro. Por ejemplo, las especies de peces se crían en base a la alimentación con alimentos formulados. Las especies extractivas de mariscos utilizan materia orgánica disuelta, y las algas marinas extraen el contenido inorgánico provenientes de heces y alimentos no ingeridos que consumen las especies detritívoras, como pueden ser los pepinos de mar (Kim *et al.*, 2022).

2. Los pepinos de mar

2.1 Descripción taxonómica

El filo Echinodermata (procedente del griego, “echinos” es espinoso y “derma” significa piel) incluye animales invertebrados exclusivamente marinos que viven en dicho ecosistema desde hace más de 600 millones de años. Está constituido por aproximadamente 7.000 especies y es el segundo mayor grupo de deuteróstomos (Romano *et al.*, 2022). Los equinodermos pueden dividirse en cinco clases: Echinoideos (erizos de mar), Holothuroideos (pepinos de mar), Crinoideos (plumas de mar), Asteroideos (estrellas de mar) y Ophiuroideos (ophiuros) (Pérez, 2014).

Los pepinos de mar u holoturias fueron descritos por primera vez en 1758 por Linnaeus. Su clasificación taxonómica inicialmente dependía de un criterio anatómico y morfológico, según si presentaba árboles respiratorios y pies en forma de tubos para desplazarse (Theel, 1886). Se propusieron otros criterios para la clasificación de estos invertebrados: por la forma de los elementos calcáreos que poseen en la dermis (osículos), o analizando sus tentáculos en cuanto a forma y número. A medida que avanzó el conocimiento de técnicas genéticas se consiguió establecer relaciones filogenéticas y consensuar la clasificación taxonómica (Uthicke *et al.*, 2010).

Las holoturias o pepinos de mar son animales invertebrados que pertenecen al Phylum Echinodermata, a la clase Holothuroiudea, la cual se divide en tres subclases: Dendrochirotaea, Aspidochirotaea y Apodacea. El sujeto de estudio pertenece al género *Holothuria*, y la especie es *Holothuria sanctori* (Borrero-Pérez *et al.*, 2010). El animal que se utiliza en el presente estudio posee la siguiente clasificación taxonómica:

Reino: Animalia

Filo: Echinodermata

Subfilo: Echinozoa

Clase: Holothuroidea

Subclase: Actinopoda

Orden: Holothuriida

Familia: Holothuriidae

Género: *Holothuria*

Especie: *Holothuria (Platyperona) sanctori*

2.2 Descripción biológica

Las holoturias presentan un cuerpo de forma cilíndrica y alargada, de ahí su nombre vulgar de pepino de mar. Su morfología y composición les confieren gran elasticidad y adaptación a diferentes formas según el espacio. El tamaño puede oscilar desde milímetros hasta 5 metros. Generalmente poseen simetría horizontal pentaradial (eje oral-aboral) y secundaria bilateral (dorso-ventral). La parte dorsal se denomina bivium (Fig. 6B, g) mientras que la parte ventral, denominada trívium (Fig. 6B, h), posee pedicelos, pies tubulares locomotores o podia locomotores para permitir el movimiento. Estos apéndices son expansiones de la pared corporal que forman tubitos que en el interior albergan una ramificación del sistema hidrovacular, y terminan en una estructura cóncava que actúa como ventosa. Las papilas han perdido esta ventosa terminal y su aspecto es tubular, quedando reducidas al ápice de una estructura de forma de cono. En la mayoría de holoturias, los podia ventrales aparecen como pedicelos mientras que los

dorsales son papilas. Alrededor de la boca (Fig. 6A, b) se aprecian tentáculos retráctiles (Fig. 6A, a) que se usan para recolectar comida y enviarla a la boca (González, 2012). El número y la forma de estos tentáculos varían según los hábitos alimenticios (Carney y Carey, 1982). Los tentáculos son una característica para discernir entre grupos de holoturias. La boca (Fig. 6A, b) y el ano (Fig. 6A, f) están en extremos opuestos del cuerpo.

Las espículas, también llamadas oscículos, depósitos o corpúsculos calcáreos y escleritos, se extienden por la dermis del cuerpo de los tentáculos, papilas, pies ambulacrales, así como el mesenterio y otras estructuras internas. Están compuestas de carbonato cálcico, en la forma de calcita mineral constituyendo un cristal unitario. Se diferencian en la forma dependiendo sobre la especie y zona estudiada de un individuo (González, 2012). Algunas especies como *H. sanctori* poseen papilas (Fig. 6A, e) con distribución aleatoria en la superficie dorsal del cuerpo.

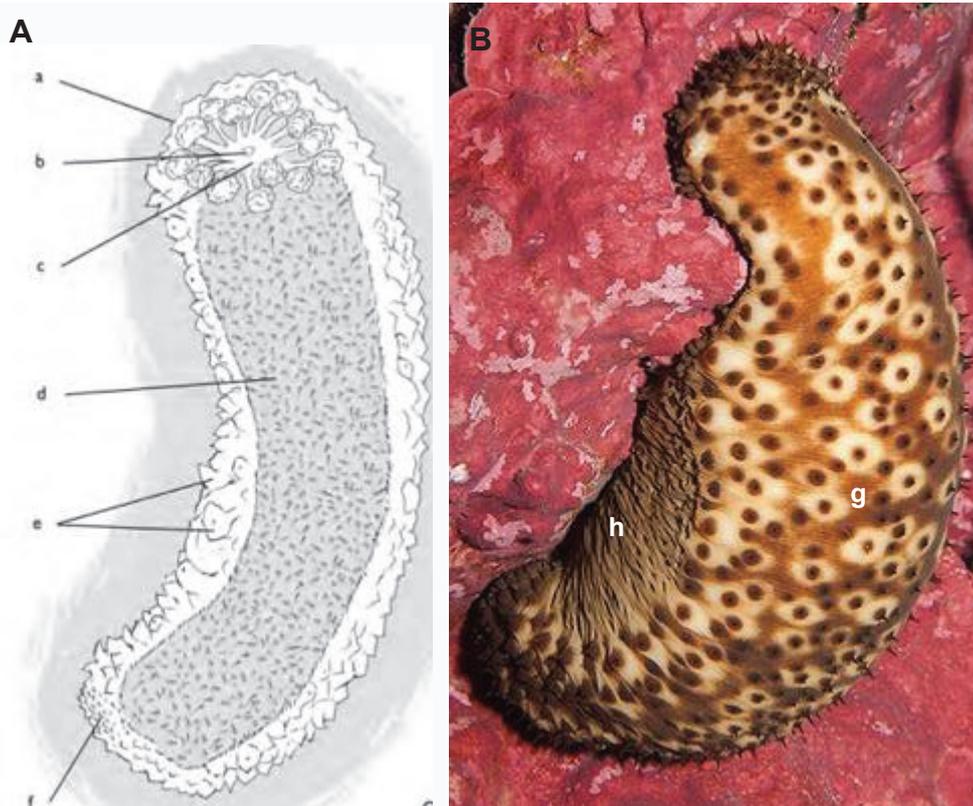


Figura 6. Morfología externa (A y B) de una holoturia (*H. sanctori*): a) tentáculo; b) boca; c) membrana bucal; d) suela ventral de pedicelos; e) papilas; f) ano; g) bivium; h) trivium (González, 2012) (A) y https://www.cibsub.cat/bioespecie_es-holothuria_sanctori-36771 (B).

La pared corporal tiene un grosor diferente según la especie, variando también su capacidad contráctil. La coloración de su cuerpo viene dada por la presencia de gránulos que poseen pigmentos. La superficie corporal está cubierta por una fina cutícula seguida de una capa de epidermis. Debajo de la epidermis se encuentra la dermis, compuesta por tejido conjuntivo laxo, que contiene la mayoría de las espículas y el plexo nervioso. A la capa dérmica le siguen los músculos circulares de fibras lisas y células largas y delgadas, y luego los músculos longitudinales que constituyen cinco bandas radiales anchas. La superficie interna del cuerpo está revestida por un peritoneo ciliado (González, 2012).

En su cavidad interior, las holoturias constan principalmente de tracto digestivo, gónadas y árboles respiratorios. Partiendo del extremo oral, lo primero que encontramos son los tentáculos (Fig. 7a) que protegen la boca, y si nos adentramos más al interior encontramos la faringe (Fig. 7c) que atraviesa el anillo calcáreo (Fig. 7k), formado de carbonato cálcico. Justo debajo se encuentra el anillo nervioso y las vesículas acuíferas que forman parte del sistema hidrovacular. Del anillo acuífero o canal anular (Fig. 7l), que rodea la faringe y está sustentado por el anillo calcáreo, salen dos tipos apéndices: las vesículas de Poli (Fig. 7e) (función de reservorio) y el canal pétreo (Fig. 7k) (función de unión) (González, 2012).

Más internamente se encuentra el esófago de corto tamaño al que le sigue el estómago (Fig. 7o) y posteriormente el intestino (Fig. 7h) de gran longitud, pero poco grosor y plegado dentro de la cavidad celómica, con dos tramos descendentes y uno ascendente entre ellos. La última parte del tracto digestivo es la cloaca (Fig. 7i), que es una expansión conectada con las paredes del interior por fibras musculares y tejido conjuntivo, que da paso al exterior por medio del ano (González, 2012).

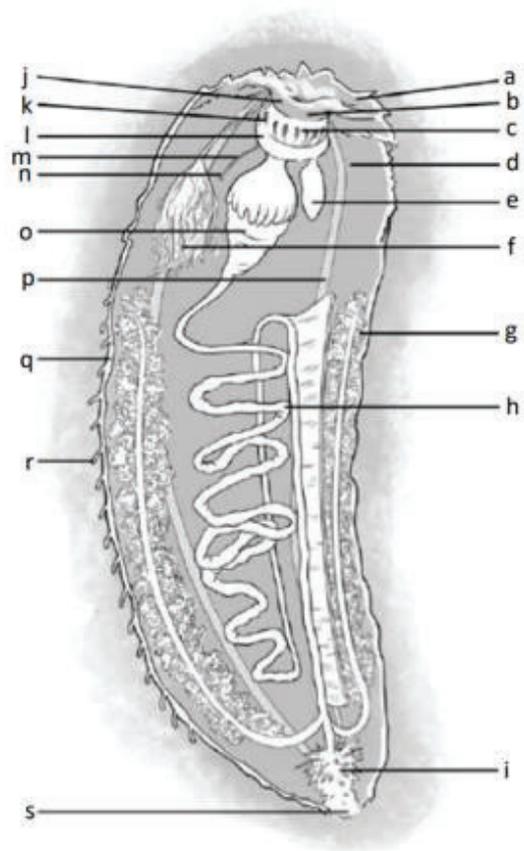


Figura 7. Anatomía interna de una holoturia: a) tentáculo; b) introvertido; c) faringe; d) músculos retrectores; e) vesícula de Poli; f) gónada; g) árbol respiratorio; h) intestino; i) cloaca; j) canal tentacular; k) anillo calcáreo; l) anillo acuífero; m) canal pétreo; n) madreporito; o) estómago; p) músculos longitudinales; q) canal radial; r) pedicelo; s) ano (González, 2012).

El tracto digestivo se sostiene por un mesenterio que a veces consta de tres fracciones: mesenterio dorsal (que soporta al esófago, estómago y una parte del intestino) izquierdo y ventral. En algunas especies, como *Holothuria sanctori*, aparecen unos órganos formados por tubos blanquecinos que pueden expulsar, situados próximos al ano. Estos órganos son los túbulos de Cuvier y son proyectados al exterior cuando el animal se siente amenazado. Al tocar el agua del medio, los túbulos se hacen sólidos y se agregan formando un entramado pegajoso que se adhiere con gran eficacia al posible predador o enemigo (González, 2012).

El sistema vascular del animal presenta un anillo hemal que rodea faringe, del cual parten ramificaciones que, junto a los canales acuíferos, van hacia los tentáculos y hacia el resto del cuerpo. Además, este sistema hemal consta de dos senos principales situados a lo largo del tubo digestivo. El sistema nervioso no consta de cerebro, pero posee un anillo nervioso en la membrana bucal. De este anillo sale un nervio ganglionado hacia el interior de cada tentáculo y un nervio radial hacia cada ambulacro pasando a través de los huecos del anillo calcáreo (González, 2012).

Aparentemente no existe un dimorfismo sexual claro en holoturias, ni hay hermafroditismo, son especies dioicas. Poseen sólo una gónada formada por uno o dos haces de tubos y expulsan los gametos por el gonoporo, próximo a la corona tentacular (González, 2012). Actualmente se ha cerrado el ciclo reproductivo de algunas especies de holoturias para criarlas en cautividad con fines culinarios. En Europa la primera especie en estudiarse para cultivar fue *Holothuria arguinenesis* (Domínguez-Godino *et al.*, 2015), y, de hecho, la primera empresa en comercializar este pepino de mar es llamada Guatizamar y se encuentra en Cádiz, España. Solo un estudio ha probado ensayos experimentales de cultivo de *Holothuria sanctori* (Abdelrazek, 2020), con resultados prometedores llegando hasta la fase de auricularia tardía, pero se requiere más investigación en este ámbito para optimizar los procesos larvarios y postlarvarios.

2.3 Distribución y ecología

Los pepinos de mar u holoturias se extienden prácticamente por todas las áreas del planeta, desde las aguas cálidas de las zonas tropicales, hasta los polos (Pérez-Ruzafa, 1984). Estos animales se pueden encontrar tanto en zonas a gran profundidad como en áreas poco profundas (Richmond *et al.* 1996). Dependiendo de la especie su distribución varía según sus hábitos. En cuanto al hábitat, es muy variado también. Hay algunas especies que viven en praderas de fanerógamas marinas como *Holothuria mammata*, que se puede encontrar en la isla de Gran Canaria. Otras especies como *Holothuria sanctori* prefieren vivir en cavidades o sobre rocas. También hay otras como *Holothuria tubulosa* que prefieren espacios más desprotegidos como lechos de fango o arena (González, 2012).

En Gran Canaria pueden encontrarse *Holothuria sanctori* (la especie más abundante), *Holothuria arguinenesis* y *Holothuria mammata*. Además, en las Islas Canarias se pueden encontrar otras especies más difíciles de ver en las zonas más occidentales, *Euapta lappa* y *Holothuria forskali* (Navarro *et al.*, 2013). En Canarias también se ha descrito la presencia de *Holothuria dakarensis* (Ruzafa *et al.*, 1992).

Ecológicamente son organismos muy importantes para el ecosistema ya que mejoran la productividad del ambiente marino. Las holoturias son detritívoras y su dieta se basa en materia orgánica, detritos y plancton (Roberts y Bryce, 1982). Esta eliminación de materia orgánica que contiene el sedimento, en comunidades bentónicas, promueve el reciclaje de nutrientes. También actúan como agentes de bioturbación mediante actividades de ingestión, defecación y desplazamiento (Uthicke, 2001; Slater y Carton, 2009). Así, fomentan el movimiento y oxigenación del suelo y evita la estratificación (Bakus, 1973; Richmond y Martínez, 1993).

3. Usos de los pepinos de mar

3.1 Uso como alimento

Económicamente son muy apreciados porque se usan como alimento, muchas especies de pepino de mar se cosechan y se secan comercialmente para consumo humano. Nutricionalmente, los pepinos de mar tienen un perfil bajo en grasas y alto en proteínas (Shi *et al.*, 2016), y, además, poseen sustancias fisiológicamente activas como vitaminas (A, C, B1, B2, B3), elementos traza (Magnesio, Hierro, Zinc y Calcio) polisacáridos (condroitín sulfato) y glucósidos de saponina (Graniel-Sabido *et al.*, 2016; Bordbar *et al.*, 2011).

Este preciado alimento en la cultura oriental se puede servir cocido, en escabeche o incluso crudo. Lo más usual es servir la parte de la pared del cuerpo, aunque también se consume los intestinos y gónadas en escabeche (González, 2012). La pared corporal comercializada como producto seco adquiere el nombre de “trepang” o “Bêche-de-mer” (Fig. 8). Este producto seco puede alcanzar valores económicos muy elevados de hasta 80-100 \$ por unidad y es conocido mundialmente. Según el país, este producto se conoce como, como “Hai-som” en China, “Namako” en Japón, “Haishen” en Tailandia y “Teripang” en Indonesia (Purcel *et al.*, 2012). Los intestinos fermentados reciben el nombre de “konowata” y la gonada seca es “kuchiko” (Stutterd y Williams, 2003).



Figura 8. Pepinos de mar secos: Bêche-de-mer (Stutterd y Williams, 2003).

En España el pepino de mar se consume en la costa este del País y en las Islas Baleares bajo el nombre de Espardeñas. Este alimento se vende en lonjas locales y puede alcanzar precios de 100-150 euros por kg. *Stichopus regalis* es la especie que más se consume en estas zonas (González, 2012).

3.2 Uso ornamental

Hay ciertas clases de holoturia que se usan en acuarios como especies ornamentales. Encontramos ciertas especies de la familia Cumaridae que destacan por su viva coloración: pepino de mar amarillo (*Colochirus robustus*), pepino de mar espinoso (*Colochirus quadrangularis*), manzana de mar (*Pseudocolochirus violaceus*) (Kumara *et al.*, 2013). Esta última especie, que es la que presenta una coloración más llamativa y sorprendente, posee el mayor valor económico en el mercado (Fig. 9) (Bugs *et al.*, 2003). Además, hay otras especies en el mercado ornamental como *Holothuria Hilla*, *Holothuria Edulis*, *Holothuria leucospilota* y *Holothuria atra* (Rhyne *et al.*, 2017; O'Hara y Byrne, 2017). Por último, algunos experimentos apuntan a que hay más especies que puedan adaptarse a la vida en acuario como *Holothuria tubulosa* (Bulteel *et al.*, 2020).



Figura 9. Manzana de mar o pepino manzana de mar (*Pseudocolochirus violaceus*) en acuario (https://www.aspasiadive.es/wp-content/uploads/2015/07/3.-IMG_8615.jpg).

3.3 Uso medicinal

También tienen un uso medicinal, particularmente en Asia, y se utilizan para tratar heridas, eccemas, artritis, hipertensión e impotencia. Además, es utilizado como afrodisíaco y para la producción de compuestos bioactivos (Esmat *et al.*, 2013). En China, las holoturias son un tónico para la salud, y se han usado en ancianos para combatir la debilidad, el estreñimiento y la micturia. Hay sustancias como el bálsamo de holoturia que se pueden encontrar en otros productos como aceite de linimento, que suelen utilizarse tópicamente para aliviar el dolor muscular y articular (Poh-Sze, 2004). Su utilización como remedio tradicional se registra desde la dinastía MING (1368-1644 AC) y su consumo se ha convertido en una costumbre local arraigada a la cultura china (Chen, 2004).

Los equinodermos, al ser organismos bentónicos, están expuestos a un gran número de agentes patógenos como bacterias, virus u hongos. Algunos de estos pueden causarles graves daños, por ello, es vital la producción de sustancias para combatirlos (Haug *et al.*, 2002). También pueden estar expuestos a diferentes tipos de estrés ecológico que los lleve a producir metabolitos. Como la competición por el espacio y comida, predación o el mantenimiento de sus superficies sin el fenómeno de fouling por parte de otros organismos (Ali y Tamilselvi, 2016).

Se han descrito actividades y propiedades biológicas y farmacológicas en muchas especies de holoturias, entre ellas, las de actuar como anticoagulante, anticancerígeno, antitrombótico, antimicrobiano, antioxidante, antihiperlipidémico, antihiper glucémico, antiinflamatorio, antihipertensivo y radioprotector (Bordbar *et al.*, 2011). Este potencial biológico proviene de extractos y metabolitos de los pepinos de mar. Los compuestos bioactivos que confieren los beneficios medicinales y propiedades biológicas son especialmente glucósidos triterpénicos, mucopolisacáridos ácidos, bases esfingoides, glucolípidos, condroitín sulfato fucosilado, polisacáridos, fosfolípidos y cerebrósidos (Shi *et al.*, 2016).

En resumen, al igual que otros organismos marinos interesantes, la explotación de las holoturias está creciendo de forma exponencial debido a sus útiles propiedades nutritivas, biológicas y farmacéuticas (Graniel-Sabido *et al.*, 2016).

4. Compuestos bioactivos del medio natural marino

Más del 70% de la superficie de nuestro planeta está cubierta por agua, y la gran mayoría de estos ecosistemas son marinos (Rotter *et al.*, 2022). Esto hace que más del 80% de todas las especies de animales y vegetales se encuentren en los océanos (Pérez, 2014). Dependiendo de la profundidad del medio marino algunos parámetros como la presión, temperatura, luz o salinidad pueden verse afectados, y con ello, varía el tipo de especies que habitan él (Rotter *et al.*, 2022). Los productos naturales marinos (PNM) son compuestos que proceden de organismos que habitan en el mar y desde hace décadas se han investigado como fármacos por su potencial frente a cáncer y enfermedades infecciosas. Aunque la mayoría de los fármacos proceden de recursos terrestres, la mayor variabilidad genética de organismos marinos hace que sean una mejor fuente de PNM (Romano *et al.*, 2022). Debido a las numerosas adaptaciones a diferentes factores ambientales, muchos animales y plantas son capaces de sintetizar metabolitos secundarios únicos, biopolímeros, compuestos bioactivos o enzimas (Khotimchenko, 2018). Estos

productos son muy importantes en la industria farmacéutica, cosmética y biomédica (Romano *et al.*, 2022).

La aparición de estos potenciales biológicos ha sido posible gracias al descubrimiento de compuestos bioactivos, generalmente mediante screening aleatorios. El primer compuesto biológicamente activo obtenido de un organismo marino vino con el aislamiento de C-nucleósidos: la espongouridina y la espongotimidina. Estos compuestos se descubrieron en la década de los 50 y procedían de una esponja caribeña, *Cryptotheca crypta* (Satheeshkumar *et al.*, 2010). Estos dos compuestos sirvieron como base para las posteriores moléculas análogas que se sintetizarían químicamente buscando actividad biológica (Pérez, 2014). De esta manera, se empezaron a sustituir los azúcares de estos nucleósidos (no reconocidos por sistemas biológicos) por radicales acíclicos o azúcares cíclicos manteniendo las bases nitrogenadas (Cragg y Newman, 2005). Así se obtuvieron compuestos como la azidotimidina (Retrovir®) o citarabina (Cytosar-U®) utilizados frente al VIH y tumores, respectivamente (Satheeshkumar *et al.*, 2010). La citarabina (Ara-C) fue el primer agente procedente del mar usado contra la leucemia mieloide aguda y el linfoma no Hodgkin y el fármaco antiviral Ara-A frente al Virus Herpes Simple (Gómez-Archila *et al.*, 2014).

El descubrimiento de la briostatina-1, un metabolito con actividad anticancerígena extraído del briozoo *Bugula neritina*, marcó inicio en la búsqueda de compuestos bioactivos de extractos animales marinos. Este compuesto se empezó a estudiar en México en 1968, y mediante cristalografía se logró averiguar su estructura química en 1982 (Pettit *et al.*, 1982).

En 1969, como parte de un programa de detección de actividad biológica en material vegetal y marino, se encontró que un extracto de etanol de organismo marino (*Ecteinascidia turbinata*) mostraba actividad anticancerígena (Cuevas y Franchesch, 2009). Este alcaloide procedente del tunicado caribeño producía su actividad anticancerígena mediante la unión al ADN de las células tumorales (Lind, 2008). En 1996, Harvard EJ Corey descubrió un método de producción sintética de la trabectedina ya que a partir del organismo el rendimiento era muy bajo. Después la empresa Pharmamar fue autorizada para su comercialización mediante un proceso semi sintético a partir de un antibiótico (Safracina B, obtenido de la fermentación de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*) siendo eficaz contra sarcoma de tejidos blandos y cáncer de ovarios. Actualmente se conoce con el nombre comercial de Yondelis® (González-Gallego, 2016).

Como consecuencia de estos descubrimientos y del desarrollo de técnicas de extracción y protocolos experimentales, la química de productos naturales marinos ha crecido de manera exponencial. En la actualidad existen más de 27.000 productos naturales que se han aislado e identificado de procedencia marina (Hu *et al.*, 2015; Khotimchenko, 2018).

4.1 El cáncer: un problema de salud pública. Metabolitos anticancerígenos de origen marino.

El cáncer es una enfermedad de carácter devastador cuya incidencia ha aumentado en las últimas décadas hasta ser, actualmente, la segunda causa de muerte en todo el mundo, por detrás de las enfermedades cardiovasculares (Falcón *et al.*, 2022). En 2018 los tipos de cáncer con mayor incidencia de los 18 millones diagnosticados fueron el de pulmón (2.09 millones de casos), mama (2.09 millones de casos), y próstata (1.28 millones de casos). Se estima que a partir de 2060 el cáncer sea la primera causa de muerte mundial (Mattiuzzi *et al.*, 2019). Según un estudio de 2020 con datos de la OMS de todo el mundo, el cáncer que más muertes causó en hombres fue el de pulmón (21,5%) y el de mama en mujeres (15,5%), y el orden de la incidencia de los tipos de cáncer no cambió respecto a 2018. Les siguieron en mortalidad el cáncer de hígado, estómago, cérvix uterino, próstata y colon (Ferlay *et al.*, 2021). La incidencia de cáncer de colon ha aumentado en países desarrollados, se estima que superará al cáncer cervical en 10-15 años (Urbute *et al.*, 2022).

Para comprender esta enfermedad, se debe saber que fisiológicamente nuestro organismo es capaz de producir células constantemente para un correcto funcionamiento de todos los órganos. Cuando una célula se daña o envejece, ésta debe reemplazarse o repararse para seguir cumpliendo su misión (Pérez, 2014). Durante el ciclo celular hay checkpoints o puntos de control para asegurar la integridad genómica y celular, como, por ejemplo, la proteína P54 que se encarga de funciones de reparación de ADN y apoptosis celular (Novales de la Puente, 2018). Pero cuando estos puntos de control fallan, estas células desgastadas pueden acumular mutaciones que afectarán a su proceso de división y crecimiento. Estos cambios en el ADN les pueden conferir una ventaja en la velocidad de crecimiento. Como consecuencia, se empiezan a producir células que el cuerpo no necesita, cuya acumulación causa tumores (Shomar *et al.*, 2022).

Hoy en día se utilizan muchas drogas para combatir el crecimiento descontrolado de células malignas cancerígenas, mediante mecanismos de acción como la inhibición de la síntesis de ADN o del ciclo celular. Pero un gran problema de esta patología, además

de la metástasis, es la resistencia y adaptación de las células malignas a fármacos que van dirigidos a una diana (Vasan *et al.*, 2019). Es por ello, que adquiere vital importancia encontrar nuevas moléculas capaces de vencer estas resistencias. Debido a su riqueza genética, los organismos marinos han sido una fuente de PNM en las últimas décadas y se han conseguido aislar compuestos anticancerígenos de ellos (Fig. 10).

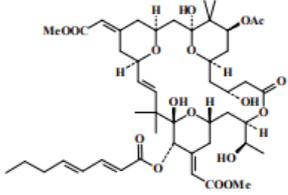
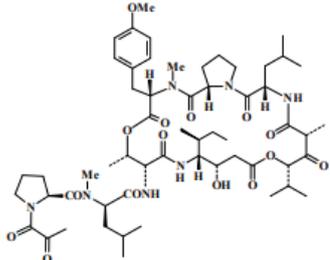
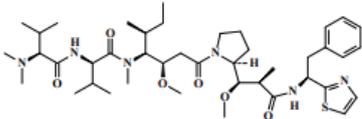
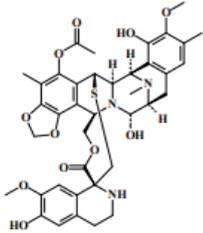
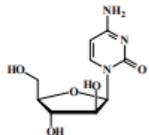
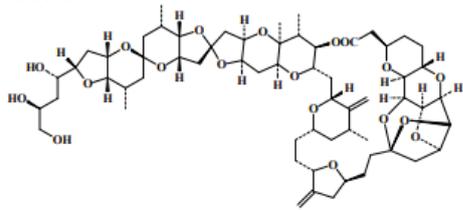
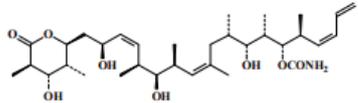
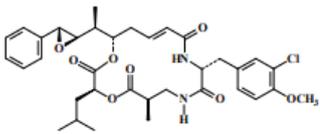
Compuesto	Mecanismo de acción	Fuente
Briostatina 1 	Activación de la proteína quinasa C (PKC)	Briozoo: <i>Bugula neritina</i>
Aplidina 	Inhibición de la progresión del ciclo celular	Ascidia: <i>Aplidium albicans</i>
Dolastatina 10 	Inhibición de microtúbulos y efectos pro-apoptóticos	Molusco marino: <i>Dolabella auriculata</i>
Ecteinascidina 743 	Alquilación del ADN	Tunicado: <i>Ecteinascidia turbinata</i>
Citarabina 	Inhibición de la síntesis del ADN	Esponja marina: <i>Cryptothethya cryta</i>
Halicondrina B 	Interacción con tubulina	Esponja: <i>Halicondra okadai</i>
Discodermolida 	Estabilización con tubulina	Esponja: <i>Discodermia dissoluta</i>
Criptoficina A 	Hiperfosforilación de Bel-2	Algas azules y verdes: <i>Nostoc sp.</i> Esponja: <i>Dysidea arenaria</i>

Figura 10. Compuestos anticancerígenos derivados de PNM (Pérez, 2014).

4.2 Enfermedades bacterianas en humanos y acuicultura.

Las enfermedades infecciosas eran la principal causa de muerte cuando no se conocían tratamientos antibacterianos, y lo siguen siendo en países subdesarrollados (Aties *et al.*, 2017). Algunos organismos bacterianos han desarrollado resistencia a fármacos como mecanismo de defensa, evitando la efectividad de estos (Santafé-Patiño *et al.*, 2021). La resistencia a fármacos no es una enfermedad, ya que no afecta a la patogénesis, sino un problema de limitación de opciones terapéuticas. Esto es producido, generalmente, por el uso excesivo de antibióticos en trastornos en los que no resultan beneficiosos o por un mal uso de ellos por parte del paciente. La evolución de las resistencias a fármacos es preocupante (Aties *et al.*, 2017).

Este hecho crea una necesidad de salud pública de explorar y producir más agentes antibacterianos naturales y efectivos, con buena biodisponibilidad y la menor toxicidad y efectos secundarios posible (Santafé-Patiño *et al.*, 2021). En este contexto, los productos obtenidos de organismos marinos constituyen una fuente idónea de recursos con potencial antimicrobiano para luchar contra infecciones (Cusimano *et al.*, 2019).

El crecimiento de la acuicultura en los últimos 50 años ha ido acompañado de la aparición de enfermedades de animales acuáticos, muchas de las cuales se han extendido hasta convertirse en pandemias en países o continentes. Un estudio que analizó 400 eventos de enfermedades en instalaciones acuícolas entre 2002 y 2017, reveló que, en más de la mitad de los casos, estaban causados por virus, aunque también bacterias, hongos y parásitos eran los causantes (Feist *et al.*, 2019). La alta densidad de individuos en algunas instalaciones acuícolas, así como el estrecho contacto entre especies salvajes con peces en jaulas en mar abierto, fomentan el contagio infeccioso (Pulkkinen *et al.*, 2010).

Las enfermedades infecciosas se consideran el mayor factor de pérdidas económicas en acuicultura en términos de producción, no solo por la muerte de los animales, sino también por la inversión en los tratamientos y la menor producción. Aunque algunos patógenos pueden producir el 90% de mortalidad de una producción acuícola, se estima que las pérdidas debidas sólo a la mortalidad rondan el 10% (Blanco *et al.*, 2004). Las enfermedades infecciosas pueden ser agravadas por un deterioro de la calidad del medio acuático, o por episodios de estrés o malnutrición de los animales. Estos factores pueden marcar la diferencia entre un animal portador y enfermo (Feist *et al.*, 2019).

5. El Filo Echinodermata: compuestos bioactivos procedentes de la clase Holothuroidea.

Las ceramidas glicosiladas y saponinas son los compuestos activos mayoritarios identificados en equinodermos, y según su naturaleza química, son glucoesfingolípidos y glicósidos de triterpeno, respectivamente. Han demostrado diversas actividades biológicas, siendo las mayoritarias la función anticancerígena y la antimicrobiana (Fig. 11B). Las saponinas (Fig. 11A) son el compuesto al que más propiedades biológicas se le atribuyen (Romano *et al.* 2022; Gomes *et al.*, 2016), desde antitumoral y antipatogénica hasta inmunoestimuladora. Se ha demostrado que la incubación de células inmunes con ciertas saponinas produce un flujo de iones de calcio al interior del citoplasma que aumenta la actividad fagocítica y lisosomal, incrementando la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que son vitales para el estallido oxidativo (Agafonova *et al.*, 2003).

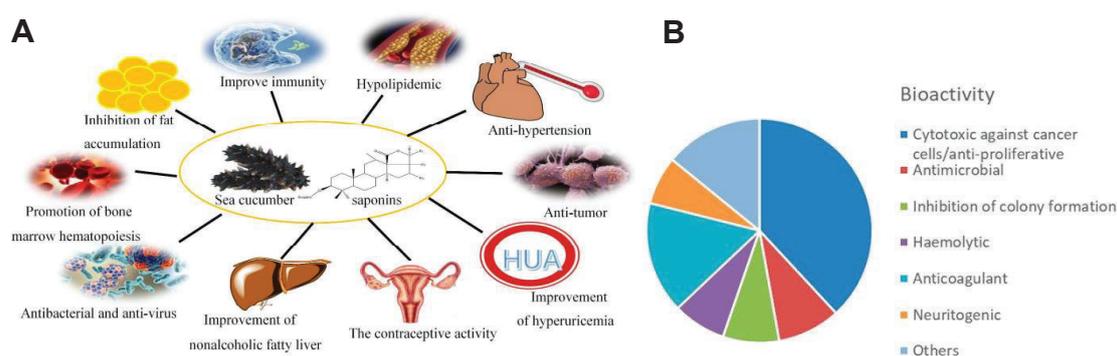


Figura 11. Potencial biomédico de las saponinas (Zhao *et al.*, 2018) (A) y actividades biológicas de compuestos aislados de equinodermos (Romano *et al.*, 2022) (B).

Las saponinas de erizos y estrellas de mar (asterosaponinas) no son iguales a las de pepinos de mar (holoturinas) (Pérez, 2014). Las saponinas son el único compuesto que se ha aislado e identificado hasta el momento en la especie *Holothuria sanctori*. Se conocen 20 saponinas en *H. sanctori*, 12 aisladas de la pared corporal y 8 descubiertas en túbulos de Cuvier. Las saponinas de esta especie tienen la peculiaridad de que todas son no sulfatadas, a diferencia del resto de equinodermos (Caulier *et al.*, 2016). En la Tabla I se muestran otros compuestos puros, además de saponinas, aislados e identificados de holoturinas a partir de extractos, sus actividades biológicas y su naturaleza química.

Tabla I. Compuestos aislados de holoturoideos y sus funciones biológicas (Kamyab *et al.*, 2020).

Clase de metabolito secundario	Ejemplo de compuesto bioactivo	Actividad biológica	Organismo productor
Glicósidos de triterpenos	Holoturinas (A-B)	Antifúngico, anticáncer, ictiotóxico	<i>Holothuria atra</i> , <i>Holothuria fuscocinerea</i>
Glicósidos de triterpenos	Equinósido A	Antifúngico,	<i>Actinopyga echinites</i>
Glicósidos de triterpenos	Holotoxina (A-F)	Antifúngico, anticáncer, antiprotozoos	<i>Apostichopus japonicus</i>
Glicósidos de triterpenos	Holotoxina	Antifúngico	<i>S. japonicus</i>
Polisacáridos	Glucosamina, galactosamina	Antihiperlipidémico, antioxidante	<i>A. japonicus</i>
Polisacáridos sulfatados	FucCS y GAGs	Anticoagulante, antitrombina, antiparasítico	<i>Ludwigothurea grisea</i>
Polisacáridos sulfatados	FucCs	Anticoagulante, antitrombina, antihiperlipidémico, antiviral	<i>Thelenota ananas</i> , <i>Cucumaria frondosa</i>
Polisacáridos sulfatados	FucCS	Anticoagulante, antiparasítico	<i>Isostichopus badionotus</i>
Polisacáridos sulfatados	GAGs	Antihiperlipidémico	<i>Metriatyla scabra</i>
Ácido graso	12-MTA	Anticáncer, antihiperlipidémico, antioxidante, antihiper glucémico	<i>C. frondosa</i> , <i>Stichopus japonicus</i>
Lípido	Cerebrósidos, galactocerebrósido	Anticáncer, antihiperlipidémico	<i>Stichopus variegatus</i> , <i>Acaudina molpadioides</i> , <i>Bohadschia argus</i>
Esfingolípido	Cerebrósido	Antioxidante	<i>S. japonicus</i> , <i>Acaudina molpadioides</i>
Lisofosfolípido	LPC, L-PAF	Antiinflamatorio	<i>Holothuria atra</i>
Péptido	Fenoloxidasa, lisozima	Antimicrobiano	<i>C. frondosa</i>
Péptido	Péptido inhibitorio de ACE	Antihipertensivo	<i>Acaudina molpadioides</i>
Péptido	Lectina	Antibacteriano	<i>Holothuria scabra</i>
Compuestos fenólicos	-	Antiinflamatorio	<i>S. japonicus</i>
Compuestos fenólicos	(Z)2,3-DPAN	Anticáncer	<i>Holothuria parva</i>
Pigmentos	Carotenoides	Antioxidante	<i>Holothuria atra</i>
Pigmentos	Equinenona, betacaroteno, cantaxantina	Antioxidante	<i>Plesiocolochirus minaeus</i>
Alqueno sulfatado	2,6-DMHS, OS, DS	Antifúngico, antibacteriano	<i>A. japonicus</i>
Mucopolisacárido	SJAMP	Antitumoral, inmunomodulador	<i>S. japonicus</i>
Glicolípido/esfingolípido	2,6-DMHS, OS, DS	Anticáncer	<i>A. japonicus</i>
Saponina	Frondanol A	Anticáncer	<i>C. frondosa</i>
Saponina	-	Antihiperlipidémico	<i>Pearsonothuria graeffei</i>
Glicósido de triterpeno monosulfatado	Cumasido	Radioprotector	<i>Cucumaria japonica</i>

6. Ensayos requeridos para la creación de fármacos

Actualmente hay más de 32.000 estudios que evidencian la actividad biológica de compuestos de holoturias, pero para hallar estas moléculas, el primer paso es testar los extractos (Kamyab *et al.*, 2022). Estos extractos son porciones de la muestra del animal sometida a extracciones químicas con distintos disolventes y poseen una cantidad considerable de moléculas de distinta polaridad. El siguiente paso en los estudios de bioprospección, es analizar la actividad de cada uno y elegir los extractos con actividad positiva. Finalmente se fraccionan dichos extractos para obtener diferentes porciones para que sea más fácil separar los compuestos individuales con el fin de identificar el bioactivo (García-Davis *et al.*, 2021). Estos compuestos pueden identificarse mediante la técnica Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y con Espectroscopía de Masas (EM) (Sun *et al.*, 2007).

Para crear fármacos anticancerígenos o antibacterianos de uso en humano, la molécula presuntamente bioactiva se tiene que probar primero *in vitro*. Después de observarse una actividad citotóxica o antibacteriana, tiene que pasar ensayos clínicos, que incluyen testarlo en animales de experimentación como ratones, y finalmente en humanos para poder ser comercializado. Para crear fármacos antibacterianos destinados a animales de acuicultura, es interesante que dicho compuesto no tenga citotoxicidad frente a un cultivo con células de dicho animal. El siguiente paso sería probarlo en un modelo *in vivo* del animal para asegurar que es una terapia segura y eficaz. En todos los casos es crucial que el fármaco tenga baja o nula toxicidad y una buena biodisponibilidad.

Por todo lo anteriormente comentado, adquiere vital importancia el desarrollo de investigación para la búsqueda de compuestos bioactivos que pueden ser muy útiles en el ámbito de la biotecnología y biomedicina, para curar enfermedades o luchar contra patógenos que afectan a animales de acuicultura o incluso a humanos. Actualmente la biotecnología marina está destinada al análisis de la actividad de compuestos extraídos de animales marinos. Este análisis de distintos extractos o metabolitos puede abarcar diferentes tipos de actividades biológicas. En el presente trabajo se ha llevado a cabo el estudio de la actividad de distintos extractos de pepino de mar (*Holothuria sanctori*) frente a ciertos tipos de bacterias patogénicas para peces y humanos y cultivos celulares de peces, ratones y tumores humanos.

Objetivos

El objetivo general del estudio es la obtención de extractos de pared corporal y túbulos de Cuvier de *Holothuria sanctori* y el posterior análisis de sus actividades biológicas. En consecuencia, se han considerado los siguientes objetivos específicos.

- Extracción química de compuestos de la pared corporal y túbulos de Cuvier con los solventes *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol.
- Análisis de la actividad de los distintos extractos frente a bacterias patógenas que afectan a especies de acuicultura y humanos.
- Análisis de la actividad de los distintos extractos frente a líneas celulares de pez, ratón y líneas tumorales de humano.
- Fraccionamiento e identificación de los compuestos mayoritarios en los extractos que presenten mayor actividad biológica.

Material y métodos

1. Obtención de muestras

1.1 Recolección de *Holothuria sanctori*

Para llevar a cabo los experimentos se emplearon tres grupos diferentes de individuos de *Holothuria Sanctori*. El primer grupo pertenece a una población de pepinos de mar que llevaba dos años en cautividad, pero inicialmente silvestres, viviendo en tanques con abalón (*Haliotis turberculata coccinea*), nutriéndose de sus desechos (Fig. 12A y 12B).



Figura 12. Holoturias en cautividad. Se aprecian ejemplares en el fondo del tanque (A) y otros adheridos en las paredes (B) nutriéndose de desechos que produce el abalón que se encuentran en cestas.

El grupo 2 está formado por pepinos de mar que fueron extraídos del biofiltro del Parque Científico Tecnológico Marino (Fig. 13A). Los individuos inicialmente eran silvestres, pero se introdujeron en el biofiltro hace dos años (Fig. 13B). Este dominio artificial cuenta con especies variadas del entorno marino y trata de imitar el ambiente natural.



Figura 13. Holoturias en biofiltro. Se observa el biofiltro artificial en el que viven (A) así como numerosos ejemplares de *Holothuria sanctori* (B) en el fondo.

Se recolectaron en una nevera con pañuelos húmedos para transportarlos a los tanques del centro donde permanecieron menos de dos días hasta el sacrificio.

El último grupo de pepinos de mar estaba compuesto por ejemplares silvestres que venían del medio marino. Fueron capturados a 2-3 metros de profundidad en el Puerto de Taliarte, Telde, Gran Canaria, España (27°59' 21.4"N 15°22' 12.9"W). Se utilizó una nevera portable (Fig. 14A) con paños húmedos para transportarlos a los tanques recibiendo flujo continuo de agua de mar. Aquí permanecieron menos de dos días hasta el sacrificio (Fig. 14B).



Figura 14. Pepino de mar extraídos del medio marino y transportados en nevera (A) a tanques de mantenimiento (B).

1.2 Obtención de túbulos de Cuvier.

Para extraer los túbulos de Cuvier, sustancia secretada por las holoturias como mecanismo de defensa, fue necesario estresar mecánicamente a los pepinos de mar. Cuando expulsaban este producto junto con agua de mar, se recogía en papel de aluminio y se pesaba en la báscula. Se debían obtener 10 g de cada grupo por triplicado, separándolo del agua. Posteriormente, los túbulos de Cuvier se introdujeron en botes de orina de 100 ml (Fig. 15) y se congelaron a -20°C . Cabe destacar que los pepinos de mar del biofiltro no produjeron este metabolito, posiblemente, por el estrés al que habían estado sometidos en los experimentos de reproducción de meses previos, en los que expulsaron gran cantidad de túbulos de Cuvier.



Figura 15. Obtención de túbulos de Cuvier separados de agua.

2. Sacrificio y procesado de *Holothuria sanctori*

Para tener repetibilidad y fiabilidad en los experimentos posteriores se hicieron triplicados de las muestras, donde cada triplicado estaba compuesto por más de un pepino de mar para representar mejor la población de cada grupo de individuos. Esto se llevó a cabo cogiendo 2 holoturias por triplicado, en el caso del grupo silvestre y del biofiltro, y 3-4 en caso de los de cautividad por su tamaño inferior y para obtener biomاسas similares en todos los triplicados. Se necesitaron unos 100 g por triplicado de peso eviscerado. Se pesaron dejándolos en paños secos durante 5 minutos para que expulsaran toda el agua que contenían (Fig. 16).



Figura 16. *Holothuria sanctori* antes de ser pesados.

Una vez separados los triplicados de cada grupo, se procedió a su sacrificio introduciendo los ejemplares en bolsas de plástico en el congelador a -20°C (Fig. 17). Se siguieron todas las pautas internacionales, nacionales y/o institucionales aplicables para el cuidado y uso de animales.



Figura 17. Proceso de sacrificio de *Holothuria sanctori*.

Previamente se lavaron con agua dulce para eliminar suciedad e impurezas de su superficie corporal. Después de unos días se descongelaron para comenzar con la disección. Los ejemplares se abrieron de boca a ano con bisturí y pinzas metálicas y se desecharon los órganos internos ya que sólo interesaba la pared corporal. La incisión se ejecutó muy lentamente debido a la alta flexibilidad del tejido en cuestión. Se muestra el cuerpo diseccionado de un ejemplar hembra con gónadas maduras anaranjadas (Fig. 18A) y un ejemplar con gónadas indeterminadas muy oscuras (González, 2012), que puede ser de un macho o una hembra (Fig. 18B). Además, se puede apreciar en ambos individuos el tubo digestivo de color marrón oscuro y alargado.

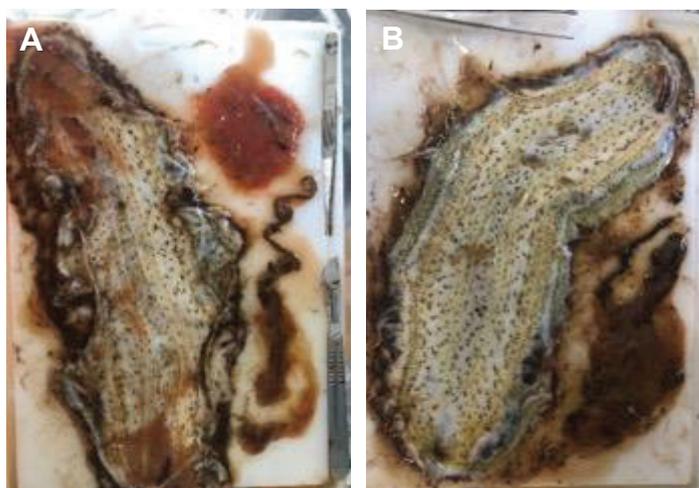


Figura 18. Proceso de disección de *Holothuria sanctori* (A y B).

Al eliminar todos los órganos se obtuvo una masa sin consistencia, que se cortó en trozos pequeños (Fig. 18A) con bisturí para facilitar la eliminación de agua en el proceso de liofilización. Se utilizó el liofilizador Telstar Cryodos (Fig. 19B), introduciendo los botes de orina con las muestras (tanto de pared corporal fraccionada como de túbulos de

Cuvier directamente), con agujeritos en la tapa, en el compartimento central del aparato. Después de 72 horas a -50°C y 0,1 mb, se recogieron las muestras de holoturia deshidratada. Los túbulos de Cuvier se deshidrataron en 48 horas.

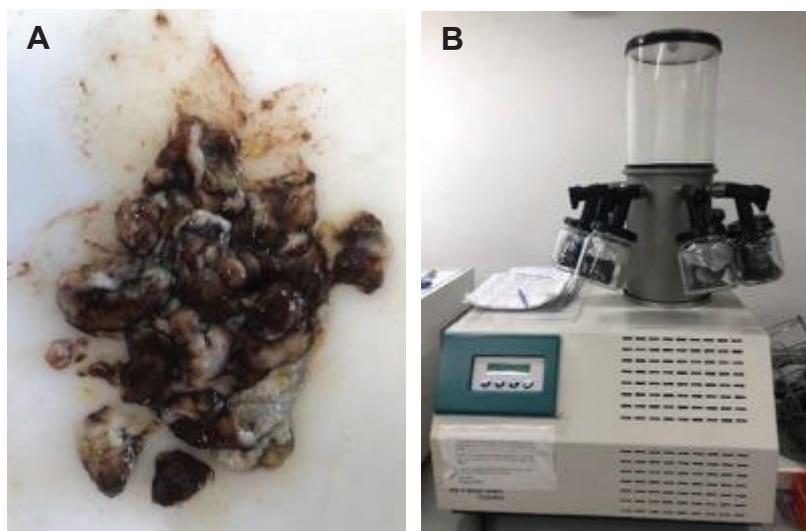


Figura 19. Proceso de fraccionamiento de la pared corporal (A) y liofilización de la muestra (B).

Para terminar de procesar estas muestras de pared corporal y túbulos de Cuvier, se extrajo el contenido de los botes de orina que tenía aspecto y textura de cartón y se convirtieron en polvo con una trituradora. Este polvo que contenía la totalidad de la muestra de los pepinos de mar fue almacenado de distintas bolsas de plástico etiquetadas en nevera a 4°C hasta los procesos posteriores.

3. Extracción química de compuestos.

Se utilizaron cuatro solventes orgánicos para obtener distintos extractos: *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol. En ellos, se encontraban compuestos con distintos grados de polaridad de las muestras de holoturias. Para llevar a cabo estas extracciones se introdujeron 5 g de cada tratamiento de holoturia en polvo en un sobre hecho con papel de filtro grapado (Fig. 20A). Este sobre se introdujo en un matraz Erlenmeyer de 250 ml (Fig. 20B), al que se le añadieron 100 ml de cada solvente y se taparon con papel de aluminio y parafina. Los solventes se aplicaron en orden del más apolar primero (*n*-hexano), al más polar (metanol) y cada solvente se dejaba actuar 24h en un agitador orbital. El proceso se repitió tres veces (con tres renovaciones de cada solvente), de forma que cada reactivo estuvo tres días extrayendo los compuestos de la muestra.

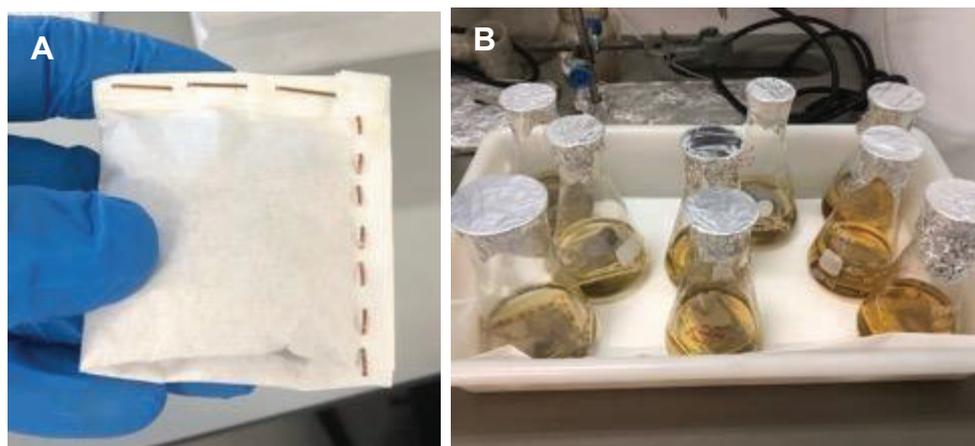


Figura 20. Cartucho de papel de filtro (A) con la muestra en polvo y recipientes donde se llevaron a cabo las extracciones químicas (B).

El contenido de cada extracción se acumulaba en otro matraz guardado en nevera hasta el tercer día, en el que los 300 ml de solvente de cada triplicado se llevaron a evaporar al rotavapor. El objetivo de este proceso era eliminar todo el solvente concentrando la muestra en un residuo sólido. Se ajustó la temperatura a 39°C y 270 revoluciones para todos los solventes, y el tiempo de evaporación del solvente dependía de su volatilidad (Tabla II).

Tabla II. Tiempo experimental de evaporación de los solventes.

	<i>n</i> -Hexano	Diclorometano	Acetato de etilo	Metanol
Tiempo (min)	17	12	40	35

Pasado este tiempo se recogió del rotavapor (Heidolph Laborota 4000 efficient) (Fig. 21A) los matraces esmerilados de fondo redondo con el extracto sólido en las paredes del recipiente (Fig. 21B). Para recuperarlo de dicho lugar se recogió añadiendo 10 ml del mismo solvente que se evaporó como se describió anteriormente, y se trasladaron a tubos de ensayo previamente pesados. El líquido de los tubos fue evaporado con nitrógeno gaseoso en una placa calefactora a 39°C en una campana de extracción (Fig. 21C). Cada tubo con el evaporado se pesó para conocer la cantidad de extracto de cada muestra (Fig. 21D) y se guardó en viales de vidrio con 1,5 ml de sus respectivos solventes (Fig. 21E). Se conservaron hasta su uso a -20°C.

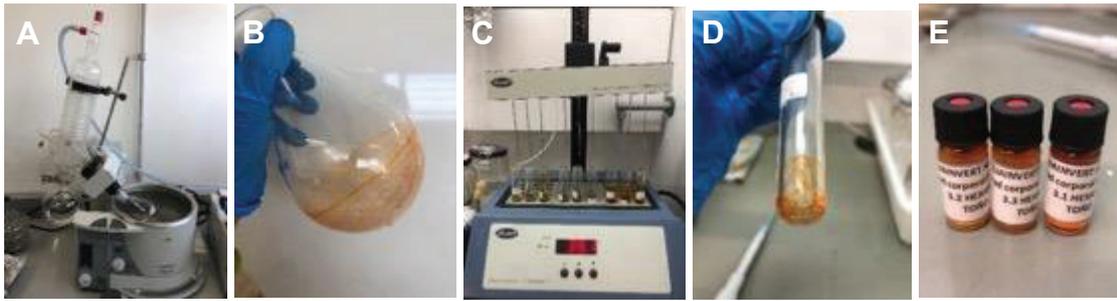


Figura 21. Proceso completo de obtención de los extractos concentrados a partir de solventes sobre la muestra.

Una vez recogido el extracto de metanol, quedó en el fondo del matraz una sal insoluble en metanol. Dicha sal se solubilizó en agua obteniendo un quinto extracto que denominamos extracto de agua.

4. Ensayos de actividad biológica

4.1 Actividad antimicrobiana

Descongelación y siembra de bacterias

El potencial biológico de los extractos se analizó frente a bacterias patógenas mediante antibiogramas. Para ello se sembraron siete bacterias en placas de 60 mm de medio Agar Infusión Cerebro Corazón (BHIA) suplementado con un 1% de NaCl. Para poder sembrarlas previamente se tuvieron que descongelar según su origen de congelación. Algunas bacterias se descongelaron de eppendorfs de 1,5 ml, en los que había 0,5 ml de bacterias con medio y 20% de glicerol, guardados a -80°C . Se descongelaron vertiendo el contenido del eppendorf en un tubo falcon estéril de 50 ml con 15 ml de medio fresco Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHIB), y acto seguido, con asa de siembra estéril, se inoculó un pequeño volumen que se esparcía por las placas con BHIA.

Cuando las bacterias no crecían correctamente por este método, se obtenían bacterias directamente del liófilo. Para ello, se añadió con una jeringuilla estéril 1 ml de agua destilada y filtrada dentro del vial que contenía bacterias liofilizadas. Después se inoculó una gota de cada bacteria en placas de medio BHIA + sal y se esparció mediante el asa de siembra estéril. Todas las bacterias se incubaron a 26°C . Las bacterias para este estudio fueron: *Photobacterium damsela* sbsp. *piscicida* B1, *Vibrio parahaemolyticus* CECT 5111, *Vibrio harveyi* 8120, *Vibrio anguillarum* 507, *Vibrio alginolyticus* 521, *Vibrio vulnificus* CECT 529 y *Streptococcus agalactiae* CECT 183. La fuente de las cepas bacterianas CECT es la Colección Española de Cultivos Tipo mientras que los

nombres sin dicha terminología proceden del laboratorio sanidad en acuicultura del Servicio de Acuicultura y Biotecnología de Alta Especialización (SABE).

Ensayos de actividad antimicrobiana

Después se hizo crecer cada bacteria a 26°C en placas de 150 mm de diámetro con medio BHIA + sal utilizando un bastoncillo estéril para repartir en toda la placa las bacterias sembradas anteriormente (frescas). Se añadieron 20 µl de cada extracto (dicho volumen equivale a 0,2 mg de extracto) en discos blancos de 6,4 mm que se dispusieron por toda la placa. Los extractos tenían una concentración final de 10 mg/ml. Como control negativo se puso 20 µl de buffer fosfato salino (PBS) y como control positivo se usaron antibióticos en disco: O/129 (marca CONDA) para los *Vibrios*, Novobiocina (Thermo Scientific™) para *Streptococcus agalactiae* y Enrofloxacino (SP Veterinaria, España) para *Photobacterium damsela*. Los discos antibióticos contenían 30 µg, excepto Enrofloxacino que estaba en una disolución a 10 mg/ml, por lo que se cogieron 3 µl de dicha disolución madre y se impregnó en un disco blanco.

Los extractos se consideraron positivos cuando creaban un halo de inhibición. Para analizar la actividad de los extractos frente a cada una de las bacterias, se midieron los halos de inhibición con el programa informático ImageJ. El valor de cada extracto fue la media aritmética de los tres triplicados. Como criterio para considerar un extracto con actividad positiva, el halo de inhibición debía ser claro, sin bacterias y de más de 1 cm de diámetro.

4.2 Actividad frente a cultivos celulares

Líneas celulares

-SAF-1: fibroblastos de aleta de *Sparus aurata*.

-N2A: neuroblastoma derivado de un tumor espontáneo en *Mus musculus*.

Mantenimiento y multiplicación de células

Para este estudio se hizo uso de dos líneas celulares: SAF-1 (fibroblastos de aleta de *Sparus aurata*) y N2A (neuroblastoma derivado de un tumor espontáneo en *Mus musculus*). Para ello se multiplicaban estas células cada dos días en medio L-15 y RPMI, respectivamente (ANEXO I). En el caso de las células SAF-1, para multiplicar se usó L-

15 con 5% de FBS, pero para los ensayos de citotoxicidad se utilizó L-15 con 2% de FBS ya que el objetivo no era que se multiplicaran, sino que se mantuvieran. El FBS previamente se filtraba con una jeringa y un filtro PVDF de 0,2 μm de Fisher Scientific. Ambos se suplementaron con un 1% de penicilina/estreptomicina y se incubaron a 26 °C. Con las células N2A, se utilizó para multiplicar RPMI con 10% de FBS, pero para los ensayos de citotoxicidad se usó RPMI con 5% de FBS para su mantenimiento. A estos dos medios se le añadieron 1% de piruvato, 1% de glutamina y 0,5% de penicilina/estreptomicina (filtrado todo previamente con la ayuda de una jeringa y filtro PVDF de 0,2 μm de Fisher Scientific y su temperatura de incubación fue 37°C con 5% de CO₂).

Para multiplicar las células era necesario despegar las células y pasarlas a un nuevo frasco. Se usaron frascos Nunc™ EasYFlask™ de poliestireno de Thermo Scientific™ de 75 cm². Esto se hacía vertiendo el contenido de medio líquido del frasco en el bote de descartes. Acto seguido, se añadía 1 ml de tripsina 1X hasta que se empezaban a despegar las células. Cuando esto ocurría, se vertía la tripsina en el descarte en caso de N2A, pero en las SAF-1 se dejaba ya que no presentaba toxicidad como para afectarles. Después era necesario dar golpes al bote para que las células se despegaran completamente para permitir su adhesión al nuevo frasco y fomentar su multiplicación. De cada frasco antiguo se obtenían tres nuevos con células añadiendo 15 ml de medio nuevo a cada frasco.

Ensayos de citotoxicidad

La cantidad y morfología de células se analizaron diariamente hasta tener un volumen celular suficiente para llevar a cabo los experimentos en las placas de 96 pocillos. Para contar las células que había en los frascos, se llevaba a cabo el mismo protocolo que para multiplicarlas, pero a las células ya despegadas, se les añadía un volumen conocido de su medio correspondiente y se pasaban a un falcon de 50 ml. En un Eppendorf de 1,5 ml se pipeteaba 200 μl de la solución celular anterior + 300 μl de PBS + 500 μl de solución Trypan Blue 0,4% de Sigma. La mezcla se dejaba reposar durante 5 minutos para que el colorante azul penetrara en las células muertas que posteriormente se dejarían fuera del conteo. Después se cargaba en una cámara de Neubauer 10 μl procedentes del Eppendorf y se contaban las células al microscopio para obtener el número de células por mililitro.

Se añadieron 200 microlitros de células en cada pocillo de la placa de 96 pocillos Nunclon™ de Thermo Scientific™ (menos en los exteriores). Este volumen era equivalente a 25.000 células en SAF-1 (Almeida *et al.*, 2019; Morcillo *et al.*, 2016) y

35.000 en N2A y es la cantidad ajustada experimentalmente para cubrir el fondo del pocillo de células pegadas. Debido a que no se habían hecho anteriormente ensayos de citotoxicidad con las SAF-1 se tuvo que hacer una prueba con la cantidad de células encontrada en la bibliografía y se observó que cubrían bien el fondo del pocillo. Las placas se dejaron 24h en la incubadora para que las células se pegaran en el fondo. Al día siguiente se usaron seis pocillos con células como control añadiendo 10 μ l de PBS.

Después se añadieron 10 μ l por triplicado de cantidades decrecientes de cada extracto, que iban desde 1.000 μ g hasta 7,81 μ g, mediante 7 diluciones 1:2 partiendo del extracto puro. Previamente todos los extractos se sonicaron 1 hora a 35°C para asegurar su homogenización. Se dejaron incubar las placas de ambas líneas celulares con los extractos durante 24 horas.

Pasado este tiempo se vertió el contenido líquido de las placas (ya que las células deberían quedar pegadas) y se incubó en una solución de 5mg/ml de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), 65 μ l por pocillo, para analizar viabilidad celular. El MTT (Fig. 22) es un colorante que es capaz de sufrir una reacción de reducción/oxidación cuando las células son viables. Esto es, porque si las deshidrogenasas mitocondriales de las células son funcionan correctamente (células vivas), el MTT que entra a la célula se reduce por el catalizador NAD(P)H y pasará de amarillo a morado. En especial actúa la succinato deshidrogenasa, pero también puede deberse a reductasas citosólicas o de otro compartimento subcelular NAD(P)H dependientes.

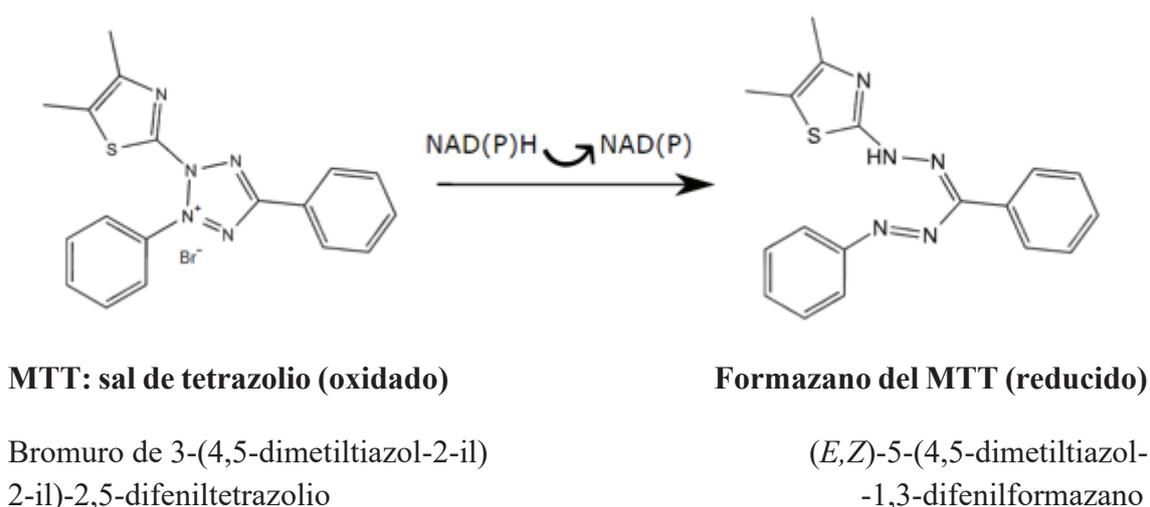


Figura 22. Molécula del ensayo MTT en su forma oxidada y reducida (Ghasemi *et al.*, 2021).

Pasados 15 minutos en la incubadora (26°C para SAF-1 y 37°C para N2A) se eliminó el MTT y se añadieron 65 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO) y las placas ya estaban

listas para su lectura en el espectrofotómetro. La adición del DMSO se hizo para lissar las células y que liberaran el MTT acumulado. Este MTT se disuelve en DMSO para permitir la medición de absorbancia a 570 nm. El viraje de color de amarillo a morado representaba actividad metabólica en las células y, por lo tanto, viabilidad celular, y se cuantificó mediante un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO). Posteriormente se hicieron curvas de viabilidad celular con los datos de absorbancia. Para calcular esta viabilidad se tomó el control como 100% de viabilidad celular. Para hallar la viabilidad de cada dilución de los extractos se multiplicó la media de los triplicados de las absorbancias por 100 y se dividió entre la media de las absorbancias del control.

5. Estudio químico orientado a la identificación de compuestos bioactivos

5.1 Procedimientos cromatográficos

Para este proceso se eligió el extracto que mostró mayor actividad citotóxica en células N2A, es decir, el extracto de *n*-hexano del grupo de holoturias de biofiltro (HB), que redujo la viabilidad celular casi al 100%. La importancia de escoger un extracto con capacidad inhibitoria de crecimiento es de especial importancia para células de naturaleza cancerígena, por ello se quiso averiguar si los compuestos que causaban la muerte de las células N2A también tenían potencial anticancerígeno frente a las células tumorales humanas a las que se expondrían. El objetivo de este proceso es cromatografiar el extracto en diferentes fracciones para identificar las porciones activas del extracto y, posteriormente, los compuestos bioactivos. También se eligió este extracto para fraccionar debido a su carácter apolar que facilitaría los procesos cromatográficos posteriores. Para ello se partió de una muestra de extracto de *n*-hexano de HB de 353 g (extrayendo químicamente el resto de material biológico disponible). El extracto se resuspendió en una mezcla de diclorometano/metanol/*n*-hexano en proporciones 1:1:2 y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min, para eliminar posibles partículas insolubles en el disolvente de elución. Este proceso se repitió dos veces para recuperar el máximo extracto de la fracción insoluble. Tras el proceso de centrifugación, la muestra se redujo a 143 g por la eliminación de sales y residuos insolubles en la mezcla seleccionada para el procedimiento cromatográfico.

Para identificar los compuestos presentes en los extractos se han realizados diferentes tipos de cromatografías que permitieron aislar moléculas según su tamaño molecular y polaridad. Primero se utilizó una cromatografía de exclusión molecular (SEC) para separar el extracto en fracciones según su tamaño molecular, en segundo lugar, se realizó una extracción en fase sólida (SPE) para clarificar la muestra y separar

los compuestos apolares de los más polares. Finalmente se realizó una cromatografía líquida de media presión (CLMP) para retener los compuestos polares y obtener los apolares. De forma complementaria después de cada extracción o cromatografía, se usaron cromatografías de capa fina (TLC) para identificar en qué tubos había compuestos y separarlos por polaridad.

5.1.1 Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

La muestra resultante (143 mg) se aplicó, a temperatura ambiente, en una columna cromatográfica de Sephadex® LH-20 (4 x 20 cm) como fase estacionaria. Sephadex® LH-20 es una resina reticulada de polímeros de dextrano que se utiliza con fases móviles de disolventes orgánicos para la separación de moléculas orgánicas en función del tamaño molecular. Se puede usar para separar esteroides, ácidos grasos, hormonas, vitaminas, etc. En este proceso de filtración en gel o exclusión molecular, salen primero las moléculas de mayor tamaño, mientras que las moléculas pequeñas se introducen en los poros de dextrano quedando retenidas, por lo que presentan un tiempo de elución mayor. En este caso se utilizó una mezcla con disolventes de diferente polaridad como fase móvil. La mezcla constaba de una relación 1:1:2 de diclorometano (250 ml), metanol (250 ml) y *n*-hexano (500 ml). Tras la aplicación del extracto activo en la columna (Fig. 23), se comenzó a recoger fracciones de 3-5 ml en tubos de ensayo de vidrio. Se recogieron 60 tubos que contenían el solvente de la fase móvil más los compuestos de la muestra inicial.

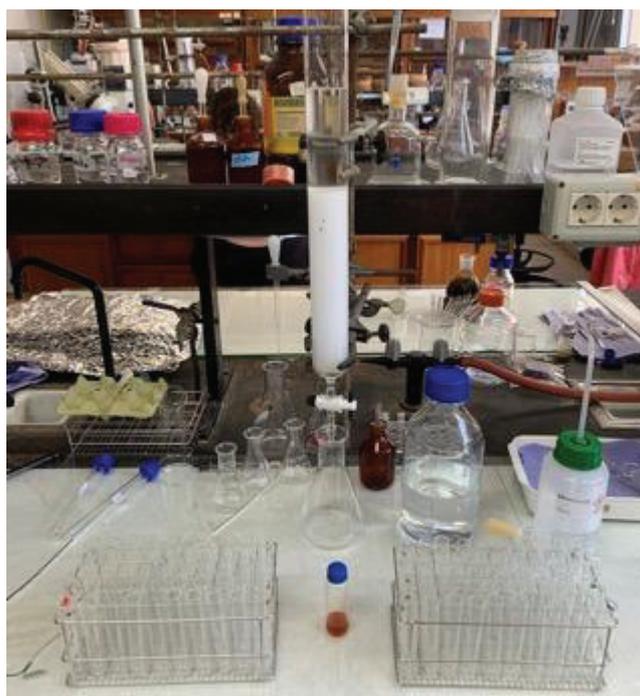


Figura 23. Columna de cromatografía de exclusión molecular de Sephadex LH-20. Se aprecia el vial con el extracto de *n*-hexano de HB antes de ser fraccionado y los tubos de ensayo donde se recogieron las 60 fracciones resultantes.

Las seis fracciones finales concentradas (F1-F6) se obtuvieron por combinación de todos los tubos de ensayo seleccionados para cada fracción. Las primeras fracciones contenían los compuestos de mayor tamaño molecular, por tener un tiempo de elución menor. Se concentraron en un rotavapor en balones de vidrio. Después, el residuo resultante fue recuperado en viales con diclorometano donde se volvieron a concentrar llevándolos a sequedad del mismo modo.

5.1.2 Extracción en fase sólida (SPE)

Es común usar este proceso antes de una cromatografía líquida de media presión, ya que su función es la clarificación de la muestra, reteniendo impurezas o compuestos indeseados que se quedan en el filtro. Este paso previo ayuda a separar los compuestos de la muestra, de modo que los compuestos de mayor polaridad se quedan retenidos en el gel de sílice por interacciones polares de puentes de hidrógeno, los apolares salen primero con el solvente orgánico. Se usó un cartucho de fase normal Sep-Pak® Light Silica de Waters. Para ello, se cargó el cartucho con la muestra mediante una jeringa de vidrio Hamilton. Se conectó a una bomba peristáltica (Ismatec, REGLO-CPF Analog). Se utilizó como fase móvil primero *n*-hexano, luego acetato de etilo, y, por último, metanol, y se recogieron las porciones obtenidas en tubos de vidrio hasta que ya no quedaba más muestra en el filtro. Este proceso se aplicó sólo en la fracción F2 del extracto de *n*-hexano de HB para separar la banda mayoritaria apolar de la polar. Las muestras se analizaron posteriormente en TLC.

5.1.3 Cromatografía líquida de media presión (CLMP)

Para esta cromatografía se utilizaron cartuchos pre-empaquetados de gel de sílice de la compañía Götec-Labortechnik GmbH. El objetivo de este proceso es retener los compuestos polares a la fase estacionaria de sílice, de manera que primero salgan los más apolares. Este proceso se aplicó sólo en la fracción F4 del extracto de *n*-hexano de HB.

Se cargó el cartucho con la muestra mediante una jeringa de vidrio Hamilton y se conectó a una bomba peristáltica. La bomba peristáltica mantiene constante el flujo del disolvente (Fig. 24). Se utilizó *n*-hexano como fase móvil, o bien, un gradiente de

polaridad creciente empezando por *n*-hexano 100%, *n*-hexano: acetato de etilo (98:2) hasta *n*-hexano: acetato de etilo (95:5), según los requerimientos de la muestra. Se recogieron porciones de 3 ml en tubos de vidrio en tandas de 60, y cada tubo se analizó individualmente mediante TLC.

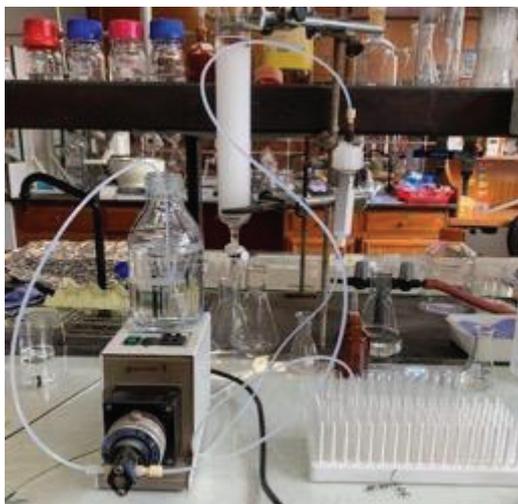


Figura 24. Sistema de cromatografía de media presión. Consta de una botella de vidrio que contiene la fase móvil, la bomba peristáltica y el cartucho con fase estacionaria de sílice. Las finas mangueras de teflón conectan todo el sistema y vierten el contenido eluido a los tubos de ensayo.

5.1.4 Cromatografía en capa fina (TLC)

El seguimiento del proceso cromatográfico en columna se monitorizó mediante cromatografía de capa fina (TLC, del inglés, Thin-Layer Chromatography). Este proceso requiere de una fase móvil o eluyente y una fase estacionaria (Fig. 25A), que es una fina capa de material adsorbente que recubre una superficie de placa inerte de aluminio. En este caso se emplearon cromatofolios de Silicagel 60 F₂₅₄ de la casa comercial Merck, que permiten la separación de los compuestos de una mezcla según su polaridad. Como fase móvil se utilizó *n*-hexano: acetato de etilo (de 100:0 y 95:5, según la polaridad de las bandas a que queríamos analizar).

Se aplicó una pequeña cantidad de cada fracción con ayuda de una pipeta Pasteur en un extremo de la placa (punto de aplicación), a continuación, la placa se colocó verticalmente en una cámara cerrada (Fig. 25B) conteniendo la fase móvil en cantidad suficiente para cubrir el fondo de la cámara, sin sobrepasar el punto de aplicación de las muestras (que quedaba en el extremo inferior). Por capilaridad, la fase móvil se desplaza hacia arriba arrastrando los componentes de la muestra que migran distancias variables

en función de sus afinidades diferenciales por las fases estacionaria y móvil. De esta forma, los compuestos más polares se quedan más cerca del punto de aplicación por interacciones de puentes de hidrógeno con el gel de sílice, mientras que los más apolares ascienden más arrastrados por la fase móvil mayoritariamente apolar.

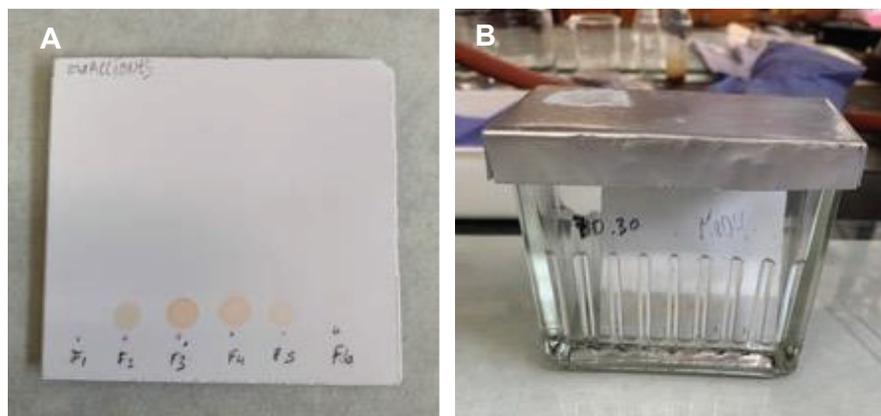


Figura 25. Cromatografía de capa fina. Se observa la fase estacionaria (A) y la cámara de vidrio (B) en la que se produce el arrastre de los compuestos por la fase móvil.

Cuando la fase móvil ha ascendido a través de la placa, ésta se retira de la cámara, se seca y se revela. Para el revelado, la placa fina se pulverizó con un reactivo de cloruro de cobalto al 2% en ácido sulfúrico al 10% y, acto seguido, se introdujo en la estufa para poder visualizar la composición de cada fracción. Todas las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular se analizaron de esta forma y se agruparon las fracciones con bandas parecidas, y, por lo tanto, compuestos similares.

5.2 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Para caracterizar químicamente los compuestos aislados en los distintos procesos cromatográficos se utilizó la técnica de RMN. Las muestras se disolvieron en 500 μL de cloroformo deuterado (CDCl_3) Sigma-Aldrich, empleado como patrón de referencia interno (δ_{H} 7.26 ppm, δ_{C} 77.0 ppm). Se obtuvieron espectros magnéticos ^1H y ^{13}C RMN, que indicaban las señales energéticas (desplazamiento químico) de los protones y carbonos de la molécula, respectivamente. De esta forma se pudo asignar cada señal de estos átomos a un grupo químico dentro del compuesto y construir o identificar la molécula. Se usaron espectrómetros BRUKER® AVANCE 500 MHz y 600 MHz. Los resultados se procesaron haciendo uso del programa informático MestReNova (Versión: 9.1.0-14011; Mestrelab Research, Santiago de Compostela, España).

5.3 Ensayos de actividad anticancerígena

La actividad antiproliferativa de todos los extractos de *H.sanctori* y de las fracciones del extracto cromatografiado de *n*-hexano de holoturias de biofiltro fueron analizadas frente a líneas celulares de cáncer humano en el BioLab, Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González, perteneciente a la Universidad de La Laguna. Este laboratorio llevo a cabo los experimentos calculando la viabilidad celular de cada extracto mediante ensayo con Sulforhodamina B (SRB). La SRB es un compuesto capaz de teñir proteínas de células cultivadas mediante la unión específica estequiométricamente a los aminoácidos básicos de las proteínas celulares. La medición por absorbancia del colorante unido proporciona una estimación de la masa proteica total relacionada con el número de células. El objetivo final fue obtener los valores de inhibición del 50% del crecimiento (GI50) de las células tumorales.

Los extractos orgánicos secos pesados se disolvieron en DMSO para preparar una solución madre de 50 mg/ml. Para evaluar la actividad antiproliferativa de las muestras, se seleccionaron las líneas celulares de cáncer A549 (adenocarcinoma de pulmón), HBL-100 (carcinoma de mama), HeLa (adenocarcinoma cervical), SW1573 (carcinoma pulmonar bronquiolo-alveolar), T-47D (carcinoma de conducto mamario invasivo) y WiDr (adenocarcinoma colorrectal). Las pruebas se realizaron en placas de 96 pocillos utilizando el ensayo SRB (Orellana y Kasinski, 2016) con las siguientes especificaciones. Las densidades de siembra celular fueron de 2500 células/pocillo para A549, HBL-100, HeLa y SW1573, y de 5000 células/pocillo para T-47D y WiDr. Los tiempos de incubación del fármaco fueron de 48 h. La densidad óptica de cada pocillo se midió a 530 (primario) y 620 (secundario) nm. La actividad antiproliferativa, expresada como inhibición del crecimiento del 50% (GI50), se calculó según las fórmulas del NCI (Monks *et al.*, 1991).

6. Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico IBM SPSS Statistics v26 para el estudio de normalidad y homocedasticidad de las muestras. La normalidad se evaluó mediante una prueba Saphiro-Wilk mientras que la homocedasticidad se analizó con una prueba de Levene. Análisis de la Varianza (ANOVA de un factor) se llevó a cabo para comparar la viabilidad celular de todas las diluciones de cada extracto respecto al control. Este análisis se usó para saber qué extractos tenían citotoxicidad frente a las células SAF-1 y N2A, y la cantidad de extracto a la cuál comenzaba a ser tóxico. Los datos mostraron diferencias significativas según los siguientes valores de P: *P < 0.0332, **P < 0.0021, ***P < 0.0002, ****P < 0.0001. Para la prueba ANOVA de un factor y los gráficos de las figuras se usó el programa GraphPad Prism 9.0.2.

Resultados

1. Obtención de biomasa

El peso de las holoturias antes del sacrificio (peso húmedo) iba disminuyendo con los procesos de disección (peso eviscerado) y liofilización-trituración (peso seco). En la Tabla III se recogen los datos de biomasa de cada grupo de holoturias después de cada paso del procesado de muestra:

Tabla III. Peso de muestras de pared corporal de *Holothuria sanctori*.

	Peso húmedo (g)	Peso eviscerado (g)	Peso seco (g)
1. Cautividad	547,31	474,12	47,94
2. Biofiltro	824,51	698	51,83
3. Silvestre	729,84	515,34	46,36

Con estos datos obtenidos podemos averiguar el porcentaje de peso que corresponde exclusivamente a pared corporal sin los órganos desechados tras la disección. Se obtuvo un porcentaje de masa corporal del 70,61% en el grupo silvestre y del 86,63% y 84,66% en el grupo de cautividad y biofiltro, respectivamente. Se aprecia que el grupo de holoturias silvestres tenía un menor porcentaje de masa corporal, y, por lo tanto, los órganos que se extrajeron representaban un porcentaje mayor de peso que en los otros dos grupos. Esto puede deberse a que los ejemplares del medio natural poseen órganos más desarrollados o grandes por su adaptación al entorno y condiciones ambientales cambiantes o más llenos por una mayor accesibilidad a recursos nutritivos en el medio natural.

Por otro lado, también se aprecia una gran reducción del peso seco respecto al peso eviscerado, lo que representa la pérdida de agua de las muestras. Las muestras del grupo silvestre pierden el 91,00% del peso tras la liofilización, el grupo de biofiltro el 92,57% y el de cautividad el 89,89%. En este caso, el grupo de biofiltro que es el que más porcentaje de agua pierde, es el que más agua contenía en su peso húmedo, y puede deberse a que eran ejemplares más grandes y acumulaban más agua por la proporción estructura corporal/espacio interno del animal. Finalmente, se obtuvieron muestras con aspecto de polvo para los experimentos posteriores, con un peso similar en los tres grupos. Según la bibliografía se necesitaría unos 15 g de peso seco de cada grupo (5g por

triplicado), y en todas las muestras de triplicado de pared corporal se obtuvieron más de 12 g.

En el caso de los túbulos de Cuvier se disponía de una cantidad mucho menor, y al retirar el agua de la muestra mediante el proceso de liofilización el peso disminuyó hasta cifras muy bajas (Tabla IV).

Tabla IV. Peso de muestras de Túbulos de Cuvier de *Holothuria sanctori*.

	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)
1. Cautividad	26,9	1,54
2. Biofiltro	-	-
3. Silvestre	27,6	2,26

Cabe destacar que no fue posible la extracción de túbulos de Cuvier de los ejemplares extraídos del biofiltro, probablemente, debido al estrés por la exposición a experimentos previos de fecundación, por lo que ya habían segregado muchos túbulos de Cuvier. Por ello, puede que su órgano de Cuvier no tuviera la capacidad de producir más secreciones, de manera que este metabolito solo se extrajo del grupo silvestre y cautividad.

Otro contratiempo de las muestras de túbulos de Cuvier fue la poca cantidad de peso seco que se obtuvo tras la liofilización. Esta cantidad era demasiado pequeña para las extracciones químicas ya que se necesitaban 15g (5g por triplicado). Al no tener suficiente, se siguió el proyecto sólo con las muestras de pared corporal, aunque se probó la extracción química del grupo silvestre de este metabolito de pepinos de mar y los posteriores ensayos de actividad biológica, asumiendo que no tenía replicabilidad, pero por curiosidad de los resultados.

2. Pigmentos en las muestras tras la extracción química

A la hora de las extracciones químicas con los distintos solventes se observó una peculiaridad. Al recoger los solventes el tercer día de haber estado extrayendo, el líquido de los tres triplicados del grupo de holoturias silvestres tenía un color mucho más intenso que el de cautividad o biofiltro (Fig. 26). El grupo de biofiltro (HB) tenía los extractos con los colores más tenues. Esto puede deberse a la distinta concentración de pigmentos y otros compuestos en los pepinos de mar debido a diferencias de alimentación en los diferentes entornos.

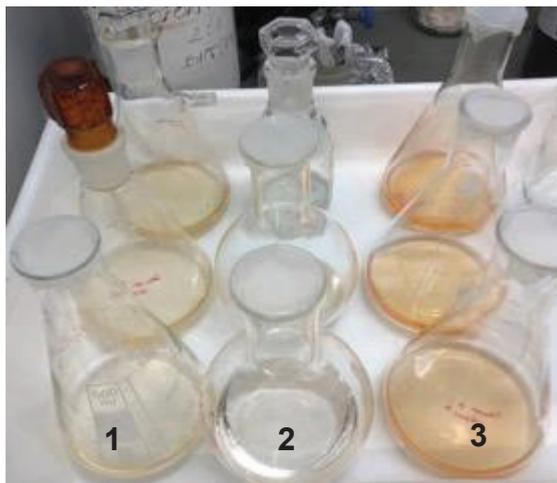


Figura 26. Producto obtenido de la extracción química de la muestra con diclorometano. Se indican con números (1-3) los grupos de holoturias según su procedencia: 1- holoturias de cautividad (HC), 2- holoturias de biofiltro (HB), 3- holoturias silvestres (HS). Cada columna de tres Erlenmeyer indica un grupo de holoturias con sus triplicados.

3. Ensayos de actividad biológica

Se pesaron todos los extractos evaporados y se obtuvieron miligramos suficientes para poder llevar a cabo los ensayos posteriores.

3.1 Actividad bacteriana

Para llevar a cabo los ensayos de actividad antibacteriana, se sembraron todas las cepas pertinentes y se colocaron los extractos en discos blancos en una placa Petri con 0,1 mg de extracto. La primera vez se tuvo que repetir porque la concentración de bacterias no era suficiente para llenar la placa, y había zonas donde había dudosas zonas de inhibición, por ello se añadió más cantidad de bacteria y se duplicó la del extracto. De esta forma se obtuvieron 15 extractos con halos de inhibición, lo que indica una actividad antibacteriana positiva.

Estos 15 extractos fueron tanto de pared corporal como de túbulos de Cuvier. Los cuatro extractos de los solventes orgánicos de túbulos de Cuvier tuvieron actividad en diferentes bacterias, pero por lo anteriormente comentado al no tener ni triplicados ni cantidad suficiente, quedan fuera del estudio ya que los resultados no tienen fiabilidad ni son totalmente representativos. Los otros 11 extractos que dieron actividad positiva pertenecen a muestras de pared corporal extraídas de: HS con *n*-hexano (3) y diclorometano (3); de HB con acetato de etilo (2) y agua (2) y de HC con metanol (1). La

actividad de inhibición de los extractos frente a diferentes bacterias se ve reflejada en la tabla V:

Tabla V. Actividad antimicrobiana de los extractos de *H. sanctori* frente a bacterias que afectan a animales de acuicultura y humanos. Se indican con números (1-3) los grupos de holoturias según su procedencia: 1- holoturias de cautividad (HC), 2- holoturias de biofiltro (HB), 3- holoturias silvestres (HS). Los símbolos + y – denotan actividad positiva y negativa, respectivamente. El diámetro de los halos de inhibición de los antibióticos está expresado en cm.

		<i>V. anguillarum</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>P. damsela</i>	<i>S. agalactiae</i>
<i>n</i> -Hexano	1	+	-	-	-	-	+	-
	2	+	-	-	-	+	+	+
	3	+	-	-	-	+	+	+
Diclorometano	1	+	-	-	-	-	+	-
	2	+	-	-	-	+	-	+
	3	+	-	-	-	+	+	+
Acetato de etilo	1	-	-	-	-	-	+	-
	3	-	-	-	-	-	+	-
Metanol	3	-	-	-	-	-	+	-
H ₂ O	1	+	-	-	-	-	-	+
	2	+	-	-	-	-	+	-
Antibiótico referencia		3,27	2,48	2,47	1,05	2,01	2,99	2,12

Como se aprecia en la tabla, hay cuatro bacterias cuyo crecimiento es inhibido por extractos de *H. sanctori*, siendo *Photobacterium damsela* la bacteria susceptible a más extractos (9). Los extractos de *n*-hexano y diclorometano son los que afectan a más bacterias, y, en especial, los de HB y HS (a cuatro bacterias). A pesar de haber varios extractos con actividad positiva frente a diferentes bacterias, ninguno de ellos formaba un halo del tamaño del antibiótico de referencia (N) que se puede observar en la Figura 27. Sin embargo, *Vibrio harveyi* 8120, *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio vulnificus* no se vieron afectados en absoluto por ningún extracto. Además, hay extractos que no aparecen en la tabla porque no produjeron inhibición del crecimiento de ninguna bacteria: acetato de etilo de HB, metanol de HC y HB y agua de HS.

A continuación, se muestra un ejemplo de bacteria susceptible a extractos como *Streptococcus agalactiae* (Fig.27), y resistente a todos los compuestos de los extractos como *Vibrio alginolyticus* (Fig. 28).

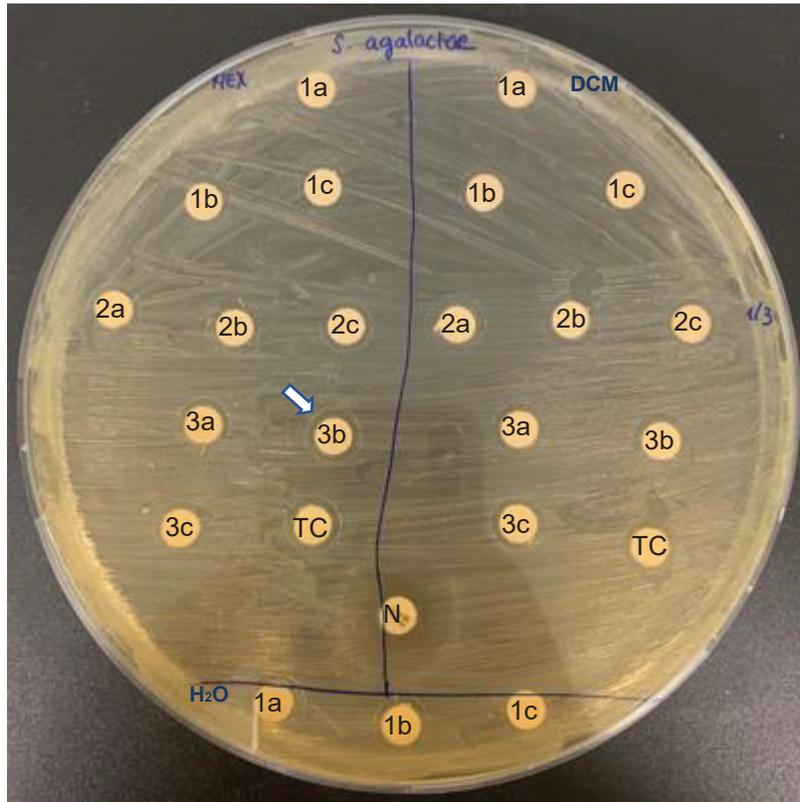


Figura 27. Antibiograma de extractos de *Holothuria sanctori* frente a *Streptococcus agalactiae*. En la izquierda de la placa se encuentran los extractos de *n*-hexano (HEX) y en la derecha los de diclorometano (DCM). Los tres de abajo pertenecen a extractos de agua. Se indican con números (1-3) los grupos de holoturias según su procedencia: 1- holoturias de cautividad (HC), 2- holoturias de biofiltro (HB), 3- holoturias silvestres (HS). Se denotan con a, b y c los distintos triplicados. La flecha blanca indica un halo de inhibición. TC son los extractos de túbulos de Cuvier de holoturias silvestres, y el disco central es el antibiótico de referencia, en este caso Novobiocina (N).

Según el criterio seguido, los extractos de *n*-hexano y diclorometano de HB y HS (grupo 2 y 3) junto al de agua de HC tienen los halos de inhibición del tamaño suficiente como para considerarse actividad positiva frente a *Streptococcus agalactiae*. La flecha blanca de la Fig. 27 marca un halo de inhibición bacteriana.

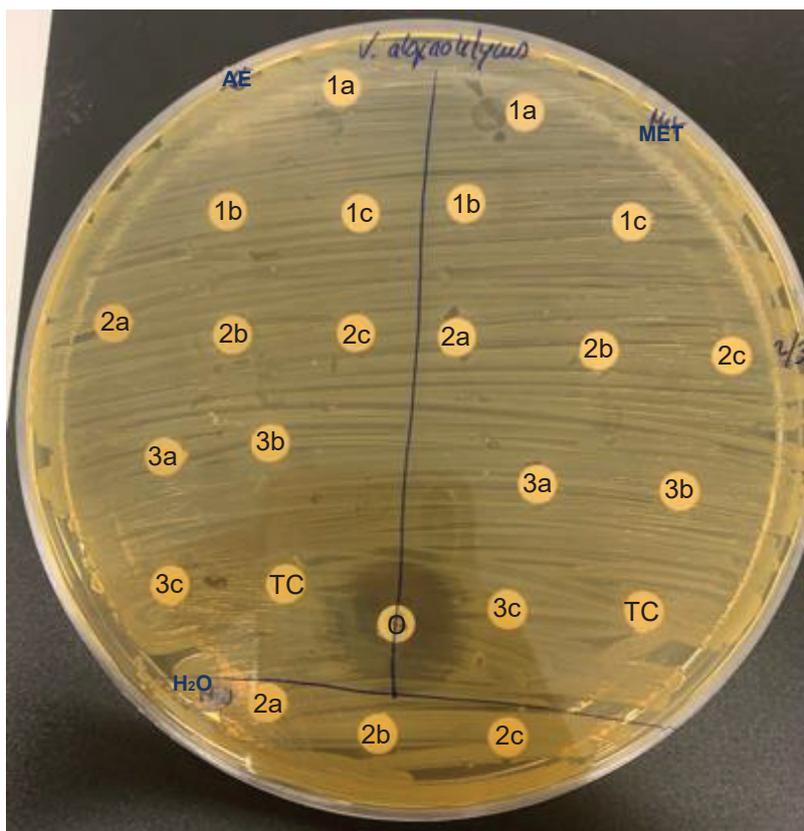


Figura 28. Antibiograma de extractos de *Holothuria sanctori* frente a *Vibrio alginolyticus*. En la izquierda de la placa se encuentran los extractos de acetato de etilo (AE) y en la derecha los de metanol (MET). Los tres de abajo pertenecen a extractos de agua. Se indican con números (1-3) los grupos de holoturias según su procedencia: 1- holoturias de cautividad (HC), 2- holoturias de biofiltro (HB), 3- holoturias silvestres (HS). Se denotan con a, b y c los distintos triplicados. TC son los extractos de túbulos de Cuvier de holoturias silvestres, y el disco central es el antibiótico de referencia, en este caso O/129 (O).

3.2. Análisis de la citotoxicidad frente a células SAF-1 y N2A

Después de encontrar extractos que lograban interrumpir el crecimiento de bacterias causantes de patologías de peces marinos y humanos, el próximo paso fue probarlos en cultivos celulares. Los que no produjeron actividad antimicrobiana, no se tuvieron en cuenta para este experimento. El objetivo de una terapia bacteriana es curar la infección sin causar citotoxicidad a las células receptoras, por ello se pretendía ver si dichos extractos que inhibieron el crecimiento de bacterias no eran perjudiciales para células aleta de dorada y de neurona de ratón (ya que es un mamífero como el humano).

3.2.1 Citotoxicidad en SAF-1

Los ensayos con MTT llevados a cabo, mostraron que varios extractos presentaban citotoxicidad celular, especialmente, en sus concentraciones más altas. El

proceso se estandarizó tomando el control como el 100% de viabilidad celular y se analizaron los datos de absorbancia para determinar el porcentaje de viabilidad con las siguientes cantidades de extracto por pocillo: 7,81 μg , 15,63 μg , 31,25 μg , 62,5 μg , 125 μg , 250 μg , 500 μg y 1000 μg .

En la Fig. 29 se muestran las gráficas de las viabilidades celulares reflejando los efectos citotóxicos que cada extracto de *H. sanctori* produce en las células SAF-1 respecto a un control sin extracto. Comparando los extractos de *n*-hexano de los tres grupos de holoturias (Fig. 29(I)A), observamos que el extracto del grupo 1 (HC) es el que empieza a tener citotoxicidad con significancia estadística respecto al control desde una menor cantidad de extracto (62,5 μg), seguido del grupo 2 (HB), pero en la máxima cantidad de extracto (1000 μg), la viabilidad producida por de extracto de HB (1,1%) es menor a la del de HC (12,4%). El grupo 3 (HS) posee la menor citotoxicidad, ya que hasta 500 μg no hay efectos significativos de muerte celular, por lo que es el extracto de *n*-hexano más adecuado para usar en una terapia para *Sparus aurata*.

En el caso de los extractos de diclorometano (Fig. 29(I)B) se aprecia que el grupo 1 y 2 (HC y HB) poseen citotoxicidad significativa respecto al control desde la primera dilución con 7,81 μg de extracto, lo cual no es adecuado para usar en terapia ya que podría causar efectos perjudiciales *in vivo* al animal. El extracto del grupo de holoturias silvestres (grupo 3), al no tener citotoxicidad en ninguna concentración, es el candidato perfecto para desarrollar un fármaco antimicrobiano. El extracto de acetato de etilo (Fig. 29(II)C) de HC es tóxico para las células en todas sus diluciones, mientras que el extracto de acetato de etilo del grupo 3 (HS) sólo tiene citotoxicidad significativa respecto al control en la dilución con más extracto (1000 μg). El único extracto de metanol (Fig. 29(II)D) que tuvo actividad antimicrobiana es el de HS y a partir de 500 μg presenta toxicidad en este cultivo de células SAF-1. De los dos extractos de agua (Fig. 29(II)E) con actividad antimicrobiana, solamente posee citotoxicidad significativa respecto al control en la dilución más concentrada (1000 μg).

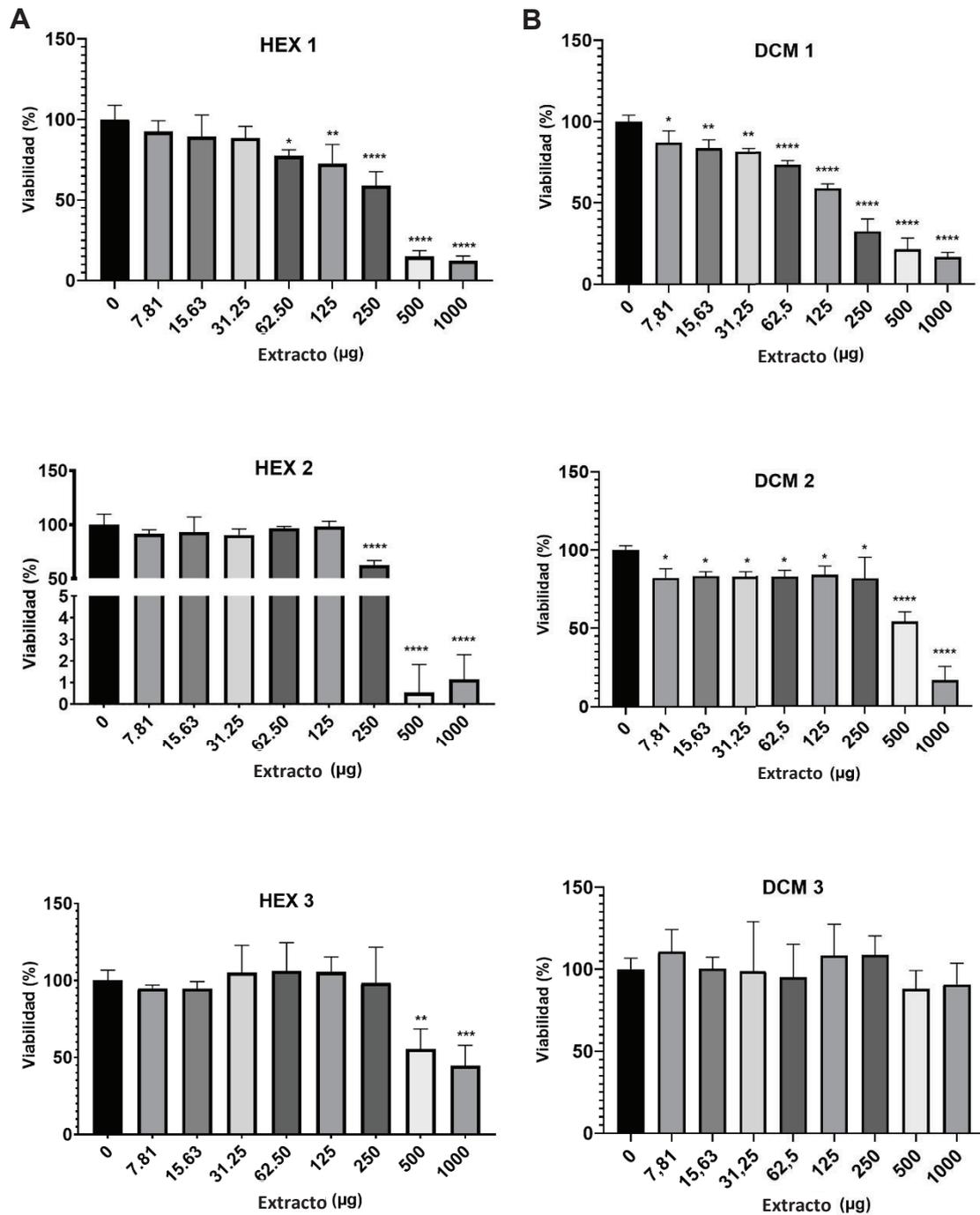


Figura 29 (I). Gráficas de citotoxicidad de los extractos de *n*-hexano (A) y diclorometano (B) de *H. sanctori* en células SAF-1. Se indican con números (1-3) en los títulos de las gráficas los grupos de holoturias según su procedencia: 1- holoturias de cautividad (HC), 2- holoturias de biofiltro (HB), 3- holoturias silvestres (HS). * $P < 0.0332$, ** $P < 0.0021$, *** $P < 0.0002$, **** $P < 0.0001$.

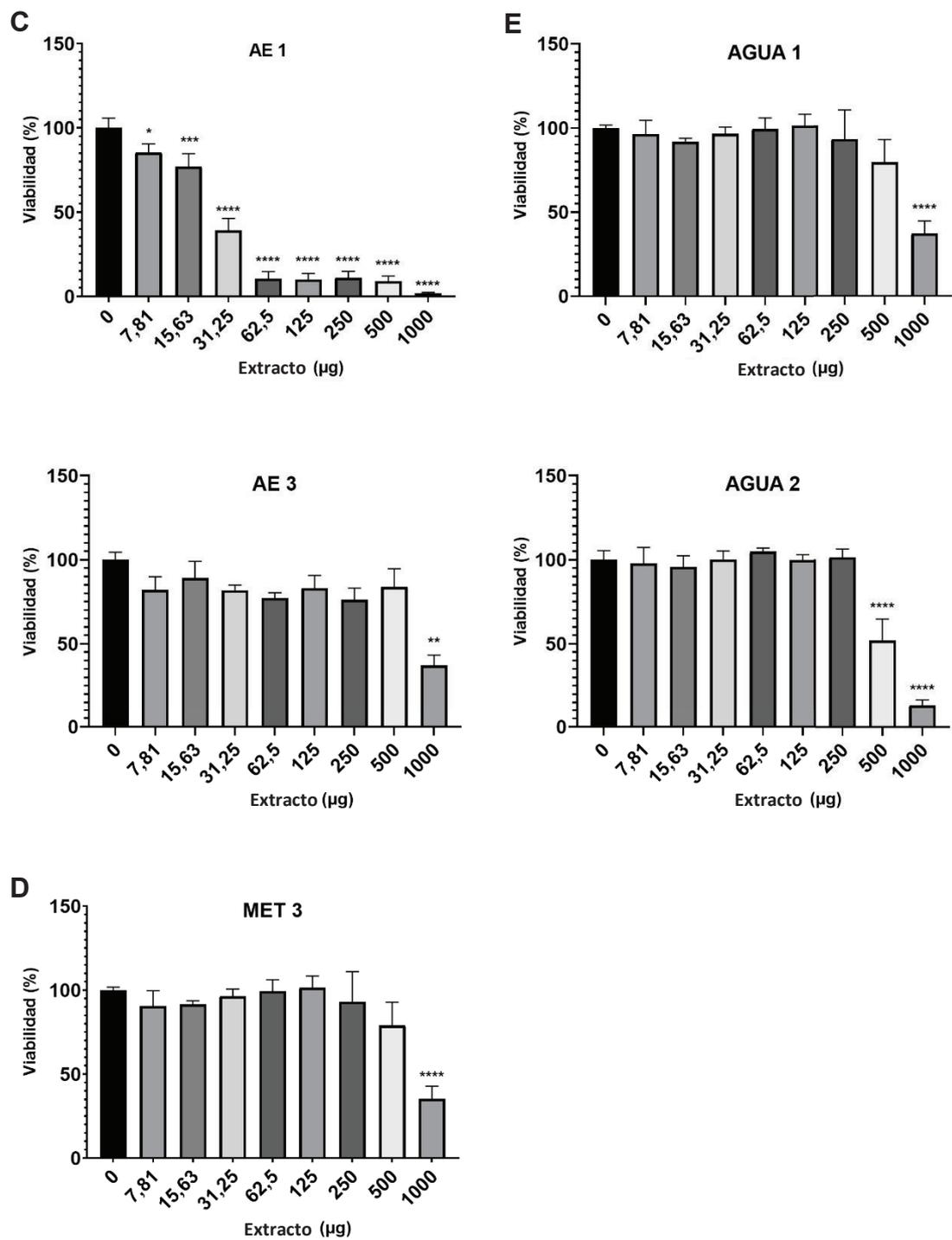


Figura 29 (II). Gráficas de citotoxicidad de los extractos de acetato de etilo (C), metanol (D) y agua (E) de *H. sanctori* en células SAF-1. Se indican con números (1-3) en los títulos de las gráficas los grupos de holoturias según su procedencia: 1- holoturias de cautividad (HC), 2- holoturias de biofiltro (HB), 3- holoturias silvestres (HS). *P < 0.0332, **P < 0.0021, ***P < 0.0002, ****P < 0.0001.

3.2.2 Citotoxicidad en N2A

Los ensayos con MTT llevados a cabo, mostraron que varios extractos presentaban citotoxicidad celular respecto al control, especialmente, en sus concentraciones más altas. El proceso se estandarizó tomando el control como el 100% de viabilidad celular y se analizaron los datos de absorbancia para determinar el porcentaje de viabilidad con las siguientes cantidades de extracto por pocillo: 7,81 µg, 15,63 µg, 31,25 µg, 62,5 µg, 125 µg, 250 µg, 500 µg y 1000 µg.

Estas células pertenecen a neuroblastoma de ratón, por lo que no tienen la misma aplicación que las SAF-1, que es para analizar que no haya citotoxicidad en células de un organismo receptor para desarrollar investigación de antibióticos para dicho animal. De manera teórica, este modelo celular puede sugerir que los daños producidos a estas células pueden afectar a células humanas por la similitud de ser mamíferos, pero de ningún modo es para estudios con fines terapéuticos.

En la Figura 30 se representan los datos de citotoxicidad de los extractos que produjeron acción antimicrobiana en las placas de cultivo. En este caso hay 6 extractos que no aparecen debido a que no tuvieron ninguna actividad citotóxica y por lo tanto podrían suponerse menos dañinos para el humano si se usaran para alguna aplicación relacionada con él. Estos extractos son el de *n*-hexano de HC y HS (grupo 1 y 3), de diclorometano de HB (grupo 2), de acetato de etilo de HS (grupo 3) y los dos de agua, de HC y HB. Destacamos que el extracto de diclorometano de HS, tienen más citotoxicidad que los de HC (Fig. 30B) ya que tiene significancia estadística respecto al control desde una dilución menor. De todos los demás extractos, el de metanol (Fig. 30D) es el que más afecta a las células ya que desde la primera dilución hay citotoxicidad significativa comparándolo con el control, pero es el extracto de *n*-hexano (Fig. 30A) de HB el que más células mata, ya que con 1000 µg, la viabilidad celular se ve reducida al 3,6%.

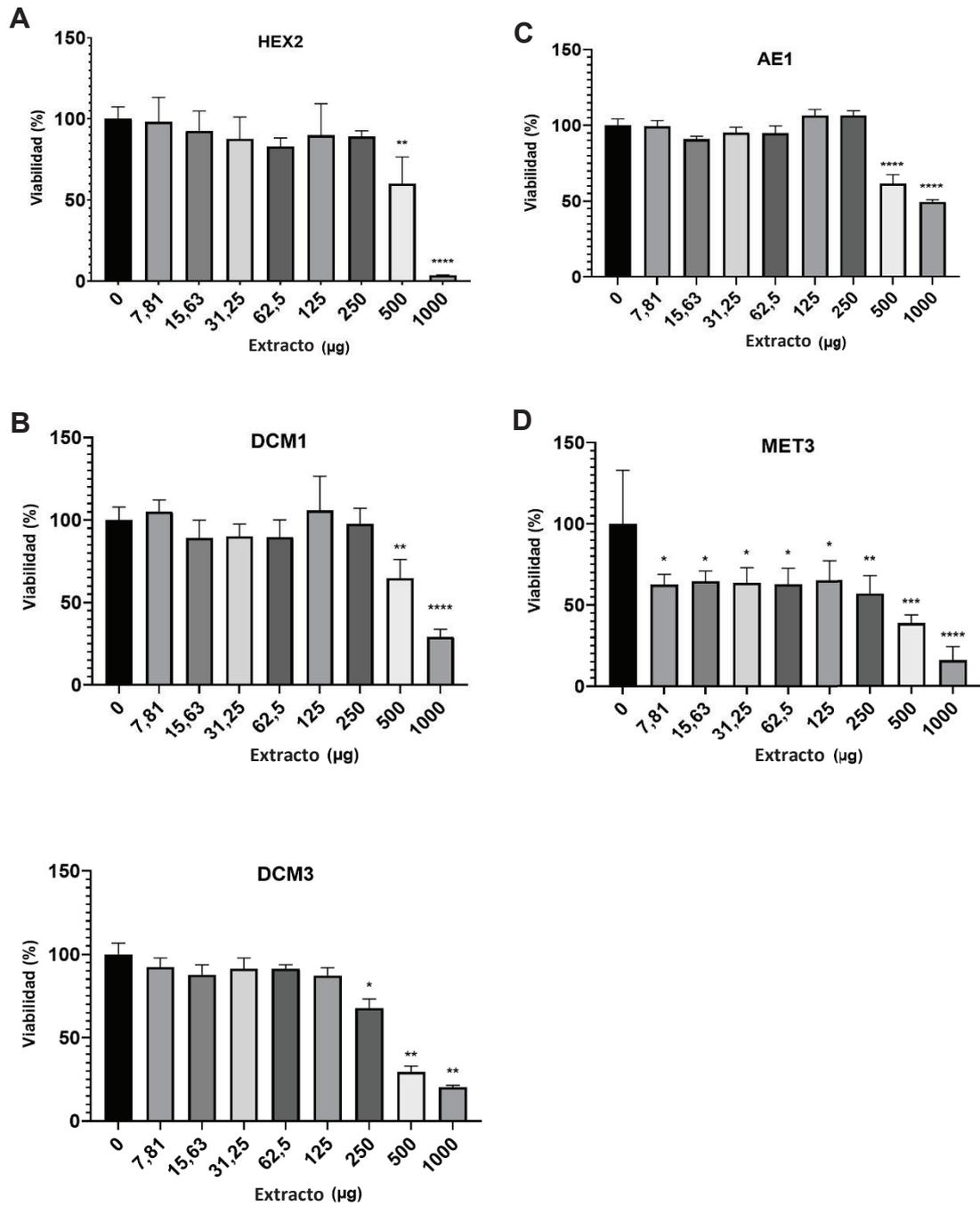


Figura 30. Gráficas de citotoxicidad de los extractos de *n*-hexano (A), diclorometano (B), acetato de etilo (C) y metanol (D) de *H. sanctori* en células N2A. Se indican con números (1-3) en los títulos de las gráficas los grupos de holoturias según su procedencia: 1- holoturias de cautividad (HC), 2- holoturias de biofiltro (HB), 3- holoturias silvestres (HS). *P < 0.0332, **P < 0.0021, ***P < 0.0002, ****P < 0.0001.

4. Compuestos bioactivos

Este apartado se dividirá en dos subapartados diferenciados para ordenar los resultados: el fraccionamiento del extracto de *n*-hexano de HB y ensayos de citotoxicidad frente a líneas celulares tumorales.

4.1 Fraccionamiento del extracto de *n*-hexano de holoturias de biofiltro (HB)

El primer fraccionamiento del extracto se abordó mediante una cromatografía de exclusión molecular en la que se obtuvieron bandas de la muestra de diferente color (Fig. 31). La banda marrón en la parte inferior de la columna representaba la primera porción del extracto en eluir con compuestos de mayor radio molecular.



Figura 31. Columna cromatográfica de exclusión molecular Sephadex LH-20. Se observan distintas bandas de color como consecuencia del fraccionamiento de las moléculas que componen la muestra. Cada banda de un color es un grupo de compuestos con pesos moleculares similares.

El análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC) nos permitió agrupar los tubos por similitud de sus bandas mayoritarias por polaridad en 6 fracciones que poseían coloraciones diferentes, fruto de la división de los grupos de compuestos (Fig. 32).

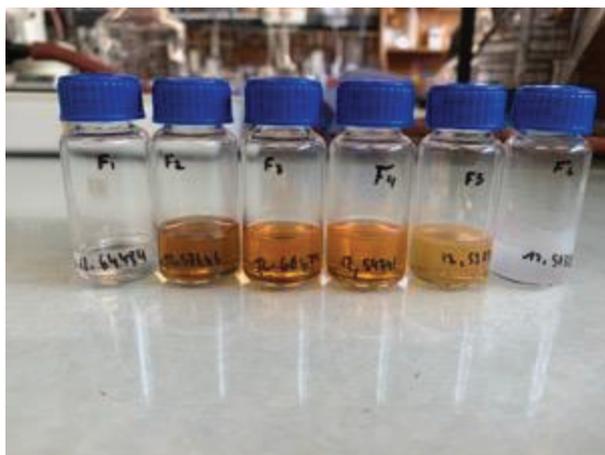


Figura 32. Fracciones concentradas del extracto de *n*-hexano de HB

A modo de resumen, se realizó una TLC de las 6 fracciones finales revelada con cloruro de cobalto y calor (Fig. 33).

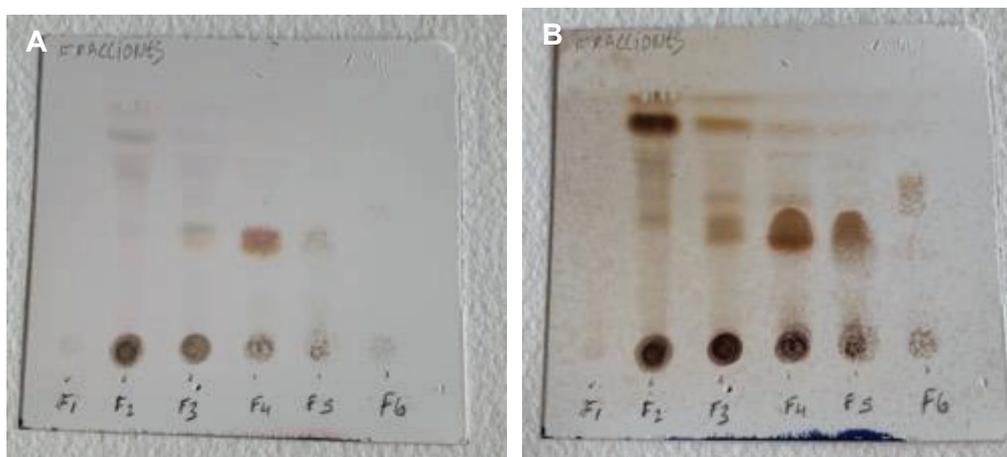


Figura 33. TLC de las 6 fracciones obtenidas del fraccionamiento del extracto de *n*-hexano de HB. (A) y (B) se diferencian en el tiempo de exposición a la fuente de calor, lo que permite apreciar la tonalidad de las bandas e intensidad de los compuestos mayoritarios.

En la Figura 33 podemos observar la gran cantidad de compuestos que aparecen separados por polaridad. Los compuestos de la parte superior son los más apolares, arrastrados por la fase móvil. La fracción 1 se descartó de los experimentos por la poca cantidad de producto que poseía (2,98 mg). Esta porción fue la que recogió el volumen muerto de la columna para asegurarnos de no perder los primeros productos. En la fracción 2 destacaban dos bandas abundantes, una en el punto de aplicación, y otra apolar muy marcada casi a la altura del frente. También se vieron algunos productos intermedios de menor intensidad. La fracción 3 contenía productos polares en el punto de aplicación, y dos bandas intensas a media altura en colores azul-gris y amarillo (Fig. 33A). La fracción 4 poseía dos bandas mayoritarias a media altura, una color magenta y otra color marrón. La primera es probable que represente esteroides como puede ser el colesterol,

ya que en estos organismos invertebrados son muy abundantes. La forma de campana que se observa en la Fig. 33B es característica de los ácidos grasos los cuales se queman más tarde. La fracción 5 mostró las mismas bandas que la 4 pero más tenues, y la fracción 6 sólo poseía productos polares visibles en el punto de aplicación.

Dado que la última fracción aún revelaba la presencia de productos, se optó por recoger más tubos de la columna hasta llegar a 60 (fracción 7), y se unió a la fracción 6 ya que ambas eran muy similares (Fig. 34).

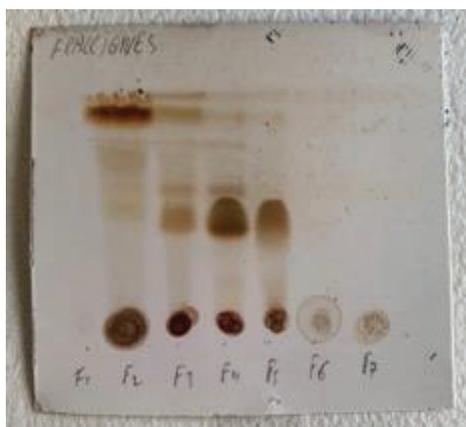


Figura 34. TLC de las 7 fracciones obtenidas. Esta imagen muestra que se sacó una séptima fracción, aunque ésta se unió a la F6.

Se procedió a aplicar más procesos cromatográficos (SPE, CLMP y TLC) para resolver la F2 y F4 porque fueron las que mostraban compuestos más mayoritarios en la TLC. Una alícuota de F2 se separó para analizar la actividad en células N2A, porque se logró resolver entera (aislando los compuestos mayoritarios) y fue la única con cantidad de muestra suficiente como para hacer este experimento.

4.1.1 Resolución de F2.

De las fracciones obtenidas de la columna de exclusión molecular se seleccionó la fracción 2 (F2) para comenzar el fraccionamiento debido a la cantidad de muestra (81,94 mg) y a la presencia de dos compuestos mayoritarios, visibles en la TLC (Fig. 34). El objetivo era aislar los compuestos mayoritarios de esta fracción, que claramente eran los polares del punto de aplicación y los apolares casi a la altura del frente. Además, había bandas minoritarias de polaridad intermedias (Fig. 34). Para ello, se realizó una TLC empleando como fase móvil *n*-hexano: acetato de etilo (95:5). Esta fase móvil es más apolar que la usada anteriormente, lo que nos permite confirmar que la banda que migraba más en las condiciones previas corresponde a un único compuesto (Fig. 35).



Figura 35. TLC de F2 del extracto de *n*-hexano de HB con fase móvil *n*-hexano: acetato de etilo (95:5)

El resultado obtenido después de extracción en fase sólida (SPE) de la F2 fue la elución secuencial de la muestra con *n*-hexano (recogiendo 15 tubos), acetato de etilo (3 tubos), y metanol (3 tubos) con el siguiente comportamiento en TLC (Fig. 36).

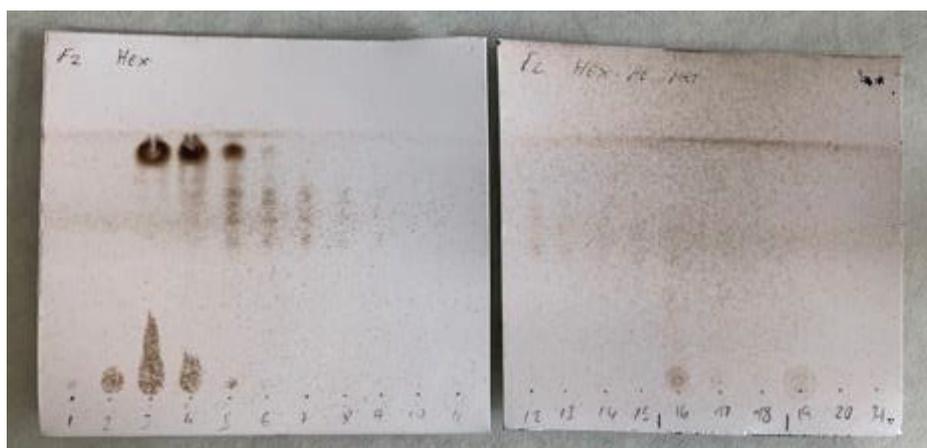


Figura 36. TLC de F2 fragmentada con SPE y tres solventes: *n*-hexano (de 1 a 15), acetato de etilo (de 16 a 19) y metanol (de 19 a 21).

Tal y como se esperaba, se aprecia que a partir del tubo 3 empieza a eluir en *n*-hexano un compuesto muy apolar y mayoritario que cayó con el *n*-hexano y que poco a poco se pierde. Sin embargo, sorprendió que entre los tubos 2 y 4 eluye el compuesto que permanece en el punto de aplicación. Dado su carácter polar se esperaba que hubiera quedado retenido.

De cualquier manera, este hecho nos facilitó el proceso de separación de compuestos ya que en el tubo 2 sólo contenía una banda correspondiente al compuesto más polar, de forma que se secó y se preparó para analizar dicho compuesto por RMN. Igualmente, también se seleccionó el tubo 16 para analizar en RMN debido al hecho de que se observó una única banda en TLC situada en el punto de aplicación, de carácter

polar, a partir de la fragmentación con acetato de etilo. De este modo ya quedó separada de la F2 la parte polar.

Al obtener los espectros de RMN de estas dos muestras no se logró relacionar las señales de los picos con una molécula concreta ya que eran algo confusos.

Se realizó una cromatografía líquida de media presión (CLMP) para purificar el compuesto de naturaleza apolar de F2 y el análisis en TLC con fase móvil de *n*-hexano: acetato de etilo (3:1) de todos los tubos reveló que el compuesto de interés se encontraba entre los tubos 18 y 25 (Fig. 37A). Una nueva TLC con fase móvil de *n*-hexano: acetato de etilo (95:5) aseguró que el compuesto estaba aislado de otras sustancias presentes en la muestra (Fig. 37B). Por su pureza en TLC, se seleccionaron los tubos 20, 21 y 22 para analizarlos en RMN.

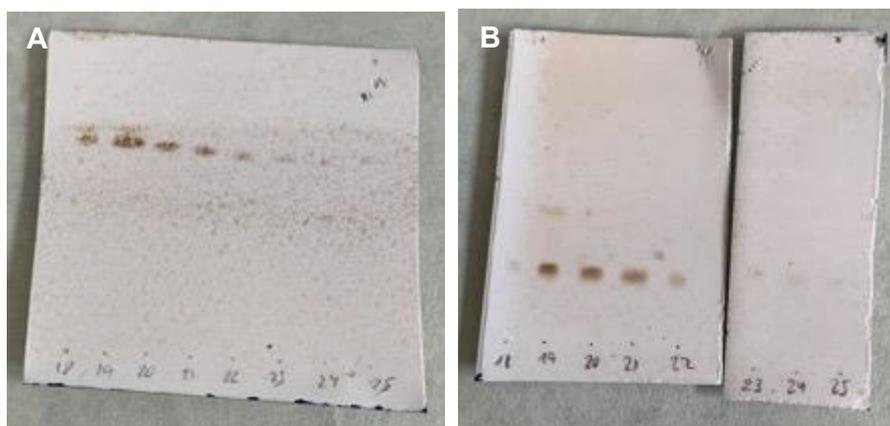


Figura 37. TLC de la porción apolar de F2 en fase móvil con *n*-hexano: acetato de etilo 3:1 (A) y con *n*-hexano: acetato de etilo 95:5 (B).

Al obtener los resultados de RMN de ^1H de la parte apolar de F2 se corroboró que las señales de los picos corresponden a los de un triglicérido. En la Figura 38 se muestra la representación de un triglicérido y se asignan con letras las señales de los picos del espectro a los diferentes H a los que pertenecen dentro de la molécula. En otras palabras, analizando el patrón de las señales de los H del espectro, se puede correlacionar con las señales de cada grupo de átomos de H del triglicérido.

Como podemos observar los picos T corresponden a los hidrógenos de los dobles enlaces de las cadenas hidrocarbonatada, los picos S y O a los hidrógenos de los carbonos del glicerol, y los demás picos pertenecen a diferentes puntos de los carbonos de las cadenas hidrocarbonatadas de los ácidos grasos.

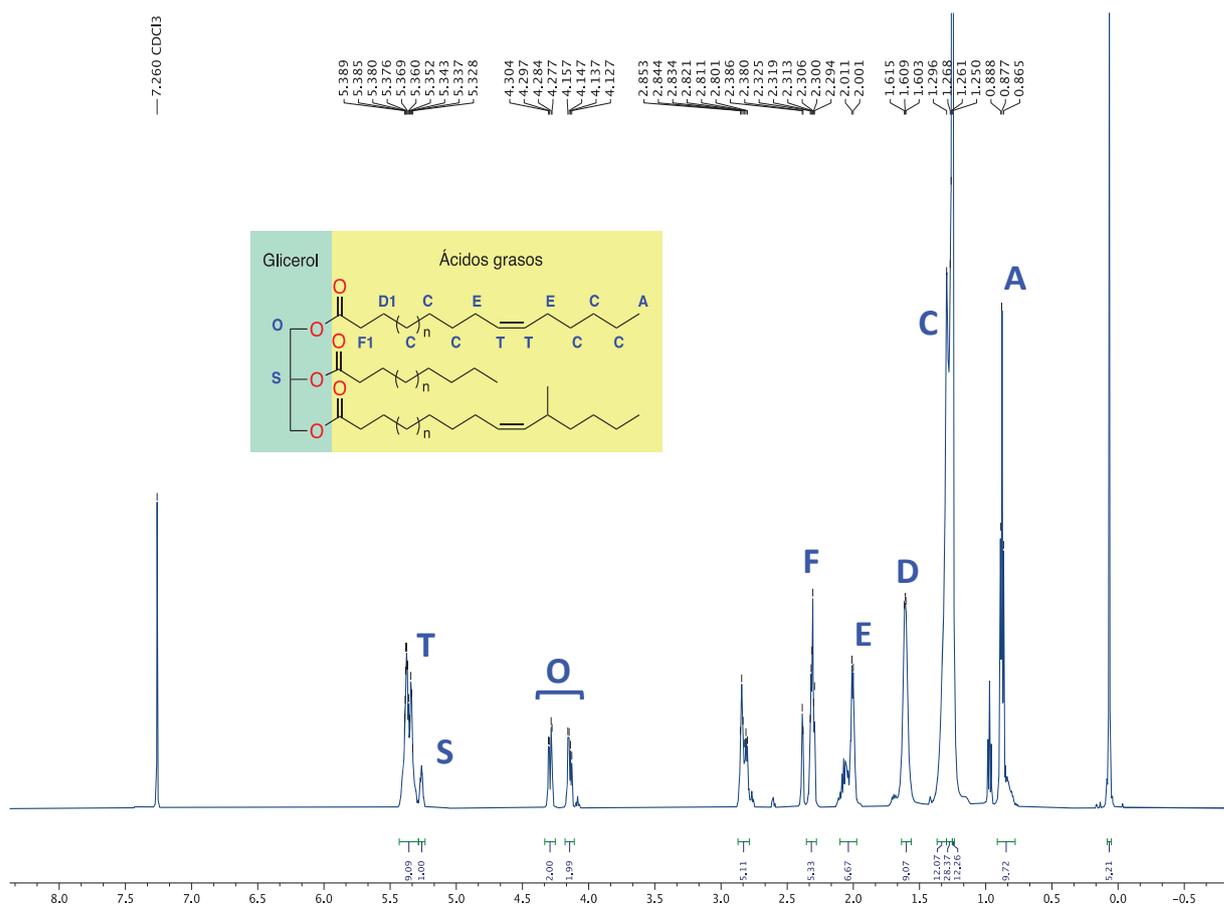


Figura 38. Espectro de RMN de ^1H de la F2, tubos 20-21-22 (CDCl_3 , 600 MHz, 298K).

Además, para resolver algunas señales confusas entre 3 y 2,5 ppm, se hizo un ^{13}C de la misma muestra para ver si se encontraban epóxidos, típicos en moléculas que sufren reacciones de oxidación. En el espectro de RMN de la Figura 39 se aprecian las señales de los picos que corresponden a los átomos de carbono de la molécula, y podemos corroborar que no existe oxidación en la molécula. Las señales más a la izquierda del espectro corresponden a los carbonos carbonílicos, y los picos T corresponden, de nuevo, a los dobles enlaces de las cadenas de los ácidos grasos. Estos últimos picos nos dan información sobre la molécula, ya que hay mucha contribución de carbonos con dobles enlaces, por lo que podemos asumir que los ácidos grasos de la molécula poseen numerosas insaturaciones. Las señales S y O pertenecen otra vez a los carbonos del glicerol, y, finalmente, todos los demás picos corresponden a los demás carbonos de las cadenas hidrocarbonadas, por lo que se intuye que es un triglicérido con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

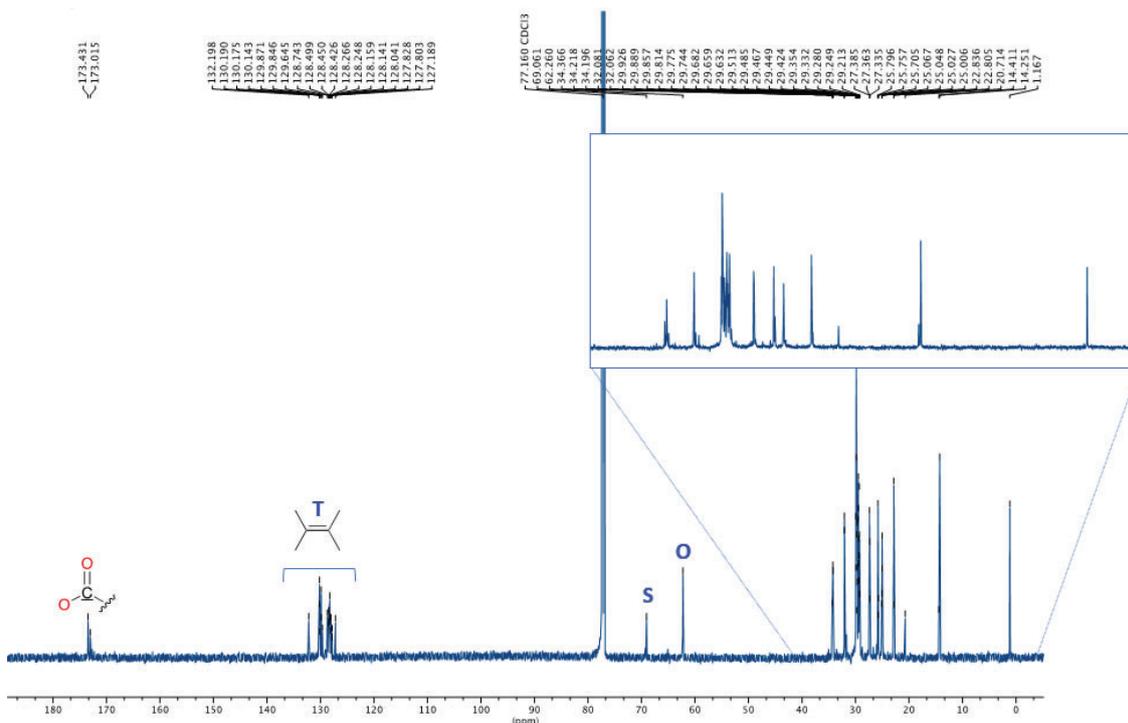


Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C de la F2, tubos 20-21-22 (CDCl_3 , 150 MHz, 298K).

Como se mencionó anteriormente, se guardó una alícuota de la F2 proveniente del extracto original de *n*-hexano de HB para probar en N2A, que mostró la mayor actividad frente a estas células a alta concentración. Se probó sólo esta fracción porque era la que más mg tenía y de la que más compuestos se aislaron para identificar. En la Figura 40 se muestra la viabilidad de las células N2A frente a distintas concentraciones de esta fracción respecto al control. Se puede observar que hay efecto citotóxico con significancia estadística respecto al control, sólo en la concentración más alta (1000 μg), y reduce la viabilidad en un 55,5%. Sin embargo, el extracto sin fraccionar reducía en un 96,4% la viabilidad celular (Fig. 30A). Además, el extracto sin fraccionar era citotóxico a partir de 250 μg .

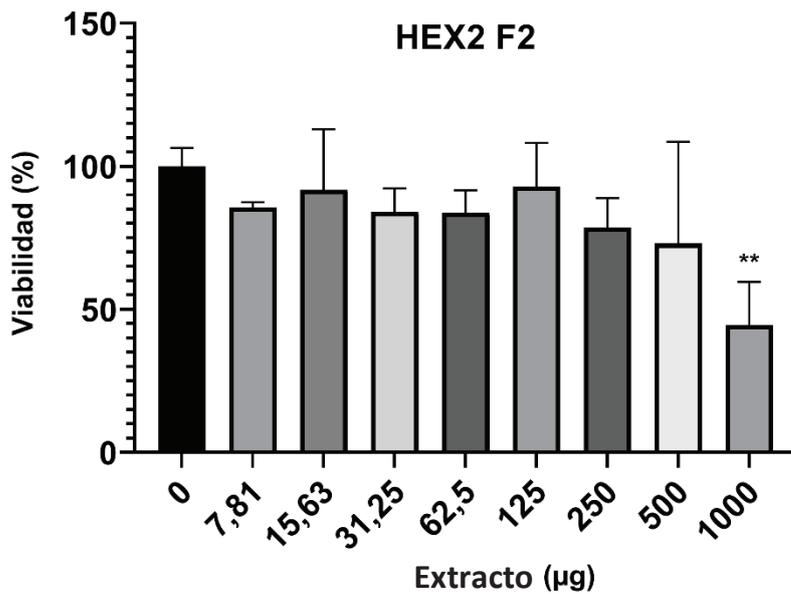


Figura 40. Gráfica de citotoxicidad de la fracción 2 del extracto de *n*-hexano de HB de *H. sanctori* en células N2A. **P < 0.0021.

4.1.2 Resolución de F4.

Para el estudio de esta fracción se procedió de la misma manera que para la F2. Se realizó una CLMP y se recogieron porciones hasta que se detectó el compuesto entre los tubos 130 y 149 (Fig. 41).

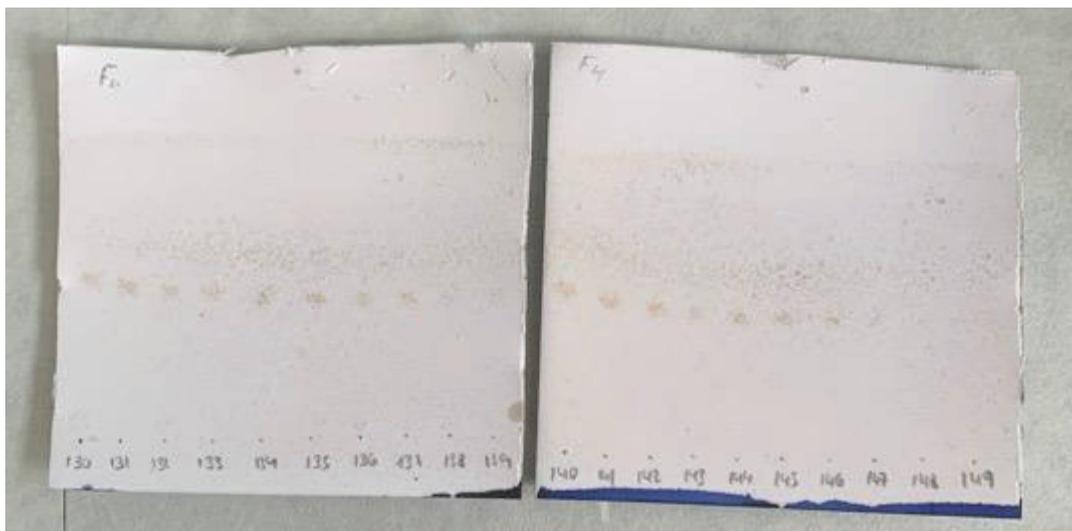


Figura 41. TLC del compuesto mayoritario detectado en F4.

Se pudo resolver el espectro de RMN de esta fracción concentrada obteniendo una mezcla de colesterol y un derivado, el 24-metilcolesterol (Fig. 42). Esto puede razonarse fijándonos en las señales características de los hidrógenos de esta molécula. El pico 6

representa los H de doble enlace de la molécula, el 3 corresponde al H del grupo hidroxilo del carbono 3. El pico 19 corresponde a las señales de los H del metilo en esa posición, característico de esta molécula y los picos 21, 26, 27 y 28 aunque aparecen algo solapados y juntos pertenecen a los hidrógenos de los carbonos de dichas posiciones, que se encuentran en los extremos.

Se puede apreciar que en el pico 18 existen dos señales de los H, es por ello, que nos lleva a pensar que hay otro compuesto cuyos H están produciendo otra señal. Debido a que este es el pico más apartado y menos solapado se pueden distinguir bien estas dos señales. Se trata de la señal de los hidrógenos del 24-metilcolesterol. Observando la intensidad de las señales, se estima que en la muestra hubiera una proporción 1:3 o 1:4 de colesterol: 24-metilcolesterol: colesterol.

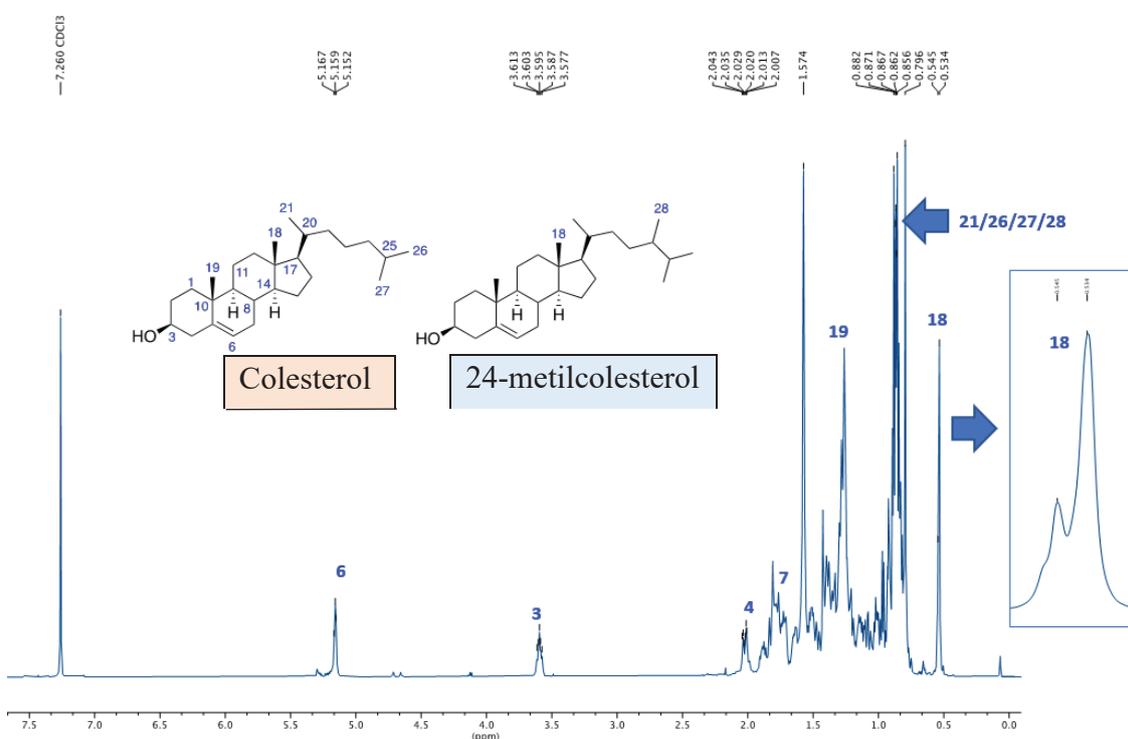


Figura 42. Espectro de RMN de ^1H de la F4 (CDCl_3 , 600 MHz, 298K).

Para asegurar que todo el contenido de la muestra F4 no hubiera quedado retenido, se continuó la elución de la columna desde el tubo 160 al 320, pero en la TLC no se observaron compuestos.

4.2 Citotoxicidad frente a líneas tumorales

Se realizaron experimentos para determinar la toxicidad de las diferentes fracciones aisladas por cromatografía frente a líneas tumorales. Las líneas celulares

cancerígenas de humano examinadas fueron A549 (adenocarcinoma de pulmón), HBL-100 (carcinoma de mama), HeLa (adenocarcinoma cervical), SW1573 (carcinoma pulmonar bronquiolo-alveolar), T-47D (carcinoma de conducto mamario invasivo) y WiDr (adenocarcinoma colorrectal). Ninguna fracción tuvo actividad frente a las líneas tumorales excepto la F6 del extracto de *n*-hexano de HB que tuvo una potente actividad contra la línea celular HBL-100 que corresponde a cáncer de mama. Exactamente, con sólo 2,7 µg/ml (GI50: inhibición del crecimiento del 50%) de esta fracción, la proliferación de estas células cancerígenas se reduce a la mitad (Fig. 43). Para conocer la molécula causante de estos efectos, se debería continuar cromatografiando dicha fracción (igual que con F2 y F4) hasta aislar todos los compuestos mayoritarios posibles y probarlos de nuevo frente a esta línea celular con el fin de encontrar el componente bioactivo.

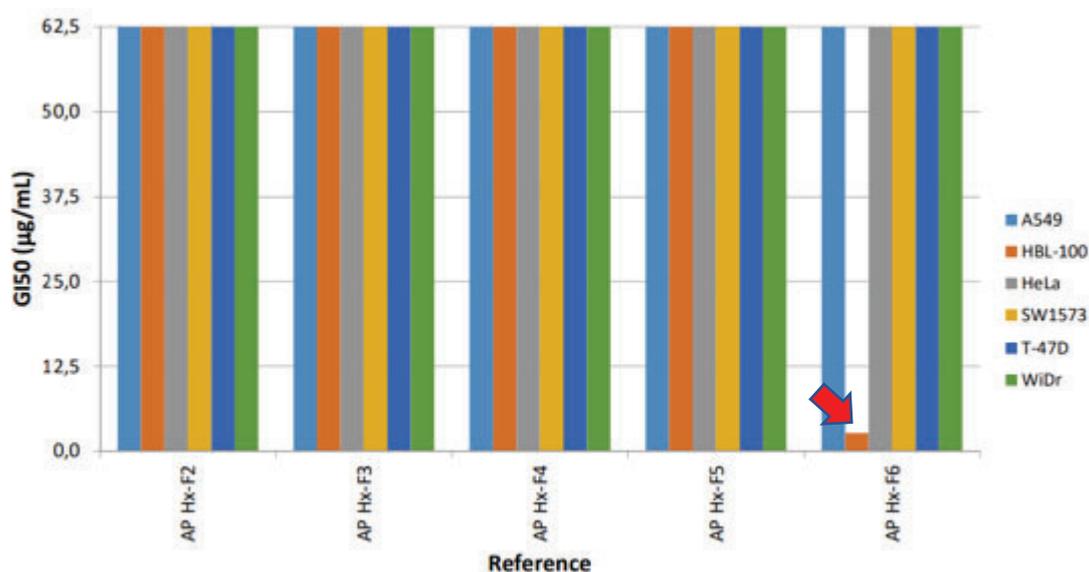


Figura 43. Datos de la citotoxicidad causada por las fracciones del extracto de *n*-hexano de HB en distintas líneas celulares tumorales, representados en gráfico de barras. La flecha roja denota la fracción con actividad.

Además de analizar el extracto de *n*-hexano de HB fraccionado, se estudió la actividad citotóxica de los demás extractos de *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol y agua. Encontramos una gran actividad citotóxica sobre cinco de las seis líneas tumorales analizadas en el extracto de diclorometano de HC (DCM-1). Analizando la Fig. 44 se puede ver lo bajos que son los valores de GI50 de este extracto para 5 tumores sólidos. Esto indica que para SW1573 (cáncer de pulmón bronquiolo-alveolar), por ejemplo, se necesitan menos de 0,625 µg/ml para producir el 50% de la inhibición del crecimiento del tumor. Para las líneas WiDr, A549, T-47D y HeLa este extracto tiene una potente actividad también, y su GI50 es 1,8; 2,8; 3,3 y 6,6 µg/ml, respectivamente.

Aunque también tiene algo de actividad contra las células HBL-100, su citotoxicidad no es tan notable, pero se aprecia perfectamente que es el extracto más activo de todos.

Cmax	Reference	Screening results in GI ₅₀ (micrograms/mL)					
		Cell line					
		A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr
62,5	Hex-1	63	63	63	63	63	63
62,5	Hex-2	63	63	63	63	63	63
62,5	Hex-3	63	63	63	63	63	63
62,5	Hex-TC	63	63	63	39	63	63
62,5	DCM-1	2,8	40	6,6	0,625	3,3	1,8
62,5	DCM-2	63	63	63	24	63	52
62,5	DCM-3	35	63	63	3,4	32	18
62,5	DCM-TC	63	63	63	63	63	63
62,5	AE-1	63	63	63	63	63	63
62,5	AE-2	63	63	63	63	63	63
62,5	AE-3	63	63	63	63	63	63
62,5	AE-TC	63	63	63	63	63	63
62,5	Met-1	25	63	63	37	23	16
62,5	Met-2	63	63	63	63	63	63
62,5	Met-3	15	63	63	27	13	14
62,5	Met-TC	63	63	63	63	63	63
62,5	H2O-1	63	63	63	63	63	63
62,5	H2O-2	63	63	63	63	63	63
62,5	H2O-TC	63	63	63	63	63	63

Cmax = maximum assay concentration (micrograms/mL)
Exposure time 48 h

Figura 44. Datos de la citotoxicidad medida con GI₅₀ (µg/ml) producida por cada extracto de pared corporal y túbulo de Cuvier de *Holothuria sanctori* en distintas líneas celulares tumorales, representados en tabla de valores. Las flechas denotan el valor de mayor actividad de cada extracto, y los círculos del mismo color son sus extractos pertinentes. Se indican con números (1-3) los grupos de holoturias según su procedencia: 1- holoturias de cautividad (HC), 2- holoturias de biofiltro (HB), 3- holoturias silvestres (HS).

El círculo azul corresponde al extracto de diclorometano de HS (DCM-3) cuya máxima citotoxicidad también es frente a la línea SW1573 con una IG₅₀ de 3,4 µg/ml. También muestra algo de actividad frente a WiDr, A549, T-47D, pero son valores menos significativos.

El tercer extracto con actividad es el de metanol de HC (Met-1), en amarillo, cuya máxima actividad es frente a WiDr (cáncer colorrectal) con una GI₅₀ de 16 µg/ml. Menores actividades se vieron frente a las líneas A549, T-47D y SW1573.

El último extracto con cierta actividad sobre las células tumorales fue el de metanol de HS (Met-3) rodeado en negro. Su máxima citotoxicidad fue frente a T-47D (cáncer de mama) con un valor de GI₅₀ de 13 µg/ml, pero también tiene un GI₅₀ menor de 20 µg/ml (todavía se considera buena actividad) frente WiDr, A549 cuyos valores fueron 14 y 15 µg/ml, respectivamente. El extracto que se fraccionó (*n*-hexano de HB) no tuvo actividad frente ninguna línea tumoral analizada.

Los extractos de *n*-hexano, acetato de etilo y agua de pared corporal y túbulo de Cuvier no tuvieron ninguna actividad, exceptuando la leve inhibición de proliferación

celular del extracto de *n*-hexano de túbulos de Cuvier frente a SW1573 con un valor de GI50 de 39 $\mu\text{g/ml}$.

Por último, cabe destacar que algunos extractos tuvieron la capacidad de acabar con la totalidad del tumor, no sólo con el 50%. Esto se midió con la inhibición total del crecimiento (TGI). El extracto DCM-1 vuelve a ser el más activo, y tiene una TGI de 3,6 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 45), para la línea celular de cáncer de pulmón SW1573, que coincide con el valor más bajo de GI50 que tuvo este extracto. El extracto de Met-3 también ha conseguido la inhibición total de la proliferación (aunque de manera menos potente) de tres líneas celulares: A549, T-47D y Widr, con TGI de 35, 26, 29 $\mu\text{g/ml}$.

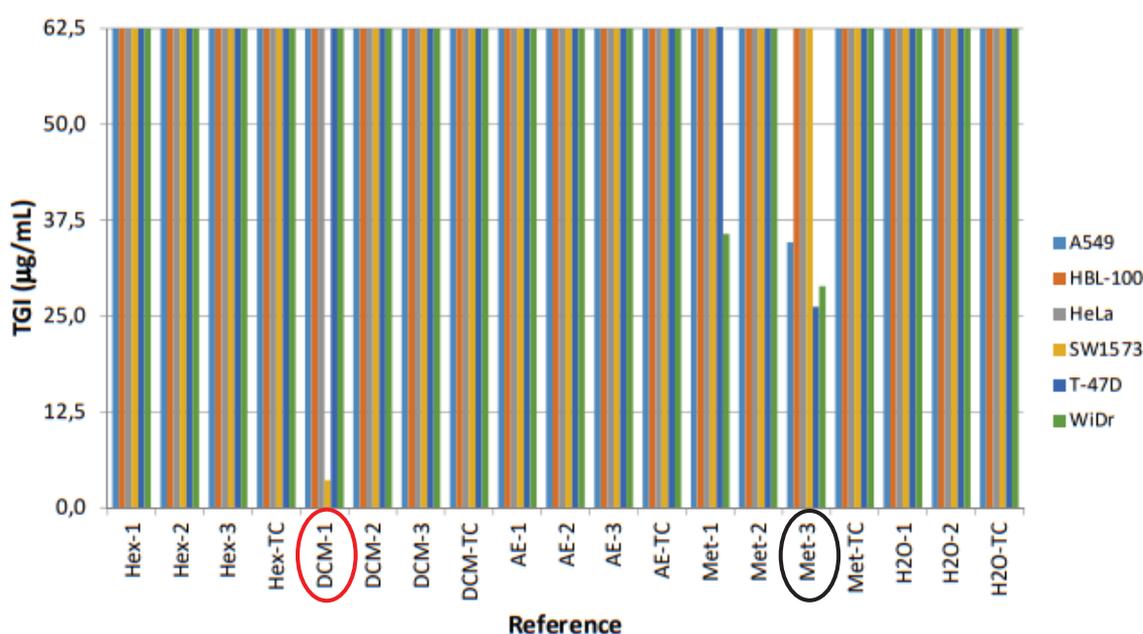


Figura 45. Datos de la inhibición total del crecimiento medida con TGI ($\mu\text{g/ml}$) producida por cada extracto de pared corporal y túbulos de Cuvier de *Holothuria sanctori* en distintas líneas celulares tumorales, representados en gráfico de barras. Los círculos indican los extractos con actividad más potente. Se indican con números (1-3) los grupos de holoturias según su procedencia: 1- holoturias de cautividad (HC), 2- holoturias de biofiltro (HB), 3- holoturias silvestres (HS).

Discusión

Los compuestos bioactivos derivados de organismos marinos son fuentes importantes para el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos. Los pepinos de mar contienen muchos metabolitos polares y no polares que se pueden utilizar con fines biomédicos (Kamyab *et al.*, 2022).

Como se ha comentado anteriormente, hay muchos estudios con holoturias en los que se han aislados compuestos con actividad biológica. Pero también hay muchos en la fase previa, en la que se estudia el extracto crudo, y este es el punto en el que se encuentra este trabajo. En la Tabla VI se han recopilado varios estudios con extractos de holoturias y se puede apreciar la diversidad de sus actividades biológicas, desde antibacteriana y antitumoral, hasta hemolítica, antifúngica y antifouling.

Tabla VI. Recopilación de extractos de distintas especies de la clase Holothuroidea y sus actividades biológicas.

Tipo de extracto	Especie	Actividad biológica	Referencia
Acetato de etilo	<i>H. forskali</i>	Antibacteriana: <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , y <i>P. aeruginosa</i>	Telahigue <i>et al.</i> , 2020
Metanol	<i>H. atra</i> y <i>H. nobilis</i>	Antibacteriana: <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i> Antifouling	Soliman <i>et al.</i> , 2016
<i>n</i> -Hexano	<i>H. atra</i>	Antibacteriana frente a <i>P. aeruginosa</i>	Sukmiwati <i>et al.</i> , 2020
Agua y metanol	<i>H. atra</i>	Antiproliferativa: HeLa y MCF-7	Dhinakaran y Lipton, 2014
Acuoso y de acetonitrilo	<i>Cucumaria frondosa</i>	Antibacteriana: <i>E. coli</i> , <i>C. glutamicum</i> , <i>S. aureus</i> y <i>V. anguillarum</i> Hemolítica	Haug <i>et al.</i> , 2002
<i>n</i> -Hexano, acetato de etilo y metanol	<i>H. leucospilota</i>	Antibacteriana: <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>M. luteus</i> y <i>V. harveyi</i> Antifouling: larvas de <i>Amphibalanus amphitrite</i>	Darya <i>et al.</i> , 2020
Acetato de etilo, metanol y agua-metanol (50%)	<i>H. leucospilota</i>	Antifúngico: <i>A. niger</i> y <i>C. albicans</i> . Toxicidad frente a <i>Artemia</i> Sin actividad antibacteriana	Mohammadzadeh <i>et al.</i> , 2013

Después de encontrar el metabolito bioactivo *in vitro*, hay una serie de ensayos que deben superar, incluyendo ensayos *in vivo*, hasta poder ser comercializados. Además, hay otros factores que hacen el proceso de aprobación dure aproximadamente 15 años. Esta demora se puede deber a las complicaciones en el cultivo de organismos marinos, metabolitos menos activos en extractos, identificación de protocolos apropiados para la extracción y posterior purificación, la toxicidad de los extractos y la síntesis sostenible de

compuestos (Manochkumar *et al.*, 2022). De cualquier manera, la biotecnología marina es un campo en auge y constante expansión, por lo que es de vital relevancia caracterizar nuevos compuestos químicos, así como sus actividades biológicas.

1. Bacterias

La epidemia global de aparición de resistencias ante fármacos antibacterianos actuales frente a bacterias pone en manifiesto la necesidad de encontrar nuevas biomoléculas con actividad antibacteriana. Este problema creciente de salud pública se demuestra con el descenso de la efectividad de algunos antibióticos como los beta lactámicos o quinolonas, al igual que la aparición de cepas como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y las *Pseudomonas* resistentes a las fluoroquinolonas (Shannon y Abu-Ghannam, 2016).

En primer lugar, en este estudio se han obtenido extractos de *Holothuria sanctori* provenientes de ambiente silvestre, de cultivo o de biofiltro que han logrado inhibir el crecimiento de cuatro bacterias: *Streptococcus agalactiae* CECT 183, *Vibrio parahaemolyticus* CECT 5111, *Photobacterium damsela* sbsp. *piscicida* B1 y *Vibrio anguillarum* 507 a concentraciones de 10 mg/ml.

En estudios similares, Dayra *et al.*, 2020 probaron concentraciones de extractos de pared corporal de *H. leucospilota* hasta 2 mg/ml frente a *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *M. luteus* y *V. harveyi* y observaron que los extractos de hexano y acetato de etilo frente a *V. harveyi* mostraron una MIC de 1 y 0,5 mg/ml, respectivamente. Similarmente, el trabajo de Telahigue *et al.*, 2019 utilizó también una concentración de extracto de acetato de etilo de *H. forskali* de 2 mg/ml, produciendo actividad antimicrobiana en *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli*, y *P. aeruginosa*. La actividad antimicrobiana de estos estudios se ha conseguido con menor concentración que nuestro estudio (que usaba 10 mg/ml), esto puede deberse a que sean extractos mucho potentes, o que el compuesto antimicrobiano en sus extractos sea más mayoritario.

Los halos de inhibición de los extractos de acetato de etilo de HB y metanol de HC y HB no llegaban a medir 1 cm y por eso directamente no aparecen en la Tabla V, pues se asume actividad negativa frente a todas las bacterias. Quizás un aumento de la concentración de los extractos con actividad negativa provocaría el incremento del tamaño de los halos de inhibición.

Se observó que extractos como los de diclorometano de HC y HS aun teniendo actividad positiva, su halo no era completamente inhibitorio. Esto puede ser debido a la

al hecho de que el extracto ejerce una acción bacteriostática más que bactericida, o que se requiera mayor concentración para matar completamente a las bacterias. Debido a que ningún halo de inhibición de los extractos superó el tamaño de los halos de los antibióticos de referencia, se sugiere para futuros experimentos el incremento de la cantidad de extracto para observar si aumenta su capacidad bactericida. Además, sería interesante conocer la concentración mínima inhibitoria (MIC) en cada bacteria mediante experimentos con diluciones para poder conocer exactamente a partir de qué concentración de extracto comienza la actividad antibacteriana.

Streptococcus agalactiae es una bacteria capaz de causar complicaciones infecciosas en grupos de riesgo como mujeres embarazadas, neonatos y ancianos. Además, se ha observado un incremento de las resistencias a antibióticos no beta lactámicos como clindamicina, eritromicina y fluoroquinonas (Raabe y Shane, 2019). Por ello, adquiere vital importancia el descubrimiento de nuevas moléculas para curar esta infección. Por otro lado, esta bacteria es patogénica para animales de acuicultura. En Guandong se confirmaron 146 casos en granjas acuícolas de infección por *S. agalactiae* en tilapias adultas (Sun *et al.*, 2016). Se reportó también en 2001 en la Bahía de Kuwait (golfo Árabe) una muerte masiva de mujol salvaje (*Liza klunzingeri*) que afectó a 2.500 toneladas métricas a causa de *S. agalactiae* (Gilbert *et al.*, 2002). Estos hechos representan una pérdida económica y un peligro de seguridad alimentaria que repercute finalmente en el humano. No se ha reportado en estudios anteriores la inhibición de crecimiento de esta bacteria con extractos de holoturias, mientras que en este estudio algunos extractos de *H. sanctori* (*n*-hexano y diclorometano de HB y HS y acuosos de HC) han producido halos de inhibición en placa frente a esta bacteria lo que implica un avance de gran interés.

En cuanto a *Photobacterium damsela* subsp. *Piscida*, no se han encontrado artículos que demuestren la actividad antimicrobiana de extractos de holoturias frente a esa bacteria. Sólo se ha visto que el riñón de lubina tiene cierta actividad contra esta bacteria (Caruso *et al.*, 2020). La peligrosidad de esta bacteria reside en que es capaz de infectar a peces, moluscos, crustáceos y cetáceos. En humanos produce infecciones oportunistas que pueden acabar en fascitis necrótica (Rivas *et al.*, 2013). El presente trabajo ha logrado encontrar 9 extractos (de *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol y agua) que producían halos de inhibición en esta especie, abriendo posibles oportunidades de terapia para animales y humanos.

V. parahaemolyticus es una bacteria marina que, a menudo, se acumula en los tejidos blandos de las ostras y que, debido a que es una bacteria zoonótica, es posible que el humano al ingerir dicho alimento pueda sufrir la infección bacteriana (Ndraha *et al.*,

2020). La infección por esta bacteria es la principal causa de enfermedad por ingesta de comida procedente del mar en muchos países incluyendo Corea y Estados Unidos. La mayoría de cepas son no virulentas pero las que poseen los genes *tdh* y *trh* son las más peligrosas (Park *et al.*, 2018). Encontrar nuevos antibióticos contra esta bacteria también es crucial ya que cada vez muestran más resistencias a fármacos, lo que compromete la salud pública y produce pérdidas económicas. Al contrario de lo que se ha observado en este estudio con extractos de metanol de HC, HB y HS a 10 mg/ml se ha reportado inhibición del crecimiento de *V. parahaemolyticus* con extractos de metanol y etanol de *Holothuria parva* a concentraciones mayores de 20 µg/ml (Shadi y Oujifard, 2019). Sin embargo, en este estudio se han observado halos de inhibición con extractos de *n*-hexano y diclorometano de *H. sanctori* de HB y HS a concentración de 10 mg/ml.

Vibrio anguillarum es una bacteria marina capaz de causar enfermedades a organismos marinos incluyendo animales de acuicultura. En estudios anteriores, se había visto que los extractos acuosos de fluido coleómico y árbol respiratorio del pepino de mar *Cucumaria frondosa* causaba inhibición proliferativa (Haug *et al.*, 2002) de esta bacteria (en el serotipo O2). De forma similar, aunque la cepa del presente estudio era *V. anguillarum* 507, los extractos de *n*-hexano y diclorometano de HC, HB y HS, y acuosos de HC y HB, lograron causar inhibición del crecimiento. Similarmente, Sibero *et al* (2019) concluyó con que los extractos corporales de acetato de etilo a 10 µg/ml de *Holothuria atra* inhibían el crecimiento bacteriano de este *Vibrio* incluso más que el control con Ampicilina (10 µg/ml).

Se ha visto que los extractos de metanol, etanol y agua de *Holothuria parva* no causaban inhibición en *Vibrio alginolyticus* (Shadi y Oujifard, 2019). También se ha reportado que la cepa HAT3 de esta bacteria causa úlceras en la piel a *Holothuria arta* en cultivo (Fahmi, 2022). Sin embargo, los extractos metanólicos y de acetato de etilo de *Holothuria arta* inhibían de manera significativa el crecimiento de *V. alginolyticus* (Sibero *et al.*, 2019). La cepa del presente estudio, que es capaz de infectar al abalón, no fue susceptible a ningún extracto de pared corporal de *Holothuria sanctori*. Por ello, adquiere vital importancia buscar posibles moléculas contra esta bacteria en túbulos de Cuvier o en la pared corporal, ya que así, se fomentaría la protección del abalón por parte de las holoturias con aplicación para cultivos IMTA.

Vibrio harveyi, que pertenece a la familia Vibrionaceae de la clase Gammaproteobacteria, puede causar en peces lesiones oculares/ceguera, gastroenteritis, necrosis muscular, úlceras en la piel y pudrición de la cola. Dayra *et al.* (2020) ha reportado que los extractos de *n*-hexano y acetato de etilo de pared corporal y gónadas de *Holothuria leucospilota*, producían más inhibición que el antibiótico de referencia. Por el

contrario, en este estudio, ningún extracto de *Holothuria sanctori* fue capaz de producir inhibición ni en *V. harveyi* 8210 de lubina ni en *Vibrio vulnificus*. Esta última bacteria es potencialmente peligrosa ya que causa infecciones fatales: septicemia por consumo de comida de mar, infección de heridas o de tracto digestivo (Yun y Kim, 2018).

Sería crucial saber que compuestos de los extractos son los causantes de las actividades antibacterianas observadas. Se conocen varios compuestos antimicrobianos en holoturias, pero el más común son las saponinas. La saponina es una clase de compuestos que pueden inhibir o matar microbios al reaccionar con esteroides de membrana, el efecto principal de las saponinas en las bacterias es la liberación de proteínas y enzimas de las células, inhibiendo su crecimiento (Hardiningtyas, 2009).

2. Citotoxicidad frente a SAF-1 y N2A

Actualmente no hay ningún estudio en la bibliografía con datos de citotoxicidad de extractos de holoturias frente a células SAF-1 o N2A. Se ha reportado que los extractos acuosos de las hojas del árbol *Moringa oleifera* (García-Beltrán *et al.*, 2020) mostraron citotoxicidad a concentraciones superiores de 10 µg/ml frente a células SAF-1 mientras que los extractos etanólicos de dicha planta mejoraban la viabilidad de dichas células. Los extractos acuosos del presente estudio tienen citotoxicidad significativa respecto al control a partir de la segunda dilución con más extracto (500 µg) que equivale a 25 µg/ml en términos de concentración, de manera que son menos tóxicos para las células SAF-1 que los acuosos de hoja de *Moringa oleifera*.

El estudio de Morcillo y Cuesta (2016) demostró los efectos tóxicos de distintos metales pesados en células SAF-1, entre los que se encontraron Cd, Hg, MeHg (metilmercurio), As y Pb. El MeHg resultó ser el más tóxico con EC50=0,015 mM, evidenciando el potencial nocivo de la contaminación marina sobre células de *Sparus aurata*. También se ha analizado el potencial citotóxico de los nanoplásticos de poliestireno frente a células SAF-1 (Almeida *et al.*, 2019) con el fin de conocer las consecuencias de la presencia de micro(nano)plásticos en organismos marinos. El estudio usó concentraciones hasta 10 µg/ml, resultando no tener ningún efecto perjudicial. Sin embargo, en el presente trabajo se ha visto que en células SAF-1, todos los extractos que tuvieron actividad antibacteriana anteriormente causaban citotoxicidad celular por encima de concentraciones de 50 µg/ml (equivalente a 1000 µg de extracto por pocillo), destacando el extracto de diclorometano de HC y HB y el de acetato de etilo de HC que fueron tóxicos hasta en la dilución con menos extracto (7,81 µg), a 0,39 µg/ml. Como excepción, el único extracto sin citotoxicidad fue el de diclorometano de HS. Por ello,

este último extracto sería un punto de partida idóneo para el desarrollo de un fármaco antibiótico con aplicabilidad en acuicultura.

Para una terapia para animales de acuicultura lo adecuado es que ninguna de las diluciones del extracto tenga citotoxicidad frente a las células *in vitro*. Los halos de inhibición obtenidos anteriormente frente a bacterias se produjeron al añadir una cantidad de 200 µg de cada extracto, ahora bien, esta cantidad de extracto no se podría usar para investigar un fármaco en aquellos extractos que tuvieran citotoxicidad en SAF-1 a partir de 125 µg porque produciría efectos nocivos en el animal receptor. Para desarrollar un fármaco se debería conocer la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada bacteria mediante ensayos con diluciones en medio líquido, y después habría que analizar la citotoxicidad de dicha concentración frente al cultivo celular. Si con estos datos se puede asegurar que el extracto no tiene citotoxicidad, se puede asumir la seguridad celular de la etapa *in vitro*.

Es cierto que el hecho de que no tenga citotoxicidad en células SAF-1, que son fibroblastos de aleta de dorada, no es suficiente para afirmar que es totalmente seguro, ya que puede afectar a otro tipo de células del animal receptor. Es por ello, que se deben hacer pruebas *in vivo* para evaluar la seguridad y efectividad del fármaco antes de poder comercializarse o catalogarse como antibiótico.

Los extractos más tóxicos frente a esta línea celular fueron los de diclorometano de HC y HB y el de acetato de etilo de HC ya que tuvieron efecto significativo en todas las diluciones. Pero si hablamos de los extractos que afectaron de forma más significativa la viabilidad en porcentaje de células (menor p-valor) cabe destacar el de *n*-hexano de HB y el de acetato de etilo de HC, con una mortalidad de hasta el 99,5 y 98,1%, respectivamente.

En el caso de células N2A hubo seis extractos sin citotoxicidad, dos de *n*-hexano de HC y HS, uno de diclorometano de HB, uno de acetato de etilo de HS y los dos de agua de HC y HB. El de metanol de HS causó citotoxicidad significativa en todas las muestras respecto al control, pero el de *n*-hexano de HB fue el que más redujo la viabilidad hasta un 3,6%, con 1000 µg, por eso fue el extracto elegido para fraccionar. Hay laboratorios que utilizan estas células de mamífero para simular células humanas frente a posibles efectos adversos de contaminantes (Loeffler *et al.*, 2021). Por ejemplo, el efecto neurotóxico de la ciguatoxina, tóxico que portan algunos peces marinos (como *Seriola dumerili*) que son consumidos por el hombre, puede estudiarse en esta línea celular y asumirse efectos perjudiciales extrapolando a neuronas humanas (Caillaud *et al.*, 2012). Dicho estudio utiliza un intervalo de concentraciones en el que encuentra diferencias

significativas entre 0,01 a 10 pg/ml mientras que nuestro estudio usó concentraciones entre 3,9 y 50 µg/ml, que son cifras mucho mayores. Esto sugiere que las células N2A pueden tener una sensibilidad diferencial a la ciguatoxina respecto a los extractos de este estudio. De la misma manera se podría estudiar la citotoxicidad de los extractos de *H. sanctori*, aunque si el objetivo es hacer una terapia desarrollando fármacos antimicrobianos, los ensayos deben ser más complejos y abarcar más tipos de células, así como ensayos *in vivo*.

Podemos sugerir que la F2 del extracto de *n*-hexano de HB puede tener algún compuesto con cierta actividad frente a células N2A, debido a que, al testar esta fracción de forma individual, la viabilidad celular en la dilución con más cantidad de extracto (1000 µg) se vio reducida al 44,5%. En concreto los compuestos mayoritarios como el triglicérido aislado o las moléculas que no se pudieron identificar pueden ser los causantes de esta mortalidad, pero también puede que los compuestos bioactivos frente a esta línea celular residan en otra fracción ya que la viabilidad celular en la misma dilución del extracto original sin fraccionar se redujo hasta el 3,6%. Pero para ser rigurosos, para saber qué compuesto es el causante de la inhibición del crecimiento de las células de neuroblastoma de ratón, se debe probar cada compuesto individualmente aislado y separado frente a las células N2A.

Las diferencias de citotoxicidad entre los grupos de holoturias pueden deberse a la composición diferencial de moléculas de los extractos. Esta diferencia puede estar relacionada con la distinta alimentación que experimentan por encontrarse en diferentes entornos, lo que afecta a disponibilidad de alimento. Esta teoría es reforzada por el hecho de que, al hacer las extracciones químicas, los extractos mostraban diferentes colores e intensidades según el grupo.

3. Citotoxicidad frente a tumores

Se han descubierto cuatro extractos (diclorometano y metanol de HC y HS) y una fracción de otro (F6 de *n*-hexano de HB) con potencial antiproliferativo frente a 6 líneas celulares cancerígenas: A549, HeLa, T-47D, WiDr, SW1573 y HBL-100. Estos hallazgos abren las puertas a futuras investigaciones para tratar de elucidar que moléculas son las causantes de dichos efectos. En la bibliografía sólo hay un estudio con *H. sanctori* (Arslan, 2020) y líneas tumorales, pero hay más con otras especies de pepino de mar que se describen a continuación. El estudio de Ru *et al.*, (2022) demostró que un extracto de proteína de *Holothuria leucospilota* tuvo actividad frente a la línea celular A549 (adenocarcinoma de pulmón), pero la máxima concentración de extracto de dicho trabajo

era 10 µg/ml, y no llegaba a inhibir el crecimiento tumoral el 50% a las 48 horas de exposición, al contrario que el extracto de diclorometano de HC del presente estudio cuya GI50 fue de 2,8 µg/ml. Los extractos orgánicos de pared corporal de *Stichopus horrens* y *Holothuria edulis* mostraron actividad frente a A549, GI50=15,5 y 22,2 µg/ml respectivamente, mientras que el extracto acuoso de *H. edulis* presentó menor actividad, GI50=132 µg/ml (Althunibat *et al.*, 2013), lo que indica que estos extractos necesitan concentraciones más altas que nuestro estudio para inhibir el crecimiento tumoral al 50%. En el trabajo de Soltani y Baharara, (2014), el extracto de diclorometano de *H. leucospilota* produjo actividad inhibitoria en células A549 (GI50=50-70 µg/ml). Se encontró cierta actividad antiproliferativa frente a células A549 en los extractos de agua y metanol de *Holothuria tubulosa* (Güneş, 2019), con GI=157,1 y 112,8 µg/ml, respectivamente (con un tiempo de exposición de 48h). Estos valores son mayores a lo que se ha observado en el presente estudio, indicando que los extractos de dicho son menos potentes que los nuestros (diclorometano de HC y metanol de HS: GI50=2,8 y GI50=15 µg/ml, respectivamente). El único trabajo que se ha encontrado de *H. sanctori* (Arslan, 2020) muestra los efectos de altas concentraciones de extracto de metanol y acetona frente a células A549, con valores de GI50 de 3.000 y 2.400 µg/ml que son mucho mayores (menos potentes) a lo que se ha observado con los extractos de diclorometano y metanol de HC y HS del presente estudio que son los que tuvieron actividad frente a células A549 (todos ellos con GI50<35 µg/ml). En este trabajo de Doğangüneş *et al.*, (2021), el extracto de cloroformo de *Holothuria tubulosa* tuvo actividad en células A549 y HeLa (adenocarcinoma cervical) con una IC50 de 493,4 y 176,6 µg/ml, respectivamente, valores mucho más altos, y, por lo tanto, menos activos que en el presente estudio.

El extracto de la mezcla agua y metanol de *Holothuria atra* (Dhinakaran y Lipton, 2014) también mostró actividad contra células HeLa, con una GI50 de 468 µg/ml. El extracto de metanol de *H. leucospilota* del estudio de Baharara *et al.*, (2016), tuvo actividad frente a células HeLa, GI= 50 µg/ml, con 24 horas de exposición al extracto. Estos datos muestran valores mayores al extracto del presente estudio que tuvo actividad frente a células HeLa (diclorometano de HC, GI=6,6 µg/ml), y, por tanto, menos potentes para inhibir el crecimiento del tumor. De la extracción química acetato de etilo: metanol de la pared corporal de *H. leucospilota*, se aislaron tres compuestos: Equinósido A, 24-Dehidroequinósido A y Holotutina A (Shushizadeh, 2019). Estos compuestos inhibieron el crecimiento de células HeLa con valores de GI50 de 10,4; 8,9 y 4,4 µg/ml. Estos últimos valores corresponden a la actividad de compuestos aislados, no de extractos por lo que no se comparan a los obtenidos en el presente trabajo, pero son interesantes para ver que son cifras parecidas a las obtenidas con los extractos de *H. sanctori*. Otro trabajo descubrió que los extractos de acetato de etilo de tracto intestinal de *H. parva* tenían algo

de actividad frente a células HeLa $IC_{50}=45,5 \mu\text{g/ml}$, pero para compararlo con el presente trabajo debemos fijarnos en los extractos de pared corporal cuyas GI_{50} son 120, 130 y $101 \mu\text{g/ml}$ de *H. leucospilota*, *H. parva* y *H. scabra*, respectivamente (Mashjoor *et al.*, 2019). Teniendo en cuenta que el extracto de diclorometano de HC de este estudio tenía una GI_{50} de $6,6 \mu\text{g/ml}$, los anteriores resultados tienen menor potencial anti proliferativo.

Un polisacárido procedente de un extracto de acetona de *Stichopus variegatus* mostró ligera actividad contra células T-47D (carcinoma de conducto mamario invasivo) frente al control, pero con una alta GI_{50} de $400 \mu\text{g/ml}$ (Thinh *et al.*, 2018). Además, el extracto de metanol de *H. scabra* mostró actividad frente a la línea tumoral T-47D, con GI de $152,98 \mu\text{g/ml}$ (Wargasetia y Widodo, 2018). Estos resultados muestran que dichos extractos necesitan concentraciones más altas que el presente estudio para inhibir el crecimiento del tumor en un 50%, ya que el extracto de diclorometano de HC y metanol de HS tuvieron valores de GI_{50} de 3,3 y $13 \mu\text{g/ml}$, respectivamente. El trabajo de Nursid *et al.*, (2019) demostró que el extracto de etanol de *Holothuria atra*, tenía una potente actividad frente a células T-47D, WiDr (adenoma colorrectal) y Hela con GI_{50} de 9,6; 11,4 y $10,4 \mu\text{g/ml}$ respectivamente. En este último trabajo se muestra la única referencia de inhibición de células WiDr con el extracto de una holoturia, dicho dato de GI_{50} ($11,4 \mu\text{g/ml}$) es menor que el extracto de metanol de HS de este estudio ($14 \mu\text{g/ml}$), pero menos potente que el de diclorometano de HC ($1,8 \mu\text{g/ml}$).

Todos estos resultados de extractos de pared corporal de holoturias tomados de la bibliografía disponible hasta el momento son plasmados en la Tabla VII junto con los resultados de los extractos con más actividad del presente estudio.

Tabla VII. Recopilación de extractos de distintas especies de la clase Holothuroidea frente a líneas tumorales de humanos. Para los extractos del presente estudio se indican con números (1-3) los grupos de holoturias según su procedencia: 1- holoturias de cautividad (HC), 2- holoturias de biofiltro (HB), 3- holoturias silvestres (HS). Las letras representan las tablas con las líneas celulares A549 (A), HeLa (B) y T-47D, WiDr, SW1573 y HBL-100 (C). * Denota un tiempo de exposición de 24h en vez de 48h.

A

Cáncer diana	Especie del extracto	Tipo de extracto	GI50 (µg/ml)	Referencia
A549 (Cáncer de pulmón)	<i>Stichopus horrens</i>	Orgánico	15,5	Althunibat <i>et al.</i> (2013)
	<i>Holothuria edulis</i>	Orgánico	22,2	Althunibat <i>et al.</i> (2013)
	<i>Holothuria edulis</i>	Acuoso	132	Althunibat <i>et al.</i> (2013)
	<i>Holothuria leucospilota</i>	Diclorometano	50-70	Soltani y Baharara. (2014)
	<i>Holothuria leucospilota</i>	Proteico	>10	Ru <i>et al.</i> (2022)
	<i>Holothuria tubulosa</i>	Agua	157,1	Güneş (2019)
	<i>Holothuria tubulosa</i>	Metanol	112,8	Güneş (2019)
	<i>Holothuria tubulosa</i>	Cloroformo	493,4	Doğangüneş <i>et al.</i> (2021)
	<i>Holothuria sanctori</i>	Metanol	3.000	Arslan (2020)
	<i>Holothuria sanctori</i>	Acetona	2.400	Arslan (2020)
	<i>Holothuria sanctori</i>	Diclorometano-1	2,8	Presente estudio
	<i>Holothuria sanctori</i>	Metanol-3	15	Presente estudio

B

Cáncer diana	Especie del extracto	Tipo de extracto	GI50 (µg/ml)	Referencia
HeLa (Cáncer de cérvix)	<i>Holothuria tubulosa</i>	Cloroformo	176.6	Doğangüneş <i>et al.</i> (2021)
	<i>Holothuria atra</i>	Agua + metanol	468	Dhinakaran y Lipton (2014)
	<i>Holothuria pavra</i>	Acetato de etilo	130	Mashjoor <i>et al.</i> (2019)
	<i>Holothuria scabra</i>	Acetato de etilo	101	Mashjoor <i>et al.</i> (2019)
	<i>Holothuria leucospilota</i>	Acetato de etilo	120	Mashjoor <i>et al.</i> (2019)
	<i>Holothuria leucospilota</i>	Metanol	50*	Bharara <i>et al.</i> (2016)
	<i>Holothuria atra</i>	Etanol	10,4	Nursid <i>et al.</i> (2019)
	<i>Holothuria sanctori</i>	Diclorometano-1	6,6	Presente estudio

C

Cáncer diana	Especie del extracto	Tipo de extracto	GI50 (µg/ml)	Referencia
T-47D (Cáncer de mama)	<i>Holothuria scabra</i>	Metanol	153	Wargasetia y Widodo (2018)
	<i>Holothuria atra</i>	Etanol	9,6	Nursid <i>et al.</i> (2019)
	<i>Stichopus variegatus</i>	Acetona	400	Thinh <i>et al.</i> (2018)
	<i>Holothuria sanctori</i>	Diclorometano-1	3,3	Presente trabajo
	<i>Holothuria sanctori</i>	Metanol-3	13	Presente trabajo
WiDr (Cáncer de colon)	<i>Holothuria atra</i>	Etanol	11,4	Nursid <i>et al.</i> (2019)
	<i>Holothuria sanctori</i>	Diclorometano-1	1,8	Presente trabajo
	<i>Holothuria sanctori</i>	Metanol-3	14	Presente trabajo
SW1573 (Cáncer pulmón)	<i>Holothuria sanctori</i>	Diclorometano-1	<0,625	Presente trabajo
	<i>Holothuria sanctori</i>	Diclorometano-3	3,4	Presente trabajo
HBL-100 (Cáncer mamario)	<i>Holothuria sanctori</i>	n-Hexano-2 F6	2,7	Presente estudio

Como se puede apreciar en las Tabla VII, el extracto de diclorometano de holoturias de cautividad fue el más activo frente a cinco de las 6 líneas celulares ensayadas, comparando con bibliografía revisada en holoturias. De la línea celular restante, HBL-100, no se han encontrado referencias de efectos citotóxicos de extractos de holoturia, de manera que el primer dato de actividad biológica se ha obtenido en este estudio y se ha conseguido con la fracción F6 del extracto de *n*-hexano de HB con un valor destacable (GI₅₀=2,7 µg/ml). Por ello, adquiere vital relevancia la identificación del producto causante de esta actividad antiproliferativa. Para ello, se debe cromatografiar paso a paso la F6 y aislar los compuestos mayoritarios, igual que se hizo con la F2 y F4, para después testarlos individualmente.

Debido a que sólo hubo tiempo de llevar a cabo el fraccionamiento de un extracto, sería interesante fraccionar los demás que han presentado actividad biológica frente a las líneas celulares de tumores humanos. En cuanto a los posibles compuestos que pueden estar presentes en los extractos, es probable que los extractos de metanol obtenidos en el presente trabajo contengan saponinas. Esa suposición se realiza basándose en los estudios de Caulier *et al.*, (2016), que logró aislar saponinas a partir de una extracción química con metanol, y de Chumphoochai *et al.*, (2019) que obtuvo extractos ricos en saponinas a partir de una extracción con etanol. En consecuencia, por la polaridad de los disolventes que utilizaron los dos estudios anteriores, similar a la del metanol del presente estudio, y sabiendo que las especies de clase Holothuroidea son las principales productoras marinas de saponinas, se cree que puede ser un metabolito secundario presente en los extractos de metanol del estudio.

Las saponinas son de vital relevancia biológica porque participan en procesos de gametogénesis sincronizando la reproducción con la maduración del oocito de holoturoideos (Kalinin *et al.*, 1996). Además, tienen un importante papel como defensa química de las holoturias frente a predadores por su actividad membranotrópica. Su actividad ictiotóxica reside en la capacidad que tienen las saponinas para unirse a esteroides de biomembranas (particularmente al colesterol) formando complejos conductores de iones no selectivos, provocando el flujo de iones, péptidos y nucleótidos. Esto provoca la lisis y muerte celular (Likhatskaya *et al.*, 1985; Careaga, 2011). Este mecanismo quizás podría explicar la actividad citotóxica que los extractos de metanol producen en las células de tumores humanos *in vitro*, ya que los extractos de metanol de HC y HS produjeron una inhibición parcial e incluso total del crecimiento de las líneas tumorales A549, WiDr y T-47D (Fig. 45).

En *H. sanctori* se han aislado 20 saponinas, 12 procedentes de la pared corporal, y 8 de los túbulos de Cuvier, todas ellas no sulfatas, a diferencia de otras especies de holoturias (Caulier *et al.*, 2016). Por ello sería especialmente interesante el estudio de saponinas en los tres grupos de especímenes del presente estudio, ya que puede haber distintos derivados de esta molécula quizás nunca caracterizados químicamente.

Otros metabolitos comunes en extractos de holoturias son los glicoesfingolípidos, como gangliósidos y cerebrósidos. Se ha reportado actividad biológica en estas moléculas, probablemente por su naturaleza anfipática (Zhang *et al.*, 2012). Generalmente estos compuestos están formados por una ceramida (esfingosina + ácido grado) unida a un glúcido monosacárido u oligosacárido (Tan y Chen, 2003; Careaga, 2011). Es posible que los dos compuestos de naturaleza polar la F2 del extracto de *n*-hexano de HB (Fig. 36, tubos 2 y 16) que no se lograron caracterizar químicamente con RMN, pertenecieran a esta familia de moléculas. Esta hipótesis se basa en el hecho de que la parte apolar de estos supuestos glicoesfingolípidos pudo ser arrastrada de la fase estacionaria de la cromatografía por otros ácidos grasos (interaccionando por fuerzas de Van der Waals) de otras grasas de la muestra que se comportan como liposomas. Además, en la TLC estas moléculas pueden haber quedado en el punto de aplicación debido al carácter polar que le confiere la parte glucídica de la molécula (por interacciones de puentes de hidrógeno con el gel de sílice de la fase estacionaria). Esto es apoyado por el hecho de que los gangliósidos y cerebrósidos se suelen presentar como mezclas complejas formando parte de los lípidos polares de la muestra (Careaga, 2011). Por último, como son moléculas de alto peso molecular, tendría sentido pensar que se encontraran en la F2. Pero, para salir de dudas, la única forma de identificar aquellos compuestos es volver a cromatografiarlos y analizarlos.

Lo que sí se ha podido demostrar es que en uno de los extractos (*n*-hexano de HB) se encuentran triglicéridos de cadena larga y poliinsaturados (fracción F2), así como colesterol y un derivado, el 24-metilcolesterol (fracción F4). Respecto al compuesto apolar de la fracción F2 del extracto de *n*-hexano de HB, tiene lógica que el compuesto identificado sea un triglicérido de cadena larga ya que es una molécula grande y F2 posee los compuestos de mayor tamaño molecular. Además, en la TLC se observaba una molécula que migraba considerablemente con la fase móvil, y, por tanto, era altamente apolar (Fig. 35), que también concuerda con la naturaleza del triglicérido. Se han aislado lípidos que han mostrado actividad anticancerígena (Du *et al.*, 2015), por lo que sería importante analizar la actividad de este compuesto aislado. Realmente se debería identificar completamente la molécula para saber si el compuesto ha sido caracterizado anteriormente. Para conocer el número de carbonos se podría hacer una hidrólisis de la molécula con el fin de construir la estructura exacta.

En la fracción F4 del extracto de *n*-hexano de HB se encontraron y aislaron dos compuestos que resultaron ser el colesterol y 24-metilcolesterol. El colesterol es un esterol presente en gran medida en muchos organismos marinos, aislado en especies de pepinos de mar como *Holothuria nobilis* (Zhang *et al.*, 2020), ya que forma parte de las membranas celulares. Sin embargo, el 24-metilcolesterol siendo un metabolito menos común, se ha encontrado en poríferos como *Hymeniacidon heliophila* (Granato *et al.*, 2000). En dicho estudio el colesterol y 24-metilcolesterol se identificaron a partir de un extracto de *n*-hexano cromatografiado con una columna de gel de sílice y un gradiente de acetato de etilo en *n*-hexano, que coincide exactamente con el proceso con el que se consiguió aislar ambos compuestos en el presente trabajo. El presente estudio evidencia la primera vez que se identifican colesterol y 24-metilcolesterol en la especie *Holothuria sanctori*. Sería vital ensayar estos compuestos de manera individual para averiguar si poseen un potencial biológico, lo que podría relacionarse con una función de defensa química por parte del pepino de mar, o solo sean metabolitos estructurales.

Estos son los compuestos mayoritarios del extracto, pero también hay otra variedad de moléculas en menor proporción. Para conocer los compuestos bioactivos habría que caracterizar químicamente todas las moléculas posibles y, posteriormente, probar su actividad frente a cultivos celulares para analizar su potencial biológico.

Conclusiones

1° Se han obtenido 14 extractos procedentes de pared corporal de los tres grupos de *H. sanctori* mediante extracciones químicas de la muestra con disolventes de polaridad diferencial.

2° El análisis de los extractos ha mostrado que las bacterias susceptibles a más número de extractos de *H. sanctori*, de mayor a menor susceptibilidad fueron: *Photobacterium damsela* sbsp. *piscicida* B1, *Vibrio anguillarum* 507, *Streptococcus agalactiae* y *Vibrio parahaemolyticus* CECT 5111. Las bacterias *Vibrio harveyi* 8120, *Vibrio alginolyticus* 521 y *Vibrio vulnificus* CECT 529 se mostraron resistentes a todos los extractos.

3° De los extractos con actividad antimicrobiana que se probaron en cultivos de células de *Sparus aurata* (SAF-1) y *Mus musculus* (N2A) sólo el extracto de diclorometano de holoturias silvestres resultó no ser citotóxico frente a células SAF-1. En cuanto a células N2A, los extractos que no presentaron citotoxicidad fueron los de hexano de holoturias de cautividad y silvestres, diclorometano de holoturias de biofiltro y los extractos acuosos de holoturias de cautividad y biofiltro. Estos extractos inocuos son candidatos idóneos para ser testados como posibles fármacos terapéuticos.

4° De todos los extractos de *H. sanctori*, los de diclorometano y metanol de holoturias de cautividad y silvestres mostraron actividad antiproliferativa frente a las líneas celulares de tumores humanos: A549, HeLA, WiDr, SW1573 y T-47D. El extracto de diclorometano de holoturias de cautividad fue el que mostró mayor actividad frente a todas las líneas tumorales con $GI_{50} < 6,7 \mu\text{g/ml}$.

5° El extracto que causó más mortalidad en células N2A (*n*-hexano de holoturias de biofiltro) fue fraccionado en 6 porciones, siendo la fracción F6 la más activa frente a cáncer de mama (HBL-100) con una $GI_{50} = 2,7 \mu\text{g/ml}$.

6° Del extracto de *n*-hexano de holoturias de biofiltro fraccionado, se aislaron los compuestos mayoritarios y se obtuvo un triglicérido poliinsaturado de cadena larga de la fracción F2 y una mezcla de colesterol y 24-metilcolesterol de la fracción F4.

7° Los resultados obtenidos demuestran que las holoturias de acuicultura presentan compuestos con actividad antineoplásica de los que podrían obtenerse PNM, lo que medioambientalmente es muy favorable al no depender de especímenes silvestres.

Referencias

- Abdelrazek, M. (2020). Experimental trials on reproduction, larval culture, and integrated production of the sea cucumber *Holothuria sanctori* (Delle Chiaje, 1823) (Master's thesis).
- Agafonova, I. G., Aminin, D. L., Avilov, S. A., & Stonik, V. A. (2003). Influence of cucumariosides upon intracellular $[Ca^{2+}]$ and lysosomal activity of macrophages. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(24), 6982-6986.
- Ali, H. A. J., & Tamilselvi, M. (2016). *Ascidians in coastal water: A comprehensive inventory of Ascidian Fauna from the Indian Coast*. Springer.
- Almeida, M., Martins, M. A., Soares, A. M., Cuesta, A., & Oliveira, M. (2019). Polystyrene nanoplastics alter the cytotoxicity of human pharmaceuticals on marine fish cell lines. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 69, 57-65.
- Althunibat, O., Ridzwan, B., Taher, M., Daud, J., Jauhari Arief Ichwan, S., & Qaralleh, H. (2013). Antioxidant and cytotoxic properties of two sea cucumbers, *Holothuria edulis* Lesson and *Stichopus horrens* Selenka. *Acta Biologica Hungarica*, 64(1), 10-20.
- Arslan, N. (2020). *Denizhiyari özütünün anti-tümör etkileri ve geleneksel kemoterapik ilaçlarla sinerjistik etkileşiminin araştırılması* (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Aties López, L., Duret Gala, Y., Tabares Tabío, M., & Fernández Pérez, S. (2017). Los enzibióticos como alternativa terapéutica contra las enfermedades bacterianas. *Medisan*, 21(10), 3077-3083.
- Baharara, J., Amini, E., & Vazifedan, V. (2016). Concomitant use of sea cucumber organic extract and radiotherapy on proliferation and apoptosis of cervical (HeLa) cell line.
- Bakus, J. G (1973). The biology and ecology of tropical holothurians. In: OA Jones and R Edeans (eds.) *Biology and Geology of Coral Reefs Vol. II*, Academic Press, New York, pp. 326–367.
- Blanco, M. D. M., Liébana, P., Gibello, A., Alcalá, C., Fernández-Garayzábal, J. F., & Domínguez, L. (2004). Principales patologías bacterianas en la piscicultura española. *Dpto. de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense*, 28040.
- Bordbar, S., Anwar, F., & Saari, N. (2011). High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods—a review. *Marine drugs*, 9(10), 1761-1805.

Borrero-Pérez, G. H., Gómez-Zurita, J., González-Wangüemert, M., Marcos, C., & Pérez-Ruzafa, A. (2010). Molecular systematics of the genus *Holothuria* in the Mediterranean and Northeastern Atlantic and a molecular clock for the diversification of the Holothuriidae (Echinodermata: Holothuroidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(2), 899-906.

Boyd, C. E., McNevin, A. A., & Davis, R. P. (2022). The contribution of fisheries and aquaculture to the global protein supply. *Food Security*, 1-23.

Bugs, A. R., Calculator, I. P., & Calculator, E. U. Aquarium Invertebrates: Sea Apples by Rob Toonen| Mar 15, 2003| 1 comment.

Bulteel, P., Coulon, P., & Jangoux, M. (2020). Essai d'estimation de la croissance de l'holothuride *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) en aquarium. In *Echinoderm Research* (pp. 155-158). CRC Press.

Caillaud, A., Eixarch, H., De La Iglesia, P., Rodriguez, M., Dominguez, L., Andree, K. B., & Diogène, J. (2012). Towards the standardisation of the neuroblastoma (neuro-2a) cell-based assay for ciguatoxin-like toxicity detection in fish: Application to fish caught in the Canary Islands. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29(6), 1000-1010.

Cao, L., Wang, W., Yang, Y., Yang, C., Yuan, Z., Xiong, S., & Diana, J. (2007). Environmental impact of aquaculture and countermeasures to aquaculture pollution in China. *Environmental Science and Pollution Research-International*, 14(7), 452-462.

Careaga Quiroga, V. P. (2011). *Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos polares de holotureos con potencial actividad biológica* (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).

Carney, R. S., & Carey Jr, A. G. (1982). Distribution and diversity of holothuroids (Echinodermata) on Cascadia Basin and Tufts Abyssal Plain. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 29(5), 597-607.

Caruso, G., Floris, R., Serangeli, C., & Di Paola, L. (2020). Fishery wastes as a yet undiscovered treasure from the sea: Biomolecules sources, extraction methods and valorization. *Marine Drugs*, 18(12), 622.

Caulier, G., Mezali, K., Soualili, D. L., Decroo, C., Demeyer, M., Eeckhaut, I., Gerbaux, P., & Flammang, P. (2016). Chemical characterization of saponins contained in the body wall and the Cuvierian tubules of the sea cucumber *Holothuria (Platyperona) sanctori* (Delle Chiaje, 1823). *Biochemical systematics and ecology*, 68, 119-127.

Chen, J. (2004). Present status and prospects of sea cucumber industry in China. *Advances in sea cucumber aquaculture and management*, 463, 25-38.

- Chumphoochai, K., Chalorak, P., Suphamungmee, W., Sobhon, P., & Meemon, K. (2019). Saponin-enriched extracts from body wall and Cuvierian tubule of *Holothuria leucospilota* reduce fat accumulation and suppress lipogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(8), 4158-4166.
- Costello, C., Cao, L., Gelcich, S., Cisneros-Mata, M. Á., Free, C. M., Froehlich, H. E., & Lubchenco, J. (2020). The future of food from the sea. *Nature*, 588(7836), 95-100.
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1-2), 72-79.
- Cuevas, C., & Francesch, A. (2009). Development of Yondelis® (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem. *Natural product reports*, 26(3), 322-337.
- Cusimano, M. G., Spinello, A., Barone, G., Schillaci, D., Cascioferro, S., Magistrato, A., Parrino, B., Arizza, V., & Vitale, M. (2019). A Synthetic derivative of antimicrobial peptide Holothuroidin 2 from Mediterranean Sea Cucumber (*Holothuria tubulosa*) in the control of *Listeria monocytogenes*. *Marine drugs*, 17(3), 159.
- Darya, M., Sajjadi, M. M., Yousefzadi, M., Sourinejad, I., & Zarei, M. (2020). Antifouling and antibacterial activities of bioactive extracts from different organs of the sea cucumber *Holothuria leucospilota*. *Helgoland Marine Research*, 74(1), 1-13.
- Dhinakaran, D. I., & Lipton, A. P. (2014). Bioactive compounds from *Holothuria atra* of Indian ocean. *SpringerPlus*, 3(1), 1-10.
- Doğangüneş, M., Türker, A., Güneş, H., & Alper, M. (2021). Cytotoxic and Antioxidant Potential of Chloroform Extract of *Holothuria tubulosa* Gmelin, 1791. *Russian Journal of Marine Biology*, 47(6), 498-507.
- Domínguez-Godino, J. A., Slater, M. J., Hannon, C., & González-Wangüermert, M. (2015). A new species for sea cucumber ranching and aquaculture: Breeding and rearing of *Holothuria arguinensis*. *Aquaculture*, 438, 122-128.
- Du, L., Xu, J., Xue, Y., Takahashi, K., Xue, C. H., Wang, J. F., & Wang, Y. M. (2015). Cerebrosides from sea cucumber ameliorates cancer-associated cachexia in mice by attenuating adipose atrophy. *Journal of Functional Foods*, 17, 352-363.
- Esmat, A. Y., Said, M. M., Soliman, A. A., El-Masry, K. S., & Badiea, E. A. (2013). Bioactive compounds, antioxidant potential, and hepatoprotective activity of sea cucumber (*Holothuria atra*) against thioacetamide intoxication in rats. *Nutrition*, 29(1), 258-267.

Fahmy, N. M. (2022). Isolation and characterization of *Vibrio alginolyticus* strain HAT3 causing skin ulceration disease in cultured sea cucumber *Holothuria atra* (Jaeger, 1833). *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 48(1), 75-81.

Falcón, D. G., Alfaro, M. R., Hernández, I. R., Guerrero, P. A., Garrido, G., Sosa, M. Á., & Camps, I. B. B. (2022). Antimicrobial prescriptions in cancer patients: An evaluation based on clinical and pharmacotherapeutic indicators. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 10(3), 562-570.

FAO (2016) Planning for Aquaculture Diversification: The Importance of Climate Change and Other Drivers. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome, Italy.

FAO. (2017). Global aquaculture production dataset 1950–2015 (FishstatJ). Available at: www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/e

FAO (2019) FishstatJ: Fishery and Aquaculture Statistics. Global production by production source 1950–2016 Rome. Updated 2019. Available from URL: <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>

FAO. (2020a). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>

FAO. (2020b). Fisheries and aquaculture statistics. Global aquaculture and fisheries production 1950–2018 (Fishstat). Rome: FAO Fisheries and Aquaculture Department

FAO. (2020c). The state of world fisheries and aquaculture. Rome: FAO. <http://www.fao.org/documents/card/en/c/ca9229en>

FAO. (2022). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Rome. <https://www.fao.org/3/cc0461en/online/sofia/2022/world-fisheries-aquaculture.html>

Feist, S. W., Thrush, M. A., Dunn, P., Bateman, K., & Peeler, E. J. (2019). The aquatic animal pandemic crisis. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 38(2), 437-457.

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, 149(4), 778-789.

García-Beltrán, J. M., Mansour, A. T., Alsaqufi, A. S., Ali, H. M., & Esteban, M. Á. (2020). Effects of aqueous and ethanolic leaf extracts from drumstick tree (*Moringa oleifera*) on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes, and their cytotoxic,

antitumor, bactericidal and antioxidant activities. *Fish & Shellfish Immunology*, 106, 44-55.

Garcia-Davis, S., Reyes, C. P., Lagunes, I., Padron, J. M., Fraile-Nuez, E., Fernandez, J. J., & Diaz-Marrero, A. R. (2021). Bioprospecting Antiproliferative Marine Microbiota from Submarine Volcano Tagoro. *Frontiers in Marine Science*, 8.

Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12827.

Glibert, P. M., Landsberg, J. H., Evans, J. J., Al-Sarawi, M. A., Faraj, M., Al-Jarallah, M. A., Haywood, A., Ibrahim, S., Klesius, P., Powell, C., & Shoemaker, C. (2002). A fish kill of massive proportion in Kuwait Bay, Arabian Gulf, 2001: the roles of bacterial disease, harmful algae, and eutrophication. *Harmful Algae*, 1(2), 215-231.

Gomes, A. R., Freitas, A. C., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. A. (2016). Echinoderms: A review of bioactive compounds with potential health effects. *Studies in Natural Products Chemistry*, 49, 1-54.

Gómez-Archila, L. G., Rugeles, M. T., & Zapata, W. (2014). Actividad antiviral de compuestos aislados de esponjas marinas. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(3), 401-412.

González-Gallego Rivera, I. (2016). Trabectedina (Yondelis): agente antitumoral aislado de la ascidia *Ecteinascidia turbinata*.

González Navarro, P. (2012). *Biología y ecología de las holoturias [Echinodermata: Holothuroidea] de la isla de Gran Canaria (Atlántico Centro-Oriental)* (Doctoral dissertation).

Granato, AC, Berlinck, RG, Magalhães, A., Scheffer, AB, Ferreira, AG, Sanctis, BD, & Migotto, AE (2000). Productos naturales de esponjas marinas *Aaptos* sp., *Hymeniacion* aff. *heliophila* y el nudibranquio *Doris* aff. *verrugoso* *Química Nova*, 23 , 594-599.

Graniel-Sabido, M. J., Mirón-López, G., León-Deniz, L. V., Moo-Puc, R. E., Quintal-Novelo, C. J., Quijano, L., & Mena-Rejón, G. J. (2016). Total NMR assignment of a new antiproliferative triterpene oligoglycoside from the sea cucumber *Astichopus multifidus*. *Tetrahedron Letters*, 57(39), 4375-4378.

Güneş, M. *Holothuria tubulosadan elde edilen özütlerin sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılması* (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).

- Hardiningtyas, S. D. (2009). *Aktivitas antibakteri ekstrak karang lunak Sarcophyton sp. yang difragmentasi dan tidak difragmentasi di perairan Pulau Pramuka, Kepulauan Seribu* (Doctoral dissertation, IPB (Bogor Agricultural University)).
- Haug, T., Kjuul, A. K., Styrvold, O. B., Sandsdalen, E., Olsen, Ø. M., & Stensvåg, K. (2002). Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *Journal of Invertebrate Pathology*, *81*(2), 94-102.
- Hu, Y., Chen, J., Hu, G., Yu, J., Zhu, X., Lin, Y., Chen, S., & Yuan, J. (2015). Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. *Marine drugs*, *13*(1), 202-221.
- Kamyab, E., Kellermann, M. Y., Kunzmann, A., & Schupp, P. J. (2020). Chemical biodiversity and bioactivities of Saponins in Echinodermata with an emphasis on sea cucumbers (Holothuroidea). *YOUMARES 9-the oceans: our research, our future*, 121.
- Kalinin, V. I., Anisimov, M. M., Prokofieva, N. G., Avilov, S. A., Afiyatulloev, S. H., & Stonik, V. A. (1996). Biological activities and biological role of triterpene glycosides from holothuroids. In *Echinoderm studies* (pp. 139-182). CRC Press.
- Khotimchenko, Y. (2018). Pharmacological potential of sea cucumbers. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(5), 1342.
- Kim, D. Y., Shinde, S. K., Kadam, A. A., Saratale, R. G., Saratale, G. D., Kumar, M., Syed, A., Bahkali, A. H., & Ghodake, G. S. (2022). Advantage of Species Diversification to Facilitate Sustainable Development of Aquaculture Sector. *Biology*, *11*(3), 368.
- Kumara, P. A. D. A., Jayanatha, J., Pushpakumara, J., Bandara, W., & Dissanayake, D. C. T. (2013). Artificial breeding and larval rearing of three tropical sea cucumber species—*Holothuria scabra*, *Pseudocolochirus violaceus* and *Colochirus quadrangularis* in Sri Lanka. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin*, *33*, 30-37.
- Likhatskaya, G. N., Yarovaya, T. P., Rudnev, V. S., Popov, A. M., & Anisimov, M. M. (1985). Formation of the complex of triterpene glycoside, holothurin A, with cholesterol in liposomal membranes. *Biophysics*, *30*(2), 391-392.
- Lind, M. J. (2008). Principles of cytotoxic chemotherapy. *Medicine*, *36*(1), 19-23.
- Loeffler, C. R., Bodi, D., Tartaglione, L., Dell'Aversano, C., & Preiss-Weigert, A. (2021). Improving in vitro ciguatoxin and brevetoxin detection: Selecting neuroblastoma (Neuro-2a) cells with lower sensitivity to ouabain and veratridine (OV-LS). *Harmful Algae*, *103*, 101994.

- Manochkumar, J., Doss, C. G. P., Efferth, T., & Ramamoorthy, S. (2022). Tumor preventive properties of selected marine pigments against colon and breast cancer. *Algal Research*, 61, 102594.
- Mashjoor, S., Yousefzadi, M., & Pischevarzad, F. (2019). Assessment of anticancer potential of selected Holothuria species.
- Mattiuzzi, C., & Lippi, G. (2019). Current cancer epidemiology. *Journal of epidemiology and global health*, 9(4), 217.
- Metian, M., Troell, M., Christensen, V., Steenbeek, J., & Pouil, S. (2020). Mapping diversity of species in global aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 1090-1100.
- Mohammadizadeh, F., Ehsanpor, M., Afkhami, M., Mokhlesi, A., Khazaali, A., & Montazeri, S. (2013). Antibacterial, antifungal and cytotoxic effects of a sea cucumber *Holothuria leucospilota*, from the north coast of the Persian Gulf. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 93(5), 1401-1405.
- Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., ... & Boyd, M. (1991). Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 83(11), 757-766.
- Morcillo, P., Esteban, M. Á., & Cuesta, A. (2016). Heavy metals produce toxicity, oxidative stress and apoptosis in the marine teleost fish SAF-1 cell line. *Chemosphere*, 144, 225-233.
- Navarro, P. G., García-Sanz, S., & Tuya, F. (2013). Patrones de abundancia y talla de *Holothuria sanctori*, *Holothuria mammata* y *Holothuria arguinensis* (Echinodermata: Holoturoidea) en la isla de Gran Canaria, Atlántico oriental. *Revista de biología marina y oceanografía*, 48(2), 273-284.
- Ndraha, N., Wong, H. C., & Hsiao, H. I. (2020). Managing the risk of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with oyster consumption: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(3), 1187-1217.
- Norman, R., Crumlish, M., & Stetkiewicz, S. (2019). The importance of fisheries and aquaculture production for nutrition and food security. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 38(2), 395-407.
- Novalés de la Puente, F. D. (2018). Vía de la P53: orígenes, inactivación en cáncer y aproximaciones terapéuticas.

- Nursid, M., Marraskuranto, E., & Chasanah, E. (2019). Cytotoxicity and apoptosis induction of sea cucumber *Holothuria atra* extracts. *Pharmacognosy Research*, *11*(1).
- O'Hara, T., & Byrne, M. (Eds.). (2017). *Australian echinoderms: biology, ecology and evolution*. CSIRO publishing.
- Orellana, E. A., & Kasinski, A. L. (2016). Sulforhodamine B (SRB) assay in cell culture to investigate cell proliferation. *Bio-protocol*, *6*(21), e1984-e1984.
- Park, K., Mok, J. S., Kwon, J. Y., Ryu, A. R., Kim, S. H., & Lee, H. J. (2018). Foodborne outbreaks, distributions, virulence, and antibiotic resistance profiles of *Vibrio parahaemolyticus* in Korea from 2003 to 2016: a review. *Fisheries and Aquatic Sciences*, *21*(1), 1-10.
- Pérez Espadas, A. R. (2014). Evaluación de la actividad citotóxica y componentes del pepino de mar *Isostichopus badionotus* (SELENKA, 1867) del litoral de la península de Yucatán, México (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Pérez-Ruzafa, A. (1984). Estudio sistemático, ecológico y biogeográfico de la Clase Holothuroidea en las Islas Canarias. *Tenerife, España: Universidad de La Laguna, Facultad de Ciencias [Tesis de Licenciatura]*, 46.
- Pettit, G. R., Herald, C. L., Doubek, D. L., Herald, D. L., Arnold, E., & Clardy, J. (1982). Isolation and structure of bryostatin 1. *Journal of the American Chemical Society*, *104*(24), 6846-6848.
- Poh-Sze, C. (2004). Fisheries, trade and utilization of sea cucumbers in Malaysia. *Advances in sea cucumber aquaculture and management*, *463*, 57-68.
- Pulkkinen, K., Suomalainen, L. R., Read, A. F., Ebert, D., Rintamäki, P., & Valtonen, E. T. (2010). Intensive fish farming and the evolution of pathogen virulence: the case of columnaris disease in Finland. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *277*(1681), 593-600.
- Purcell, S. W., Samyn, Y., & Conand, C. (2012). *Commercially important sea cucumbers of the world*. Southern Cross University.
- Raabe, V. N., & Shane, A. L. (2019). Group B streptococcus (*Streptococcus agalactiae*). *Microbiology spectrum*, *7*(2), 7-2.
- Rhyne, A. L., Tlusty, M. F., Szczebak, J. T., & Holmberg, R. J. (2017). Expanding our understanding of the trade in marine aquarium animals. *PeerJ*, *5*, e2949.

Richmond, R. H. (1996). The biology and ecology of sea cucumbers. *A regional management plan for a sustainable sea cucumber fishery for Micronesia*.

Richmond, R., & Martínez, P. C. (1993). Sea cucumber fisheries in the Galápagos Islands: Biological aspects, impacts and concerns. *World Conservation Union (IUCN) Technical Report*.

Rivas, A. J., Lemos, M. L., & Osorio, C. R. (2013). *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a bacterium pathogenic for marine animals and humans. *Frontiers in microbiology*, 4, 283.

Roberts, D., & Bryce, C. (1982). Further observations on tentacular feeding mechanisms in holothurians. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 59(2-3), 151-163.

Romano, G., Almeida, M., Varela Coelho, A., Cutignano, A., Gonçalves, L. G., Hansen, E., Khnykin, D., Mass, T., Ramsak, A., Rocha, M. S., Silva, T. H., Sugni, M., Ballarin, L., & Genevière, A. M. (2022). Biomaterials and bioactive natural products from marine invertebrates: from basic research to innovative applications. *Marine drugs*, 20(4), 219.

Rotter, A., Gaudêncio, S. P., Vasquez, M. I., & Dubnika, A. (Eds.). (2022). *Marine Biotechnology, Revealing an Ocean of Opportunities*. Frontiers Media SA.

Ru, R., Guo, Y., Mao, J., Yu, Z., Huang, W., Cao, X., Hu, H., Meng, M., & Yuan, L. (2022). Cancer Cell Inhibiting Sea Cucumber (*Holothuria leucospilota*) Protein as a Novel Anti-Cancer Drug. *Nutrients*, 14(4), 786.

Ruzafa, A. P., Diego, C. M., & Aránega, J. J. B. (1992). Holoturias (Echinodermata: Holothuroidea) de las Islas Canarias (I): consideraciones generales y orden Aspidochirotida: I. Consideraciones generales y orden Aspidochirotida. *Revista de la Academia Canaria de Ciencias: = Folia Canariensis Academiae Scientiarum*, 4(3), 139-162.

Santafé-Patiño, G., & Quirós-Rodríguez, J. A. (2021). Caracterización de los ácidos grasos y actividad antimicrobiana del extracto en metanol de *Holothuria princeps* (Holothuriida: Holothuriidae). *Revista de Biología Tropical*, 69(1), 36-44.

Satheeshkumar, P., Khan, A. B., & Senthilkumar, D. (2010). Marine organisms as potential supply for drug finding—A Review study. *Middle-east journal of scientific research*, 5(6), 514-519.

Shadi, A., & Oujifard, A. (2019). Antibacterial, cytotoxic and hemolytic activity of *Holothuria parva* sea cucumber from north Persian Gulf. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(10), 5937-5944.

- Shannon, E., & Abu-Ghannam, N. (2016). Antibacterial derivatives of marine algae: An overview of pharmacological mechanisms and applications. *Marine drugs*, 14(4), 81.
- Shi, S., Feng, W., Hu, S., Liang, S., An, N., & Mao, Y. (2016). Bioactive compounds of sea cucumbers and their therapeutic effects. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 34(3), 549-558.
- Shomar, A., Barak, O., & Brenner, N. (2022). Cancer progression as a learning process. *Iscience*, 103924.
- Shushizadeh, M. R. (2019). Phytochemical analysis of *Holothuria leucospilota*, a sea cucumber from Persian Gulf. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 14(5), 432.
- Sibero, M. T., Radjasa, O. K., Bondar, K. G., Simbolon, L. M. I., Meilana, L., & Ayuningrum, D. (2019, July). Antibacterial activity and phytochemical content of *Holothuria atra* from Panjang Island, Jepara, Indonesia. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2120, No. 1, p. 080005). AIP Publishing LLC.
- Slater, M. J., & Carton, A. G. (2009). Effect of sea cucumber (*Australostichopus mollis*) grazing on coastal sediments impacted by mussel farm deposition. *Marine Pollution Bulletin*, 58(8), 1123-1129.
- Soliman, Y. A., Ibrahim, A. M., Tadros, H. R., Abou-Taleb, A. E., Moustafa, A. H., & Hamed, M. A. (2016). Antifouling and antibacterial activities of marine bioactive compounds extracted from some red sea cucumber. *Contemp Appl Sci*, 3, 83-103.
- Soltani, M., & Baharara, J. (2014). Antioxidant and antiproliferative capacity of dichloromethane extract of *Holothuria leucospilota* sea cucumber. *Int J Data Min Bioinform*, 2014, 1-9.
- Stutterd, E., & Williams, G. (2003). The future of bêche-de-mer and trochus fisheries and aquaculture in Australia. *Final report to the Fisheries Resources Research Fund*.
- Subasinghe, R. (2017). World aquaculture 2015: a brief overview. *FAO Fisheries and Aquaculture Report*, (1140).
- Sukmiwati, M., Ilza, M., Putri, A. E., & Sidauruk, S. W. (2020). Antibacterial activity of sea cucumber (*Holothuria atra*) against *Pseudomonas aeruginosa*. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 404, No. 1, p. 012047). IOP Publishing.
- Sun, J., Fang, W., Ke, B., He, D., Liang, Y., Ning, D., & Deng, X. (2016). Inapparent *Streptococcus agalactiae* infection in adult/commercial tilapia. *Scientific reports*, 6(1), 1-11.

- Sun, P., Liu, B. S., Yi, Y. H., Li, L., Gui, M., Tang, H. F., Zhang D. Z., & Zhang, S. L. (2007). A new cytotoxic lanostane-type triterpene glycoside from the sea cucumber *Holothuria impatiens*. *Chemistry & biodiversity*, 4(3), 450-457.
- Tan, R. X., & Chen, J. H. (2003). The cerebrosides. *Natural Product Reports*, 20(5), 509-534.
- Théel, H. (1886). *Report on the Holothurioidea dredged by HMS Challenger during the years 1873-1876*. Johnson Reprint Corporation.
- Thinh, P. D., Ly, B. M., Usoltseva, R. V., Shevchenko, N. M., Rasin, A. B., Anastyyuk, S. D., Malyarenko, O. S., Zvyagintseva, T. N., San, P. T., & Ermakova, S. P. (2018). A novel sulfated fucan from Vietnamese sea cucumber *Stichopus variegatus*: Isolation, structure and anticancer activity in vitro. *International journal of biological macromolecules*, 117, 1101-1109.
- Telahigue, K., Ghali, R., Nouiri, E., Labidi, A., & Hajji, T. (2020). Antibacterial activities and bioactive compounds of the ethyl acetate extract of the sea cucumber *Holothuria forskali* from Tunisian coasts. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 100(2), 229-237.
- Urbute, A., Munk, C., Sand, F. L., Belmonte, F., & Kjaer, S. K. (2022). Trends in incidence and survival from anal cancer and incidence of high-grade anal intraepithelial neoplasia in Denmark. *Cancer epidemiology*, 77, 102099.
- Uthicke, S. (2001). Nutrient regeneration by abundant coral reef holothurians. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 265(2), 153-170.
- Uthicke, S., Byrne, M., & Conand, C. (2010). Genetic barcoding of commercial Bêche-de-mer species (Echinodermata: Holothuroidea). *Molecular Ecology Resources*, 10(4), 634-646.
- Vasan, N., Baselga, J., & Hyman, D. M. (2019). A view on drug resistance in cancer. *Nature*, 575(7782), 299-309.
- Wargasetia, T. L., & Widodo, N. (2018). PO-408 Methanol extract of *Holothuria scabra* inhibits cell growth and induces apoptosis in T47D breast cancer cells. *ESMO Open*, 3, A182-A183.
- Yasman, S., Yanuar, A., Tamimi, Z., & Rezi Riadhi, S. (2020). In Silico Analysis of Sea Cucumber Bioactive Compounds as Anti-Breast Cancer Mechanism Using AutoDock Vina. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(1), 1-8.

Yun, N. R., & Kim, D. M. (2018). *Vibrio vulnificus* infection: a persistent threat to public health. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 33(6), 1070.

Zhang, J. J., Dai, J. B., Chen, L. L., Ding, P. Y., & Wu, J. (2008). Chemical constituents from sea cucumber *Holothuria nobilis*. *Zhong yao cai= Zhongyaocai= Journal of Chinese Medicinal Materials*, 31(4), 538-539.

Zhang, B., Xue, C., Hu, X., Xu, J., Li, Z., Wang, J., ... & Wang, Y. (2012). Dietary sea cucumber cerebroside alleviates orotic acid-induced excess hepatic adipogenesis in rats. *Lipids in health and disease*, 11(1), 1-9.

Zhang, X. H., He, X., & Austin, B. (2020). *Vibrio harveyi*: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. *Marine life science & technology*, 2(3), 231-245.

Zhao, Y. C., Xue, C. H., Zhang, T. T., & Wang, Y. M. (2018). Saponins from sea cucumber and their biological activities. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(28), 7222-7237.

ANEXO I

Medios de cultivo y soluciones de las líneas celulares SAF-1 y N2A.

SAF-1

- Medio de cultivo celular líquido Leibovitz's L-15.
- FBS de la marca Biowest. Se le añade un 5% o un 2% de FBS al medio.
- Tripsina de páncreas porcino Sigma 10x diluida hasta 2x.
- Penicilina-Estreptomicina Biowest al 1%.

N2A

- Medio de cultivo celular líquido Roswell Park Memorial Institute (RPMI).
- FBS de la marca Biowest. Se le añade un 10% o un 5% de FBS al medio.
- Tripsina de páncreas porcino Sigma 10x diluida hasta 1x.
- Glutamina Biowest al 1%
- Piruvato Biowest al 1%
- Penicilina-Estreptomicina Biowest al 0,5%