



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Efecto de la sonicación del fucoïdan Vitalg® de
Lessonia trabeculata sobre su actividad citotóxica in
vitro**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Para optar el Grado Académico de Bachiller en Microbiología y
Parasitología

AUTOR

Daniel ENRIQUE HUARAC

ASESOR

Erasmus Honorio COLONA VALLEJOS

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Enrique, D. (2022). *Efecto de la sonicación del fucoïdan Vitalg® de Lessonia trabeculata sobre su actividad citotóxica in vitro*. [Trabajo de investigación de bachiller, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Daniel Enrique Huarac
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	76855981
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-1471-9633
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Erasmo Honorio Colona Vallejos
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	09438212
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-9759-288X
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Enrique Walter Mamani Zapana
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	02414092
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Priscila Rosse Mamani Zapana
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	43058540
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Carmen Amelia Pantigoso Flores
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08565770
Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.2.2. Principios Bioactivos
Grupo de investigación	MODULANS
Agencia de financiamiento	

	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa de Promoción de Trabajo de Investigación para obtener el grado académico de bachiller (RR N° 015156-2020-R/UNMSM; Código: B20100030a).
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Laboratorio: Inmunología País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado de Lima Latitud: -12.05819 Longitud: -77.01891
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2020 - 2021
URL de disciplinas OCDE	Inmunología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.03 Oncología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.02.21



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER EN MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN)**

Siendo las 14:03 horas del 26 de abril de 2022, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue <https://zoom.us/j/95469214836?pwd=ckc0VUFVcjUxNHZ2SWZmTzE3UjZlQT09>, y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Grado Académico de Bachiller en Microbiología y Parasitología (Modalidad: Trabajo de Investigación)** de **DANIEL ENRIQUE HUARAC**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20220006038, el graduando expuso su Trabajo de Investigación: **“EFECTO DE LA SONICACIÓN DEL FUCOIDAN VITALG® DE *Lessonia trabeculata* SOBRE SU ACTIVIDAD CITOTÓXICA IN VITRO”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18, calificativo: Aprobado con mención honrosa.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Grado Académico de Bachiller en Microbiología y Parasitología (Modalidad: Trabajo de Investigación)** a **DANIEL ENRIQUE HUARAC** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo grado, conforme a ley.

Siendo las 16:15 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 26 de abril de 2022.

Dr. ENRIQUE MAMANI ZAPANA
(PRESIDENTE)



Firmado digitalmente por COLONA
VALLEJOS Erasmo Honorio FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 26.04.2022 17:38:18 -05:00

Mg. ERASMO COLONA VALLEJOS
(ASESOR)

Mg. CARMEN PANTIGOSO FLORES
(MIEMBRO)

Mg. PRISCILA MAMANI ZAPANA
(MIEMBRO)

Este Trabajo de Investigación se desarrolló en la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM específicamente dentro del Laboratorio de Inmunología con la subvención del Programa de Promoción de Trabajo de Investigación para obtener el grado académico de bachiller para los estudiantes de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) (RR N° 015156-2020-R/UNMSM; Código: B20100030a).

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor Colona Vallejos Erasmo magister y profesor de Inmunología de la universidad, por los conocimientos y consejos otorgados en el transcurso de mi integración al grupo de laboratorio.

A la ilustre doctora y profesora de Inmunología Alzamora Gonzales Libertad, al incorporarme al grandioso grupo de investigación como es el Laboratorio de Inmunología (LI).

A la Mg. Mamani Zapana Priscila Rosse, por guiarme y ayudarme durante el trabajo de investigación.

A Rosa María Condori Macuri y Raisa Cruz Riquelme por apoyarme, guiarme y aconsejarme durante la experimentación, además de capacitarme en las metodologías con el fin de realizar un correcto desarrollo del trabajo de investigación.

Asimismo, agradecer a mis colegas del LI como son: Gary, Estela, Edson, Diego, Fabrizio, Antonella, Kevin y Efraín, debido a las experiencias y anécdotas transmitidas entre nosotros en el transcurso de las horas dentro del laboratorio.

A mis compañeros de universidad: Daniel Espejo, Jackeline Ruiz, Estela Urbina, Anthony Egusquiza, Yimi Loarte, Lucero Alva, Nataly Torres, Daniela Estrada, Manuel Inga y Daniel Chuquillanqui a quienes aprecio mucho y agradezco su confianza durante muchos años.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMEN

ABSTRACT

I) INTRODUCCIÓN	1
II) HIPÓTESIS.....	6
III) OBJETIVOS	6
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	6
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
IV) ESTADO DEL CONOCIMIENTO.....	6
V) MÉTODOS	12
5.1 Obtención del fucoïdan VITALG® de <i>Lessonia trabeculata</i>	12
5.2 Preparación y sonicación del fucoïdan VITALG® de <i>Lessonia trabeculata</i>	12
5.3 Línea celular murina	13
5.4 Determinación de la citotoxicidad mediante la técnica de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)	13
5.5 Análisis estadístico.....	15
VI) RESULTADOS	15
6.1 Evaluación del efecto citotóxico del fucoïdan sonicado de <i>Lessonia trabeculata</i> mediante la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).....	15
6.2 Determinación de la concentración media inhibitoria (IC ₅₀)	17
VII) DISCUSIÓN	18
VIII) CONCLUSIONES	22
VIX) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

LISTA DE ABREVIATURAS

FLt: Fucoïdan de *Lessonia trabeculata*

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

IC₅₀: Concentraci3n inhibitoria media

FLts: Fucoïdan de *Lessonia trabeculata* sonicado

4T1: Lnea celular de carcinoma mamario murino

MW: Peso molecular

RPMI: Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute

rpm: Revoluciones por minuto

CO₂: Di3xido de carbono

DMSO: Dimetilsulf3xido

VC: Viabilidad celular

h: Horas

RESUMEN

La sonicación expone las ondas acústicas a una frecuencia determinada que se expanden y colapsan generando la cavitación en medio líquido. La degradación o despolimerización por ultrasonido del fucoïdan nativo de algas pardas de alto peso molecular en moléculas de bajo peso molecular potencia sus efectos anticancerígenos. El objetivo principal del estudio era evaluar el efecto de la sonicación del fucoïdan VITALG® de *Lessonia trabeculata* sobre su actividad citotóxica en el carcinoma mamario murino 4T1 (línea celular). El fucoïdan de *Lessonia trabeculata* (FLt) fue sonificado a 55 W y 60% de amplitud durante 8 ciclos de pulsos de 1 minuto en baño de hielo. La actividad citotóxica se evaluó por medio del ensayo de reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) y se calculó la concentración media inhibitoria (IC₅₀). El FLt sonificado (FLt_s) disminuyó significativamente la viabilidad celular a la IC₅₀ de 0.1641 µg/mL. Además, el efecto citotóxico produjo cambios en la morfología y desprendimiento de las células. Se concluye que la sonicación del fucoïdan de *L. trabeculata* mejora los efectos citotóxicos e inhibe la proliferación de las células de carcinoma mamario murino 4T1 *in vitro*.

Palabras clave: *Lessonia trabeculata*, fucoïdan, sonicación, citotoxicidad, células 4T1.

ABSTRACT

Sonication exposes acoustic waves to a certain frequency that expand and collapse generating cavitation in a liquid medium. Ultrasonic degradation or depolymerization of native fucoidan from high molecular weight brown algae into low molecular weight molecules increase its anticancer effects. The main objective of the study was to evaluate the effect of the sonication of fucoidan VITALG® from *Lessonia trabeculata* on its cytotoxic activity in murine mammary carcinoma 4T1 (cell line). *Lessonia trabeculata* fucoidan (FLt) was sonicated at 55 W and 60% amplitude for 8 pulse cycles of 1 minute in ice bath. Cytotoxic activity was assessed by the 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazole (MTT) bromide metabolic reduction assay and the mean inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated. The sonicated FLt (FLt_s) significantly decreased cell viability at an IC₅₀ of 0.1641 µg / mL. Furthermore, the cytotoxic effect produced changes in the morphology and shedding of the cells. It's concluded that the sonication of *L. trabeculata* fucoidan improves the cytotoxic effects and inhibits the proliferation of 4T1 murine mammary carcinoma cells *in vitro*.

Keywords: *Lessonia trabeculata*, fucoidan, sonication, cytotoxicity, 4T1 cells.

I) INTRODUCCIÓN

El cáncer de seno o mamario se considera una de las neoplasias diagnosticadas más ocurrentes del mundo y responsable esencial en la defunción de féminas entre 35 a 54 años de edad (Ferlay *et al.*, 2018).

La incidencia del cáncer en el 2020 reportó 19 292 789 casos y se predice que para el año 2040 se produzca un incremento a 28 887 940 nuevos casos. Durante el año 2020, el cáncer de mama en mujeres a nivel global registró el primer lugar con una incidencia de 2 261 419 casos (24.5%) y una mortalidad de 684 996 muertes (15.5%) respecto a otras neoplasias, mientras que en el Perú se reportó una incidencia de 6 860 casos (18.5%) y una mortalidad de 1 824 muertes por cada 100,000 habitantes (9.8%) (GLOBOCAN 2020) (Figura 1).

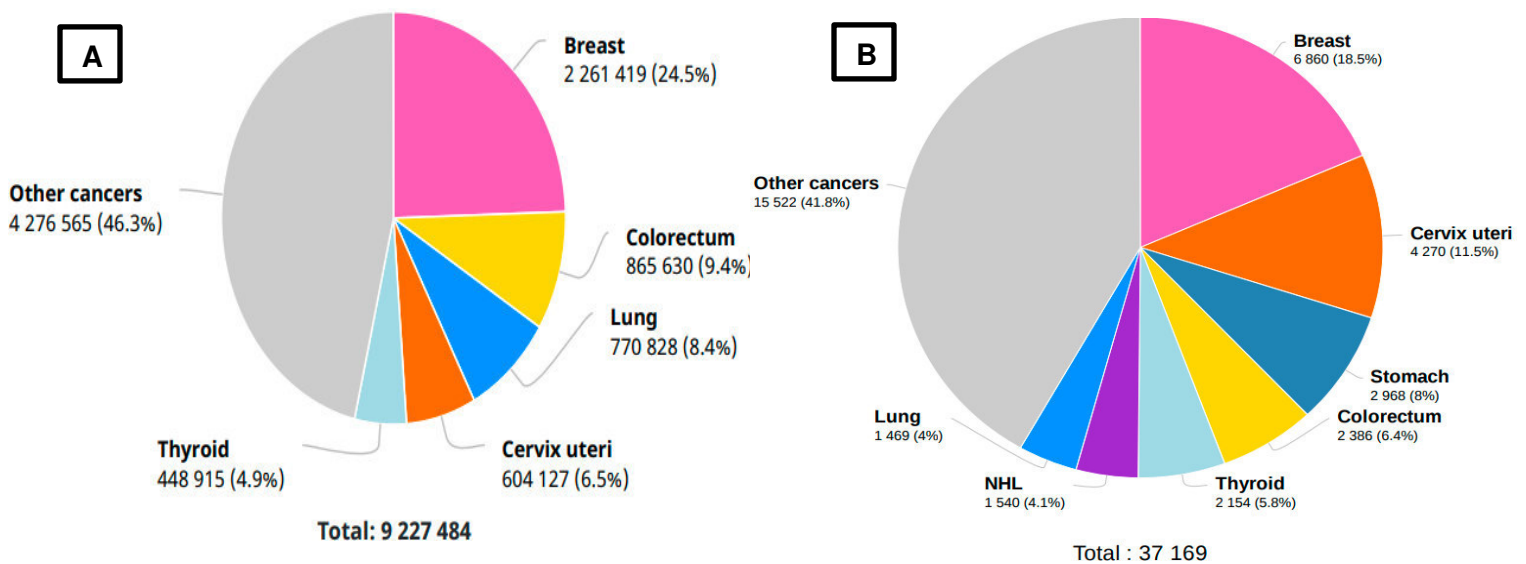


Figura 1. Números estimados de nuevos casos de mujeres a nivel global y en el Perú en todos los tipos de cáncer durante 2020. (A) Incidencia de cáncer global. (B) Incidencia de cáncer en el Perú.

Si bien la mayor parte de los cánceres de seno o mama tienden ser no heredados y su prevención es inadmisibles, su aumento de casos está asociado con cambios en los factores de riesgo, como la

obesidad , la exposición a la radiación ionizante, el consumo de alcohol, la prolongada exposición de la mujer a los estrógenos endógenos (menopausia tardía ,menarquia precoz, edad tardía del primer embarazo o nuliparidad), la terapia hormonal sustitutiva especialmente con el acoplamiento de estrógenos y progestágenos , el sedentarismo y el envejecimiento (Oliva *et al.*, 2015; Merino *et al.*, 2017). También, depende de otros factores no modificables, siendo los registros personales y familiares con relación al cáncer de seno o mama, la etnia o las mutaciones genéticas hereditarias como los genes *Breast Cancer A1* y *A2* (*BRCA1*, *BRCA2*). No obstante, se demostró que los cánceres de seno no poseen una conducta biológica parecida, debido a que las mujeres enfermas muestran distintos efectos en los tratamientos y variados resultados clínicos, aun cuando son diagnosticadas en un similar estadio tumoral. Actualmente las técnicas genómicas confirman la existencia de una conexión entre el perfil de expresión genética del tumor y la evolución natural del cáncer de mama en las mujeres (Merino *et al.*, 2017).

A pesar de décadas de investigación clínica, epidemiológica y de laboratorio, la incidencia del cáncer de mama sigue aumentando y sigue siendo la principal causa de morbilidad relacionada con el cáncer para las mujeres, afectando a una de cada 20 mujeres en todo el mundo y a una de cada ocho mujeres en los países de altos ingresos (Britt *et al.*, 2020)

Los tratamientos regularmente están basados en esquemas de quimioterapia, empleándose como tratamientos la terapia adyuvante y neoadyuvante previa o posteriormente de una cirugía con la finalidad de reducir la posibilidad de reincidencia de micrometástasis (Martín *et al.*, 2015). Por ejemplo, la quimioterapia neoadyuvante (QN) el cual es uno de las terapias mayor utilizadas en hacer frente al cáncer de seno o mama, debido a que es la primera opción de tratamiento contra el cáncer de mama avanzado aplicando el uso simultáneo o secuencial de antraciclina (doxorubicina o epirubicina) más taxanos (paclitaxel o docetaxel) aceptados por ser más eficaces

(Ramírez *et al.*, 2015). Siendo la doxorubicina un fármaco muy utilizado frente a una amplia variedad de tumores por ser activo, su utilización es limitada dado que genera un riesgo considerable de daño cardíaco, por ello se pretende restringir la dosis acumulada por todo el tiempo que alguien viva y así reducir el daño (Bosó , 2016). Por más que tenga una actividad antitumoral extraordinaria, produce toxicidades agudas incluso sobre las células normales (Anand *et al.*, 2008; Lenihan *et al.*, 2012).

Estos medicamentos ejercen un daño en el ADN como las antraciclinas que se intercalan en medio de las bases del ADN y generan cambios en la transcripción y replicación proteica. Asimismo, también causan la inhibición de la enzima topoisomerasa tipo II la cual conserva la estructura terciaria del ADN, generando la rotura del ADN y alterando los procesos de reparación (muerte celular). Además , ejercen también una alteración en la membrana celular ocasionando la unión a proteínas específicas, como es la cardiolipina, la cual induce la producción de radicales libres, quienes son responsables de la cardiotoxicidad de estos compuestos (Benedí *et al.*, 2006) o se conducen los medicamentos a las vías de señalización como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) ocasionando una señalización inapropiada debido a la desregulación de la activación del receptor o sobreexpresión del receptor, pudiendo ocasionar el aumento de una proliferación celular sin control, la reducción de la apoptosis (muerte celular programada) y la angiogénesis (Arteaga *et al.*, 2012; Gamaleri, 2015). Por ese motivo los fármacos utilizados se pueden administrar de forma conjunta con el objetivo de disminuir así la toxicidad que presentan algunos.

Además, el tratamiento del cáncer en estadios tempranos o crónicos representan costos elevados e inalcanzables para la población como por ejemplo una inyección del anticuerpo monoclonal trastuzumab utilizado contra el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano en la

terapia del cáncer de mama (cáncer de mama Her2+) o como preventivo para su reaparición significaría un costo de S/. 5,200, mientras que el tratamiento de 18 ciclos o la duración de la terapia podría llegar a costar S/. 83,706.40 (OXFAM 2019).

En los últimos años las algas marinas han sido consideradas una fuente sostenible de compuestos bioactivos para la salud humana, por lo que países como China, Taiwán, Corea, Japón entre otros, donde se consumen algas marinas de manera regular, presentan significativamente menos casos de enfermedades relacionadas con la dieta y el estilo de vida, especialmente como el caso de la diabetes tipo 2, la obesidad, el cáncer y el síndrome metabólico (Shannon *et al.*, 2019).

No obstante, podemos apreciar que la mayoría de los compuestos usados en la farmacología se aíslan de microorganismos y plantas, pero la resistencia a los medicamentos y la identificación de nuevas enfermedades han impuesto la selección de nuevas fuentes y áreas de aplicación de estos compuestos como en el caso del cáncer, donde se han utilizado ampliamente las algas como fuente de moléculas como polisacáridos, pigmentos, terpenoides, alcaloides, polifenoles, péptidos y ácidos grasos poliinsaturados, que muestran diversas actividades biológicas (Dmytryk *et al.*, 2017)

Es por ello, por lo que el medio marino se ha convertido en una fuente prometedora de productos naturales, moléculas y medicamentos de uso terapéutico (Malve *et al.*, 2016). Debido a esto se generó un colosal interés por producir agentes terapéuticos anticancerígenos más tolerables o averiguar un tratamiento eficiente y alternativo para mermar la dosis de los agentes quimioterapéuticos basándose en insumos de la naturaleza (Bandyopadhyay *et al.*, 2010).

Entre los diversos metabolitos de las algas marinas se encuentra el fucoídano que es un homo o heteropolisacárido compuesto principalmente de fucosa y grupos sulfato, soluble en agua que se obtiene principalmente de la matriz extracelular de algas pardas (Zaporozhets *et al.*, 2016 ; Luthuli *et al.*, 2019) y presenta efectos antitumorales, antioxidantes, anticoagulantes, antitrombóticos,

inmunorreguladores, antivirales, antiinflamatorios, neuroprotectivos, protector gástrico entre otros (Wang *et al.*, 2019; Pacheco *et al.*, 2020). Estas bioactividades presentes en los fucoidanos están relacionadas con el peso molecular, la composición de monosacáridos, el grado de sulfatación, la estructura (enlaces glucosídicos, el grado de ramificación y sustitución, la conformación de la cadena, entre otros), el ambiente, el origen del alga (cultivo o cosecha), la época del año, entre otros (Lu *et al.*, 2018).

Los fucoidanos cambian con su peso molecular y generalmente se clasifican como fucoidan de bajo peso molecular (menor de 10 kDa), fucoidan de mediano peso molecular (entre 10-10,000 kDa) y fucoidan de alto peso molecular (mayor de 10,000 kDa) (Aquib *et al.*, 2019) donde se ha determinado que fucoidanos de bajo y mediano peso molecular con mayor contenido de residuos de fucosa y grupos sulfato presentan mayor actividad biológica que el fucoidan nativo (Aquib *et al.*, 2019). Además, el peso molecular, la tasa de producción del fucoidan y el perfil farmacológico pueden variar dependiendo de los métodos de extracción (agua caliente, ácida, etanol, alcalina, enzimático, microondas, ultrasonido, presión líquida, entre otros) (Tsai *et al.*, 2017). Se ha comprobado que la extracción de fucoidan mediante ultrasonido en comparación con otros métodos presenta un mayor contenido de fucosa, rendimiento y coloración más clara (Hanjabam *et al.*, 2019).

En el Perú se cuenta con el alga parda *Lessonia trabeculata* y con la empresa PSW S.A que se dedica al cultivo y procesamiento de la materia prima para la obtención de fucoidan. Además, se ha realizado la caracterización del fucoidan de *L. trabeculata* (Qu *et al.*, 2014; Apumayta 2019) y se ha comprobado según estudios preliminares por el Grupo de Investigación Inmunomoduladores y Antitumorales de Origen Natural y Sintético (GI MODULANS) liderado por la Dra. Libertad Alzamora en asociación con la empresa PSW S.A. que el fucoidan nativo de *Lessonia trabeculata*

posee efecto inmunomodulador y citotóxico *in vitro* y *ex vivo* (Horna 2018; Elugo 2019; Oroya 2019; Colona *et al.*, 2019; Rios 2020). Sin embargo, es importante realizarnos la siguiente pregunta ¿el tratamiento de sonicación del fucoïdan VITALG® mejorará su capacidad citotóxica a bajas dosis sobre células tumorales 4T1?

II) HIPÓTESIS

La sonicación del fucoïdan VITALG® del alga parda *Lessonia trabeculata* incrementa su actividad citotóxica sobre la línea de carcinoma mamario murino 4T1.

III) OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la sonicación del fucoïdan VITALG® de *Lessonia trabeculata* sobre su actividad citotóxica en la línea celular de carcinoma mamario murino 4T1.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Elaborar un protocolo para el proceso de sonicación del fucoïdan VITALG®.

3.2.2 Evaluar el efecto citotóxico de la sonicación del fucoïdan VITALG® sobre células de carcinoma mamario murino 4T1.

IV) ESTADO DEL CONOCIMIENTO

El cáncer de mama es una proliferación maligna de las células epiteliales que recubren los lóbulos (glándulas generadoras de leche) o los conductos de la mama (canales transportadoras de leche de los lobulillos mamarios hacia el pezón) (Lippman 2016); asimismo se puede definir al cáncer de mama como una de las tipologías más frecuentes en mujeres basado en una multiplicación veloz, desenfrenada e incontrolable de las células que poseen genes mutados, los cuales operan comúnmente en suprimir o estimular el ciclo celular en diferentes tejidos presentes

en el seno o mama (Ramírez *et al.*, 2018; Ramos *et al.*, 2015) o también se define como la relación mutua entre los factores de riesgo ambientales y hereditarios que ocasionan una aglomeración creciente de alteraciones epigenéticas y genéticas sobre las células del tejido mamario, por ejemplo el inactivar los genes reparadores del ADN (DeVita *et al.*, 2015). La adición de un grupo metilo (metilación) hacia algunos genes presentes en el cáncer de seno tienden a generar lesiones premalignas, lo cual significa el surgimiento de cambios acelerados en la tumorigénesis del cáncer (Wiechmann *et al.*, 2008).

Dentro del cáncer de seno se localizan unos marcadores moleculares los cuales son empleados en la evaluación del pronóstico y en el establecimiento del tratamiento, estos son: receptor de progesterona (PgR), receptor de estrógeno (ER) y los receptores de factores de crecimiento epidermal (EGFR) teniendo al receptor de crecimiento epidermal-2 (HER-2) como el más importante.

Se ha evidenciado además que los genes *BRCA1* y *BRCA2* supresores de tumores con mutaciones son relacionadas con el cáncer de seno severamente (DeVita *et al.*, 2015).

Existen diversos subtipos del cáncer de seno, por ejemplo, el triple negativo el cual es tomado en cuenta como uno de los más agresivos y con el peor pronóstico; además, representa un porcentaje entre el 17-20% con respecto a todos los cánceres de seno. Encima, este subtipo no expresa el PgR, ER y HER-2 por ese motivo es imposible tratarla con una terapia hormonal específica y dirigida a los marcadores, esto implica tener un elevado riesgo de metástasis y reaparición de tumores (recidiva tumoral) (Merino *et al.*, 2017).

Estas células provenientes del cáncer de seno consiguen dispersarse por medio de los vasos linfáticos o la sangre hasta llegar a distintas áreas de la persona, para anexarse a los tejidos y

desarrollarse, generando la metástasis en mujeres como hombres, pero más a mujeres ya que acontecen el 99% de los casos (SEOM 2020).

Ante esta neoplasia global como es el cáncer de mama el fucoidan posee una bioactividad antioxidante natural extraordinaria con atributos anticancerígenos ante distintas variedades de cáncer *in vivo* e *in vitro* y manifiesta diversos medios de acción inhibiendo las células tumorales (Kwak *et al.*, 2014). Esta molécula, se compone de un esqueleto de fucosa con grupos sulfato, cuya variación es importante para la funcionalidad del polisacárido. Así mismo la estructura del fucoidan varía según la especie, la estación, la ubicación y la madurez de las macroalgas pardas (Fletcher *et al.*, 2017). Además, debemos resaltar la importancia de las técnicas empleadas en la extracción del fucoidan como etanol (Lorbeer *et al.*, 2015; Anastyuk *et al.*, 2017), agua caliente (Alboofetileh *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020), alcalina (Carson *et al.*, 2018), ultrasonidos entre otras (Hanjabam *et al.*, 2019; Hmelkov *et al.*, 2018).

Cabe mencionar que el fucoidan es un compuesto de alto peso molecular, por lo tanto, su aplicación en la administración de fármacos es limitada, por lo que las investigaciones se centran en los fucoidanos de bajo peso molecular (LMWF) altamente activos que pueden obtenerse por hidrólisis ácida parcial o por degradación de grandes moléculas, utilizando para este fin técnicas innovadoras como microondas o ultrasonido durante el proceso de extracción, los cuales pueden causar modificaciones estructurales, como desulfatación, desramificación o degradación, que pueden dar como resultado distintas propiedades biológicas en comparación con los fucoidanos intactos o nativos (García *et al.*, 2018).

La utilización de estas técnicas innovadoras como la sonicación o ultrasonido ocurren por medio de un proceso de exposición de ondas acústicas a una frecuencia específica, estas ondas son producidas por la transferencia de corriente eléctrica. Las ondas de ultrasonido, en medio líquido,

originan una amplia gama de burbujas microscópicas que se expanden y colapsan (cavitación) sobre las células generándose una ruptura en la pared celular. Se evidencio experimentalmente que utilizar ultrasonido a baja frecuencia produce un elevado daño celular algal, inclusive el daño es mayor de lo que generan las ondas de alta frecuencia (Salazar 2012). Además, los métodos de extracción basados en energía vibratoria como los asistidos por ultrasonido incrementan el rendimiento de producción, la composición monomérica y las bioactividades del fucoïdan (Zayed *et al.*, 2020).

Debemos recalcar que las actividades de los polisacáridos dependen del peso molecular (MW), el número de grupos sulfato y la proporción molar de sulfato/azúcar total (Zha *et al.*, 2016; Vishchuk *et al.*, 2011). Del mismo modo es importante mencionar que el rendimiento de la sonicación ha demostrado depender del peso molecular del polisacárido, la potencia del ultrasonido y el número de pulsos (Yu *et al.*, 2015). La degradación ultrasónica usada para la despolimerización de fucoïdan nativo de alto peso molecular de las algas pardas se caracteriza por una alta tasa de descomposición de moléculas grandes con un reducido peso molecular. Se asume que la ruptura de cadenas poliméricas como resultado de la sonólisis no es aleatoria, sino que ocurre en el medio de la molécula, con mayor efecto cuando se expone a ultrasonidos de baja frecuencia. También se encontró que los polisacáridos se despolimerizan más rápidamente en soluciones diluidas con un grado alto de degradación cuando se produce un incremento en la duración de la exposición ultrasónica. Por tanto, la destrucción ultrasónica es un método sencillo y eficaz de despolimerización de polisacáridos (Suprunchuk *et al.*, 2019).

Asimismo, la degradación de oligosacáridos de fucoïdan por ultrasonido se incrementa con el aumento de la potencia ultrasónica, temperatura de reacción y disminución del valor de pH inicial de la solución, no produciendo cambios en la estructura principal de los polisacáridos (Zhu *et al.*,

2021). Las bioactividades de los polisacáridos crudos o nativos de alto peso molecular presentan dificultades en la difusión a través de la membrana basal para ejercer sus efectos *in vivo* (Zha *et al.*, 2016), por lo que la degradación de fucooidanos de alto peso molecular en fucooidanos de bajo peso molecular incrementaría su bioactividad con propiedades farmacocinéticas más favorables, sin embargo, la degradación del fucooidan crudo a LMWF a menudo conduce a la pérdida de bioactividad aunque estaría relacionado al método de extracción empleado (van Weelden *et al.*, 2019).

La degradación del fucooidan de *Sargassum fulvellum* mediante la técnica de ultrasonido-irradiación en presencia de peróxido de hidrógeno produjo fucooidan de bajo peso molecular (LMWF) sin alterar los grupos sulfato en los azúcares. Además, los LMWF mostraron actividad antitrombótica dependiendo de la concentración y peso molecular y, baja toxicidad en células endoteliales humanas de cordón umbilical (Jo *et al.*, 2014). Del mismo modo, se demostró que la degradación controlada de los polisacáridos de *Laminaria japonica* mediante ultrasonido combinado con H₂O₂ aumenta la actividad antioxidante respecto a los polisacáridos nativos (Zha *et al.*, 2016). También demostraron que el fucooidan crudo de *Sargassum muticum* obtenido mediante tratamiento hidrotérmico y sometido a poshidrólisis ácida y ultrasonido aumenta el contenido de monosacáridos, produce la despolimerización del fucooidan crudo sin alterar el contenido de azúcares o sulfatos e incrementan sus propiedades antioxidantes y citotóxicas contra las líneas celulares de cáncer de pulmón A549 y cáncer de colon HCT-116 (Flórez *et al.*, 2017).

Los fucooidanos de *Nizamuddinia zanardinii* aislados mediante métodos enzimáticos, ultrasonido y enzimático-ultrasonido presentan propiedades estimulantes y citotóxicas en macrófagos, células de carcinoma epitelioide de cuello uterino humano (HeLa) y carcinoma de hepatocitos humanos (HepG₂) (Alboofetileh *et al.*, 2019).

Los efectos de la degradación parcial por irradiación de ultrasonidos en los polisacáridos de *Sargassum pallidum* (SpPS) indican una disminución significativa en el peso molecular (MW) y el tamaño de partícula (Z_{avg}) de la SpPS nativa, generando variaciones sobre las propiedades fisicoquímicas, reológicas y antioxidantes. La estructura primaria de SpPS antes y después de la degradación por ultrasonidos no cambió, pero la morfología de SpPS nativa era diferente de la de las fracciones de SpPS degradadas. El análisis reológico indicó que las soluciones de SpPS degradadas exhibieron viscosidades más bajas que la solución de SpPS nativa a la misma concentración. Cuando la SpPS se trató con ultrasonidos a 300, 400 y 500 W durante 1 h, los MW de SpPS se redujeron de 953 kDa a 946.23, 908.53 y 510 kDa, respectivamente. Sugiriendo así que una mayor potencia ultrasónica generaba un mayor efecto de degradación reduciendo el peso molecular gradualmente. Posteriormente se trató a 500 W por 10 h y el MW de SpPS se redujo significativamente de 953 kDa a un valor límite de 82 kDa. Además, el Z_{avg} de SpPS se redujo significativamente de 896 a 316 nm. Además, la degradación por ultrasonido no cambio significativamente la composición de monosacáridos de SpPS. La degradación ultrasónica mejoró la actividad antioxidante y la bioactividad de los polisacáridos de la SpPS nativa (Yuan *et al.*, 2020).

La extracción asistida por ultrasonido del fucoïdan en términos de contenido total de polisacáridos en *Sargassum mcclurei*, comparado con el método por agua caliente, incrementa su contenido de polisacáridos, presenta mayor actividad antioxidante y efecto citotóxico en células de carcinoma de mama (MCF-7) y carcinoma de pulmón humano (Lu-1) con valores de concentración media inhibitoria (IC_{50}) de 95.80 y 129 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (My *et al.*, 2020).

En nuestro país, se han realizado estudios de citotoxicidad del fucoïdan de *L. trabeculata* nativo sobre la línea celular epidermoide laríngeo humano cepa 2 (Hep2) con IC_{50} 6.42 mg/mL (Horna

2018). Además, en ensayos realizados con el FLt hacia la línea celular 4T1 se ha determinado el valor de IC₅₀ de 950 µg/mL (Toccas, 2020).

A pesar de tener datos preliminares acerca del efecto del fucoïdan de *L. trabeculata* sobre diversas líneas celulares tumorales con valores de IC₅₀ de 950 µg/mL; para fines de tratamiento, se busca moléculas que presenten bajos valores de IC₅₀ con elevada actividad citotóxica y menor efectos secundarios.

V) MÉTODOS

5.1 Obtención del fucoïdan VITALG® de *Lessonia trabeculata*

Se realizó la recolecta de *Lessonia trabeculata* (alga parda), en San Nicolás de Marcona una bahía ubicada entre los paralelos 15°08'46" y 15°15'46" de latitud sur en Ica-Perú. El fucoïdan VITALG® con 83.4 % de pureza fue otorgado por la empresa PSW S.A y se almacenó a temperatura ambiente o 4°C dentro del Laboratorio de Inmunología (LI) de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) de la UNMSM hasta su uso.

5.2 Preparación y sonicación del fucoïdan VITALG® de *Lessonia trabeculata*

El fucoïdan VITALG® se disolvió en RPMI-1640 con suero bovino fetal al 10% (RPMI completo) a una concentración final de 10 mg/mL y se mezcló en un agitador vórtex durante 20 segundos, posteriormente se almacenó a 4°C hasta su sonicación.

El fucoïdan se sometió a ultrasonido empleando 8 ciclos de pulsos de 1 minuto a una potencia de 55 watts (55W) y 60% de amplitud con 30 segundos de reposo entre cada ciclo en un sonicador QSONICA (modelo Q55) dentro de un baño de hielo picado. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos a 10°C y el sobrenadante se esterilizó mediante filtración con una membrana de polietersulfona (PES) con diámetro de poro de 0.22 µm. El

fucoidan de *Lessonia trabeculata* sonificado (FLt_s) estéril a 10mg/mL de concentración se almacenó a 4°C hasta su utilización.

5.3 Línea celular murina

Se empleó la línea celular 4T1 del carcinoma mamario adquirida del Banco de Células de Rio de Janeiro (BCRJ 0022) en el pasaje 50. La línea celular se preservó a -80°C en el ultracongelador de marca Thermo Fisher Scientific de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos hasta su descongelamiento en 10mL de medio RPMI completo para después centrifugarlo a 2 000 rpm durante 5 min, descartar el líquido sobrenadante y resuspender el *pellet* celular en medio RPMI completo. Posteriormente la línea celular 4T1 (*pellet* celular) se cultivó en un flask de 25 cm² adicionando el medio RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal (medio completo) e incubando a 37°C y 5% CO₂.

5.4 Determinación de la citotoxicidad mediante la técnica de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)

El ensayo MTT es colorimétrico cuantitativo y está basado en la reducción a su forma insoluble denominado formazán, debido a la actividad enzimática del succinato deshidrogenasa mitocondrial, esta enzima es operante en las células vivas. El formazán generado por la reducción del MTT se conserva en las células y se expulsa por la solubilización con dimetilsulfóxido (DMSO) generando una tonalidad púrpura medible en un espectrofotómetro. El número de células viables será proporcional al abundante formazán producido esto en función a la absorbancia obtenida por el espectrofotómetro. Para tal fin, se preparó el sonificado de fucoidan VITALG® a concentraciones de 1µg/mL, 10µg/mL, 100µg/mL, 1000µg/mL, 2000µg/mL, 4000µg/mL,

6000µg/mL, 8000µg/mL y 10000µg/mL en medio RPMI completo. Las células de la línea celular 4T1 se cultivó en microplacas de 96 pocillos a la concentración de 2×10^4 células/mL en un volumen 100 µL y se incubó a 37°C y 5% CO₂ durante toda la noche para permitir la adherencia. Luego, se retiró el medio de cultivo y se le agregó a cada pocillo 200 µL de cada concentración del fucoidan VITALG® sonificado y se incubó a 37°C y 5% CO₂ durante 72 horas. Las células 4T1 en medio RPMI completo se utilizaron como control negativo.

Transcurrido las 72 horas de incubación se retiró el medio de cultivo a cada pocillo y se añadió 100 µL/pocillo de 0.5 mg/mL MTT en medio completo y se incubó durante 4 horas a 37°C y 5% CO₂. Luego se retiró el sobrenadante, se adicionó 100µL/pocillo de DMSO de marca Sigma y se dejó incubando a temperatura ambiente (24°C), resguardado de la luz y en agitación constante a 60 rpm en el agitador e incubador (modelo ZHWY-2102C, ZHICHENG) durante 30 minutos para disolver los cristales de formazán; posteriormente las lecturas de absorbancias se realizaron en un lector de microplacas (Epoch 2 TS, Biotek) a una longitud de onda de 570 nm y 630 nm de referencia y se calculó el porcentaje de viabilidad de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad} = (\text{Abs muestra} / \text{Abs del control}) \times 100$$

La concentración media inhibitoria (IC₅₀) es una medida de eficacia de una sustancia para inhibir una función bioquímica o biológica específica. Esta medida cuantitativa muestra la cantidad de un fármaco en particular u otra sustancia (inhibidor) que se requiere para inhibir un proceso biológico determinado o componente de un proceso, es decir, una célula, un receptor celular, una enzima o microorganismo a la mitad.

5.5 Análisis estadístico

El análisis de los resultados adquiridos se realizó a través de ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Tukey utilizando el programa informático GraphPad Prism® en la versión 8.0. Se considerará significativo un valor de $p < 0.05$.

VI) RESULTADOS

6.1 Evaluación del efecto citotóxico del fucoïdan sonocado de *Lessonia trabeculata* mediante la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)

En la Figura 2A se observa el efecto citotóxico del FLt_s a concentraciones entre 10-10000 µg/mL sobre las células de carcinoma mamario 4T1 mediante la reducción del MTT.

La evaluación mediante ANOVA (análisis estadístico) precisó que el FLt_s inhibió notablemente la viabilidad celular (VC) de forma dosis dependiente ($p < 0.0001$) desde la concentración de 1 µg/mL (14.06 % VC) respecto al control (100% VC) (Figura 2B).

El tratamiento de células de carcinoma mamario 4T1 a las concentraciones de 10, 100, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000 y 10000 µg/mL de FLt_s presentaron porcentajes de viabilidad celular de 1.52, 2.30, 4.73, 1.95, 2.18, 1.68, 1.68 y 1.73 respectivamente sin presentar diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 2B). Sin embargo, se observó un leve incremento del porcentaje de la viabilidad celular esto en la concentración de 1000µg/mL, por otro lado, desde la concentración de 2000µg/mL el porcentaje de viabilidad celular se mantuvo constante, pero inferior al 5% (Figura 2B). Sin embargo, elevadas concentraciones del FLt_s no eliminó en su totalidad las células 4T1.

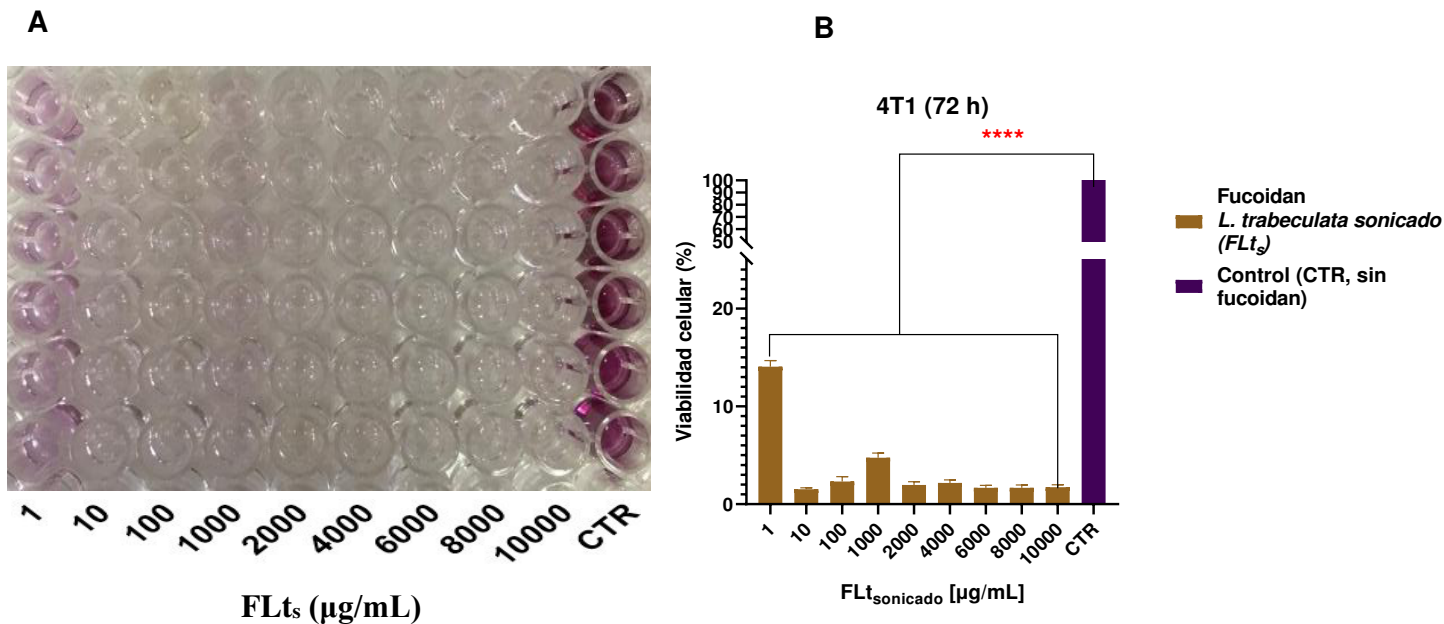


Figura 2. (A) Ensayo de reducción de MTT en células 4T1 tratadas con fucoidan de *Lessonia trabeculata* sonificado (FLts). Las células 4T1 se expusieron a concentraciones entre 1-10000 $\mu\text{g/mL}$ de FLts durante 72 h. CTR: control, células sin tratamiento. (B) Porcentaje de viabilidad en células 4T1 tratadas con FLts durante 72 h. Se observa que el FLts disminuye significativamente la viabilidad celular desde la concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$, en relación al control no tratado ($p < 0.0001$). CTR: control, células sin tratamiento; h: horas. El asterisco (*) denota diferencias significativas en relación al control (**** $p < 0.0001$).

En la Figura 3 se observa que las células 4T1 tratadas a la concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ de FLts presentan una disminución significativa en la reducción del MTT respecto al control, mientras que a concentraciones igual o superior a 10 $\mu\text{g/mL}$ de FLts es imperceptible el efecto reductor del MTT. Sin embargo, en la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de FLts se vio reflejado un ligero aumento de la reducción del MTT. Las células del carcinoma mamario murino 4T1 tratadas a concentraciones mayores o iguales a 1 $\mu\text{g/mL}$ presentan efecto citotóxico observándose en los cambios de morfología, el tamaño y desprendimiento celular (desadherencia) cuando se comparó con la muestra control.

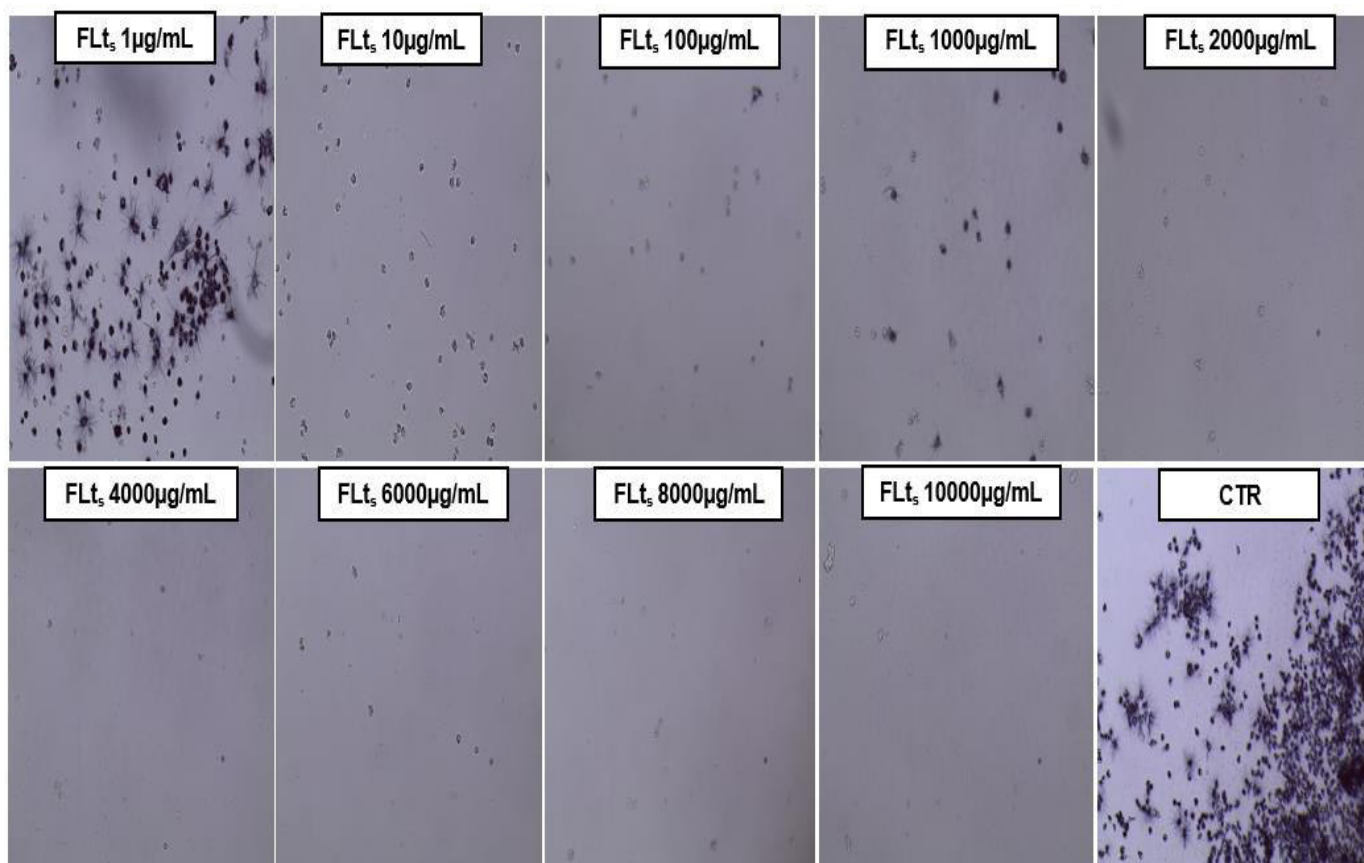


Figura 3. Efecto citotóxico de distintas concentraciones de fucoidan de *Lessonia trabeculata* sonicado (FLt_s) hacia la línea celular 4T1. Las monocapas de células 4T1 fueron tratadas durante 72 h con diferentes concentraciones de FLt_s. Se observa una reducción del tamaño, cambios en la morfología y desprendimiento de las células desde concentraciones de 1 µg/mL. Las células tratadas se observaron en un microscopio invertido con magnificación de 100X. CTR: control, células sin tratamiento.

6.2 Determinación de la concentración media inhibitoria (IC₅₀)

El IC₅₀ calculado del FLt_s en el tratamiento de la línea celular de cáncer mamario 4T1 durante 72 horas fue 0.1641 µg/mL (Figura 4).

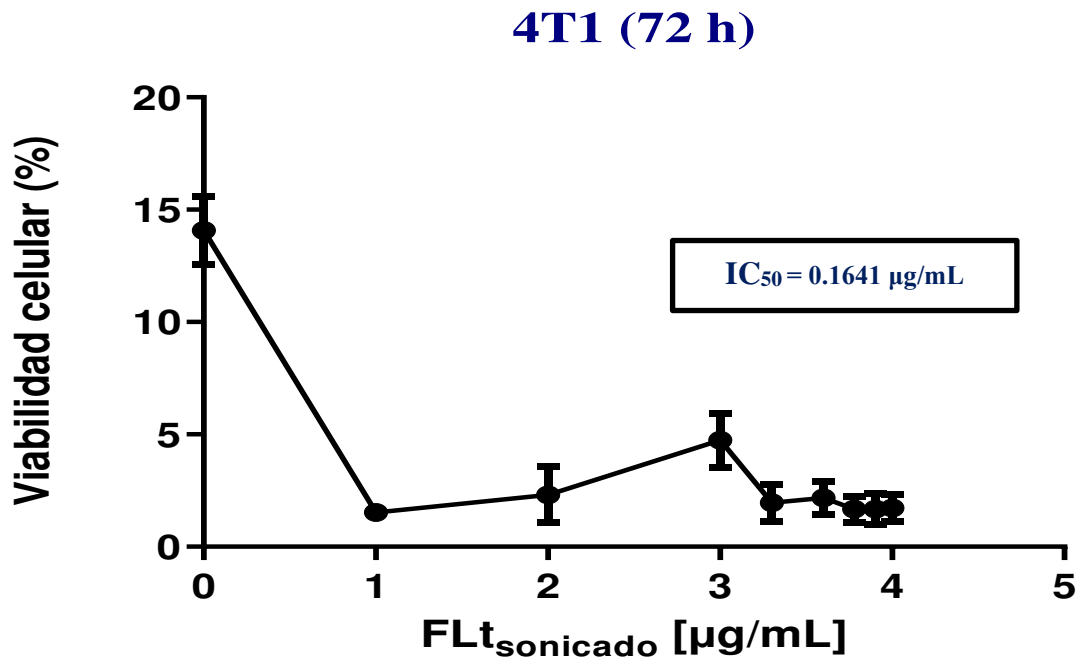


Figura 4. Determinación de la concentración media inhibitoria (IC_{50}) del fucoidan de *Lessonia trabeculata* sonicado (FLt_s) hacia la línea celular 4T1. El valor de IC_{50} del FLt_s sobre las células 4T1 fue 0.1641 $\mu\text{g/mL}$. Los datos corresponden a la media \pm la desviación estándar ($n=6$).

VII) DISCUSIÓN

Las algas pardas contienen polisacáridos sulfatados denominados fucoidan que están presentes en diferentes géneros como *Fucus*, *Laminaria*, *Lessonia*, *Macrocystis*, *Sargassum*, *Ascophyllum*, entre otros. Los fucoidanos presentan diferentes estructuras químicas según la especie de alga, las estaciones y las condiciones del clima local donde se cosechan, el método de obtención, entre otros (Mazur *et al.*, 2018).

La importancia de los métodos de extracción es fundamental debido a que la matriz abundante de carbohidratos es expuesta a procesos como secado, triturado e inclusive la utilización de disolventes orgánicos o acuosos con el fin de disminuir el tamaño que posee la partícula y permitir la

recuperación absoluta de los compuestos que tenemos interés de un modo económico, eficaz y rápida (Ruiz 2015).

El fucoidan se puede extraer mediante el empleo de etanol (Lorbeer *et al.*, 2015; Anastyuk *et al.*, 2017), agua caliente (Alboofetileh *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020), sustancias alcalinas (Carson *et al.*, 2018), ultrasonidos (Hanjabam *et al.*, 2019; Hmelkov *et al.*, 2018), entre otras. Además, se ha determinado que la degradación de oligosacáridos de fucoidan se incrementa con diversas técnicas sin pérdidas en su estructura principal y con diferentes pesos moleculares (García *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2021). Los fucoidanos de acuerdo con su peso molecular se clasifican como fucoidan de bajo peso molecular (menor de 10 kDa), fucoidan de mediano peso molecular (entre 10-10,000 kDa) y fucoidan de alto peso molecular (mayor de 10,000 kDa) (Aquib *et al.*, 2019).

El fucoidan de *Lessonia trabeculata* otorgado por la empresa PSW S.A reportó 58.72% de carbohidratos totales en porcentaje de fucosa, 9.48% de sulfato y, peso molecular de 9.9 kDa (Apumayta 2019). Contrariamente, Qu *et al.*, (2014) determinaron en el FLt un 21.53% de fucosa, 16.39% de sulfato y peso molecular de 105 kDa. Se ha demostrado que fucoidanos de bajo y mediano peso molecular con mayor contenido de residuos de fucosa y grupos sulfato presentan mayor actividad biológica que el fucoidan nativo (Aquib *et al.*, 2019). Además, los fucoidanos de bajo peso molecular pueden realizar una alta actividad antioxidante (Qu *et al.*, 2014; Aquib *et al.*, 2019).

La sonicación utiliza las ondas acústicas con una determinada frecuencia, produciéndose burbujas microscópicas que se expanden y colapsan generando la cavitación para luego transformar las ondas en energía mecánica (Hahn *et al.*, 2012). Actualmente, se utilizan protocolos de extracción de fucoidan basados en energía vibratoria como la aplicación de bajas frecuencias de ultrasonido que producen una alta ruptura celular algal que mejora la liberación del polímero

en el disolvente acuoso; asimismo, estos métodos de extracción por ultrasonido establecen un mayor rendimiento de producción de polímeros, composición monomérica y bioactividades del fucoidan (Zayed *et al.*, 2020).

El método de sonicación despolimeriza el fucoidan nativo (alto peso molecular) de las algas pardas produciendo una alta tasa de moléculas con un reducido peso molecular. La despolimerización generada por la sonólisis se presenta en el centro de la molécula y causa mayor efecto cuando es expuesto a ultrasonidos de baja frecuencia o en soluciones diluidas (Suprunchuk *et al.*, 2019). La degradación ultrasónica tiene la ventaja de que las cadenas de polímero se rompen cerca de su centro de masa, por lo que no se producen monómeros ni reacciones de cadena lateral durante el proceso (Storz *et al.*, 2009). Estos procesos pueden causar modificaciones estructurales, como desulfatación, desramificación o degradación, que pueden resultar en propiedades biológicas distintas en comparación con los fucoidanos intactos (García *et al.*, 2018). De acuerdo al protocolo de sonicación aplicado al FLt a la potencia de 55 W y 60% de amplitud se podría inferir un fraccionamiento de la molécula; estos resultados se sustentarían en las investigaciones realizadas por otros autores, como Hmelkov *et al.*, (2018) quienes comprobaron que el método de extracción asistida por ultrasonido (35 kHz, 150 W) a temperatura ambiente y durante 5-30 minutos produce fragmentos de fucoidan de *Fucus evanescens* con peso molecular 280 kDa con actividad antitumoral. Alboofetileh *et al.*, (2019) evidenciaron que el aislamiento de fucoidan mediante el método enzima-ultrasonido (196 W) produce moléculas con pesos moleculares entre 443.7 y 1020.85 kDa con potentes efectos citotóxicos sobre la línea celular HeLa y HepG2. Recientemente, Yuan *et al.*, (2020) determinaron que la degradación por irradiación de ultrasonidos en los polisacáridos de *Sargassum pallidum* (SpPS) genera una disminución significativa en el peso molecular (MW) y el tamaño de la partícula (Zavg) de 953 kDa a 82 kDa a una potencia ultrasónica

de 500 W respecto a la SpPS nativa; mejorando la actividad antioxidante y la bioactividad de los polisacáridos. Además, se ha demostrado que la degradación de fucoidanos de alto peso molecular en fucoidanos de bajo peso molecular incrementa su bioactividad (van Weelden *et al.*, 2019).

Con relación a la VC de las células 4T1 expuestas con el FLt_s a 55 W y 60% de amplitud durante 8 minutos, se observó que la concentración de 1 µg/mL redujo significativamente a 14.06% la viabilidad celular, mientras que a concentraciones a partir de 10 µg/mL, la viabilidad celular fue menor al 5 %; sin embargo, no se observó un efecto citotóxico total. De manera similar, Florez *et al.*, (2017) determinaron que la extracción acuosa asistida por ultrasonido (USAE) de fucoidan nativo de *Sargassum muticum* utilizando un baño ultrasónico (150 W y 40 kHz) presentó actividad citotóxica contra cuatro líneas celulares de cáncer humano: adenocarcinoma pulmonar epitelial (A549), carcinoma de colon (HCT-116), adenocarcinoma pancreático (PSN1) y glioblastoma multiforme Humano (T98G) mediante el método de bromuro de tiazolil azul tetrazolio (MTT), observándose una reducción máxima entre 25-30% a la concentración de 500 µg/mL. Por otra parte, Deepika *et al.*, (2019) determinaron que el tratamiento de la línea celular HeLa con el complejo fucoidan de *Fucus vesiculosus* y la rutina extraída de las cascaras de *Citrus sinensis* ultrasonicado reduce la viabilidad celular en 14,8%. Es importante indicar que los extractos de algas pardas sometidos a una exposición prolongada de ultrasonido son menos efectivos en su actividad citotóxica (Florez *et al.*, 2017).

El fucoidan sonicado de *Lessonia trabeculata* generó la inhibición y un elevado efecto citotóxico al desarrollo de las células 4T1 a la IC₅₀ de 0.1641 µg/mL. Del mismo modo, My *et al.*, (2020) demostraron que la extracción de fucoidan de *Sargassum mcclurei* por ultrasonido presenta efectos citotóxicos en células del adenocarcinoma humano de mama (MCF-7) y carcinoma de pulmón humano (Lu-1) con valores de concentración media inhibitoria (IC₅₀) de 95.80 y 129

$\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Además, se ha comprobado que la IC_{50} de 20 $\mu\text{g/ml}$ de la sonicación de la mezcla fucoidan-rutina muestra fuertes efectos inhibitorios sobre la línea celular HeLa (Deepika *et al.*, 2019).

En general es asequible deducir que la sonicación del FLt mejoró la toxicidad sobre las células 4T1 (IC_{50} 0.1641 $\mu\text{g/mL}$), si comparamos los resultados obtenidos con los encontrados por Toccas (2020) quien determinó el valor de IC_{50} de 950 $\mu\text{g/mL}$ del FLt no sonicado para las células 4T1. Además, contrastando con otras investigaciones podemos indicar que la citotoxicidad del fucoidan dependería de la especie del alga, lugar de cosecha, cantidad de grupos sulfatos, peso molecular, la presencia de azúcares, métodos de despolimerización y las líneas celulares (Kawashima *et al.*, 2011; Qu *et al.*, 2014; Skriptsova *et al.*, 2015; Suprunchuk *et al.*, 2019).

Sin embargo, queda por determinar que composición y/o peso molecular de fucoidanos generados producto de la sonicación estarían involucrados en los efectos citotóxicos.

VIII) CONCLUSIONES

- ❖ El protocolo de sonicación del fucoidan de *Lessonia trabeculata* VITALG® mejora sus efectos citotóxicos sobre las células 4T1 con respecto al fucoidan sin sonicar.
- ❖ El fucoidan sonicado de *Lessonia trabeculata* inhibe potencialmente la reproducción de las células de carcinoma mamario murino 4T1 *in vitro*.

VIX) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alboofetileh, M., Rezaei, M., Tabarsa, M., You, S., Mariatti, F., & Cravotto, G. (2019). Subcritical water extraction as an efficient technique to isolate biologically-active fucoidans from *Nizamuddinia zanardinii*. *International journal of biological macromolecules*, 128, 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.119>
- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Sung, B., & Aggarwal, B. B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical research*, 25(9), 2097–2116. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9661-9>
- Anastyuk, S. D., Shevchenko, N. M., Usoltseva Menshova, R. V., Silchenko, A. S., Zadorozhny, P. A., Dmitrenok, P. S., & Ermakova, S. P. (2017). Structural features and anticancer activity in vitro of fucoidan derivatives from brown alga *Saccharina cichorioides*. *Carbohydrate polymers*, 157, 1503–1510. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.031>
- Apumayta, Eder. (2019). Actividad antioxidante y determinación del contenido de fucoidano, compuestos fenólicos y flavonoides en extractos de macroalga parda *Lessonia trabeculata*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/3906>
- Aquib, Md & Farooq, Muhammad & Mensura, Sied & Filli, Kofi & Boakye-Yiadom, Samuel & Kesse, Mily & Bazezy, Joelle & Maviah, Rukhshona & Mavlyanova, Bo & Wang, & Wang, Bo. (2019). A REVIEW ON THE CHEMOTHERAPEUTIC ROLE OF FUCOIDAN IN CANCER AS NANOMEDICINE. 10.26479/2019.0501.44.
- Arteaga, C. L., Sliwkowski, M. X., Osborne, C. K., Perez, E. A., Puglisi, F., & Gianni, L. (2012). Treatment of HER2-positive breast cancer: Current status and future perspectives. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 9(1), 16-32. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.177>
- Bandyopadhyay, A., Wang, L., Agyin, J., Tang, Y., Lin, S., Yeh, I.-T., De, K., & Sun, L.-Z. (2010). Doxorubicin in combination with a small TGF beta inhibitor: A potential novel therapy for metastatic breast cancer in mouse models. *PloS One*, 5(4), e10365. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010365>
- Benedí, J., & Gómez Del Río, M. Á. (2006). Fármacos antineoplásicos (I). *Farmacia Profesional*, 20(2), 60-65.
- Bosó Ribelles, V. (2016). Estudio farmacogenético del tratamiento del cáncer de mama basado en antraciclinas y taxanos. <http://roderic.uv.es/handle/10550/54912>
- Britt, K.L., Cuzick, J. & Phillips, K. Key steps for effective breast cancer prevention. *Nat Rev Cancer* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0266-x>

- Carson, M.A., Nelson, J., Cancela, M.L. et al. Red algal extracts from *Plocamium lyngbyanum* and *Ceramium secundatum* stimulate osteogenic activities in vitro and bone growth in zebrafish larvae. *Sci Rep* 8, 7725 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26024-0>
- Colona-Vallejos, Erasmo H, Alzamora-Gonzales, Libertad, Chávez Pérez, Jorge, Apumayta Suárez, Eder V, & Chang Avila, Iliana. (2019). Incremento de la viabilidad, producción de especies reactivas de oxígeno, IL-1 y TNF- α en células mononucleares de sangre periférica humana tratadas con fucoidan de *Lessonia trabeculata*. *Revista Peruana de Biología*, 26(3), 291-300. <https://dx.doi.org/10.15381/rpb.v26i3.16772>
- Deepika, M. S., Thangam, R., Sheena, T. S., Sasirekha, R., Sivasubramanian, S., Babu, M. D., Jeganathan, K., & Thirumurugan, R. (2019). A novel rutin-fucoidan complex based phytotherapy for cervical cancer through achieving enhanced bioavailability and cancer cell apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 1181-1195. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.178>
- DeVita, V. T., Lawrence, T. S., & Rosenberg, S. A. (Eds.). (2015). *Devita, Hellman, and Rosenberg's cancer: Principles & practice of oncology* (10th edition). Wolters Kluwer.
- Dmytryk, A., Tuhy, L., & Chojnacka, K. (2017). Algae as Source of Pharmaceuticals. En B. N. Tripathi & D. Kumar (Eds.), *Prospects and Challenges in Algal Biotechnology* (pp. 295-310). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1950-0_11
- Elugo, C. (2019). Modulación de la expresión transcripcional de citoquinas de respuesta inmune innata y adaptativa en células mononucleares de sangre periférica humana tratadas con fucoidan de *Lessonia trabeculata* Villouta & Santelices 1986. Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/10698>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2018). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer*: 00, 1-13.
- Fletcher, H. R., et al. (2017). The seasonal variation of fucoidan within three species of brown macroalgae. *Algal research*, 22: 79-86.
- Flórez Fernández, Noelia & González Muñoz, María Jesús & Domínguez, Herminia. (2017). Feasibility of posthydrolysis processing of hydrothermal extracts from *Sargassum muticum*. *Algal Research*. 27. 73-81. [10.1016/j.algal.2017.08.002](https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.08.002).
- Gamaleri, E. (2015). Caracterización de la toxicidad a Trastuzumab y Docetaxel en pacientes mujeres con cáncer de mama de un Hospital universitario de alta complejidad: Su implicancia en los Re-ingresos hospitalarios

- [Thesis, Universidad de Belgrano - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Farmacia].
<http://repositorio.ub.edu.ar/handle/123456789/8255>
- García-Vaquero, M., Rajauria G., Tiwari B. & Sweeney. (2018). *Tresearch* 13(3):34-35.
<https://www.teagasc.ie/media/website/publications/2018/14-Ultrasonic-extraction.pdf>
- GLOBOCAN. (2020). CANCER TODAY. Recuperado el 12 de enero del 2021, de International Agency for Research on Cancer. website: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&half_pie=0&donut=0
- Hahn, T., Lang, S., Ulber, R., & Muffler, K. (2012). Novel procedures for the extraction of fucoidan from brown algae. *Process Biochemistry*, 47(12), 1691-1698. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.06.016>
- Hanjabam, M.D.; Kumar, A.; Tejpal, C.S.; Krishnamoorthy, E.; Kishore, P.; Ashok Kumar, K. Isolation of crude fucoidan from *Sargassum wightii* using conventional and ultra-sonication extraction methods. *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre* 2019, 20, 100200.
- Hmelkov, A. B., Zvyagintseva, T. N., Shevchenko, N. M., Rasin, A. B., & Ermakova, S. P. (2018). Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from brown alga *Fucus evanescens*. Structure and biological activity of the new fucoidan fractions. *Journal of Applied Phycology*, 30(3), 2039-2046. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1342-9>
- Horna Jauregui, M. (2018). Citotoxicidad de un extracto con fucoidanos obtenidos de algas pardas sobre la línea celular HEP-2 (Human Epidermoid Carcinoma strain 2). Repositorio de Tesis - UNMSM. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/9085>
- Jo, B. W., & Choi, S. K. (2014). Degradation of fucoidans from *Sargassum fulvellum* and their biological activities. *Carbohydrate polymers*, 111, 822–829. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.049>
- Kawashima, T. (2011). A marine carotenoid, fucoxanthin, induces regulatory T cells and inhibits Th17 cell differentiation in vitro. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(10), 2066-2069. <https://doi.org/10.1271/bbb.110459>
- Kwak J. Y. (2014). Fucoidan as a marine anticancer agent in preclinical development. *Marine drugs*, 12(2), 851–870. <https://doi.org/10.3390/md12020851>

- Lenihan, D. J., & Cardinale, D. M. (2012). Late cardiac effects of cancer treatment. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(30), 3657–3664. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.2938>
- Lippman, M. E. (2016). Cáncer de mama. En *Harrison Principios de Medicina Interna* (pp- 1150-1058), Vol.1, México D. F.: Ed. Mc Graw-Hill.
- Liu, J., Wu, S. Y., Chen, L., Li, Q. J., Shen, Y. Z., Jin, L., Zhang, X., Chen, P. C., Wu, M. J., Choi, J. I., & Tong, H. B. (2020). Different extraction methods bring about distinct physicochemical properties and antioxidant activities of *Sargassum fusiforme* fucoidans. *International journal of biological macromolecules*, 155, 1385–1392. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.113>
- Lorbeer AJ, Lahnstein J, Bulone V, Nguyen T, Zhang W. Multiple-response optimization of the acidic treatment of the brown alga *Ecklonia radiata* for the sequential extraction of fucoidan and alginate. *Bioresource Technology*. 2015 Dec; 197:302-309. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.103.
- Lu, J., Shi, K. K., Chen, S., Wang, J., Hassouna, A., White, L. N., Merien, F., Xie, M., Kong, Q., Li, J., Ying, T., White, W. L., & Nie, S. (2018). Fucoidan Extracted from the New Zealand *Undaria pinnatifida*-Physicochemical Comparison against Five Other Fucoidans: Unique Low Molecular Weight Fraction Bioactivity in Breast Cancer Cell Lines. *Marine drugs*, 16(12), 461. <https://doi.org/10.3390/md16120461>
- Luthuli, S., Wu, S., Cheng, Y., Zheng, X., Wu, M., & Tong, H. (2019). Therapeutic Effects of Fucoidan: A Review on Recent Studies. *Marine drugs*, 17(9), 487. <https://doi.org/10.3390/md17090487>
- Malve H. (2016). Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 8(2), 83–91. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.171700>
- Martín, M., Herrero, A., & Echavarría, I. (2015). El cáncer de mama. *Arbor*, 191(773), 234. <https://doi.org/10.3989/arbor.2015.773n3004>
- Mazur, L. P., Cechinel, M. A. P., de Souza, S. M. A. G. U., Boaventura, R. A. R., & Vilar, V. J. P. (2018). Brown marine macroalgae as natural cation exchangers for toxic metal removal from industrial wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management*, 223, 215-253. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.05.086>
- Merino Bonilla, J. A., Torres Tabanera, M., & Ros Mendoza, L. H. (2017). El cáncer de mama en el siglo XXI: De la detección precoz a los nuevos tratamientos. *Radiología*, 59(5), 368-379. <https://doi.org/10.1016/j.rx.2017.06.003>

- My, P.L., Sung, V.V., Dat, T.D., Nam, H.M., Phong, M.T., & Hiếu, N.H. (2020). Ultrasound-Assisted Extraction of Fucoidan from Vietnamese Brown Seaweed *Sargassum mcclurei* and Testing Bioactivities of the Extract. <https://doi.org/10.1002/slct.201903818>
- Oliva Anaya, C. A., Cantero Ronquillo, H. A., & García Sierra, J. C. (2015). Dieta, obesidad y sedentarismo como factores de riesgo del cáncer de mama. *Revista Cubana de Cirugía*, 54(3), 274-284.
- Oroya, C. (2019). Estudio in vivo de la actividad moduladora del fucoídano de *Lessonia trabeculata* Villouta & Santelices (1986) sobre parámetros de la inmunidad innata y humoral. Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Mayor de San Marcos. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/10564>
- OXFAM, AIS, RedGE. (2019). La otra lucha contra el Cáncer. Justicia Fiscal por la salud de las mujeres. Lima-Perú: Red Peruana por una Globalización con Equidad (RedGE). Recuperado de: <http://www.redge.org.pe/node/2875>
- Pacheco, Diana & García Poza, Sara & Cotas, João & Gonçalves, Ana & Pereira, Leonel. (2020). Fucoídano - A valuable source from the ocean to pharmaceutical. 3. 1-4. 10.15761/FDCCR.1000141.
- Qu, G., Liu, X., Wang, D., Yuan, Y., & Han, L. (2014). Isolation and characterization of fucoídanos from five brown algae and evaluation of their antioxidant activity. *Journal of Ocean University of China*, 13(5), 851-856. <https://doi.org/10.1007/s11802-014-2260-y>
- Ramírez, M. E. (2018). Cáncer de mama. *Revista Médica Sinergia*, 2(01), 8-12.
- Ramírez-Torres, N., Moctezuma-Meza, C., Asbun-Bojalil, J., Valenzuela-Martínez, L. A., Victoria-Ayala, R., Ortiz-Rodríguez, K., Ayala-Anzures, M. E., Navarro-Muñoz, F., Castelazo-Rico, G., Patlán-Pérez, R. M., Tena-Aláveiz, G., & Vega, H. A. la. (2015). Análisis de la efectividad del tratamiento neoadyuvante al añadir docetaxel secuencial a fluorouracilo, epirrubicina y ciclofosfamida en pacientes con cáncer de mama avanzado: Resultados preliminares de respuesta tumoral. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 14(1), 3-12. <https://doi.org/10.1016/j.gamo.2015.06.002>
- Ramos Águila, Y. de la C., Marimón Torres, E. R., Crespo González, C., Junco Sena, B., & Valiente Morejón, W. (2015). Cáncer de mama, su caracterización epidemiológica. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*, 19(4), 619-629.
- Ríos, D. (2020). Producción de citoquinas de respuesta inmune celular en ratones inmunizados y tratados con fucoídano de *Lessonia trabeculata* (Phaeophyceae, laminariales). Tesis para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Mayor de San Marcos. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/11736>

- Ruiz Aceituno, L. (2015). Nuevos métodos de extracción y fraccionamiento de carbohidratos bioactivos. <https://repositorio.uam.es/handle/10486/669731>
- Salazar, L. (2012). Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para producción de biodiesel. Tesis para optar el título de Licenciado en Ingeniería Industrial y de Sistemas, Facultad de Ingeniería, Universidad de Piura, Piura, Perú. <https://pirhua.udep.edu.pe/handle/11042/1490>
- SEOM. (2020). Cáncer de mama. Recuperado el 15 de julio del 2020, de Sociedad Española de Oncología Médica. website: <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/cancer-de-mama?start=1>
- Shannon, E., & Abu-Ghannam, N. (2019). Seaweeds as nutraceuticals for health and nutrition. *Phycologia*, 58(5), 563-577. <https://doi.org/10.1080/00318884.2019.1640533>
- Skriptsova, A. V. (2015). Fucoidans of brown algae: Biosynthesis, localization, and physiological role in thallus. *Russian Journal of Marine Biology*, 41(3), 145-156. <https://doi.org/10.1134/S1063074015030098>
- Storz, H., Müller, K. J., Ehrhart, F., Gómez, I., Shirley, S. G., Gessner, P., Zimmermann, G., Weyand, E., Sukhorukov, V. L., Forst, T., Weber, M. M., Zimmermann, H., Kulicke, W.-M., & Zimmermann, U. (2009). Physicochemical features of ultra-high viscosity alginates. *Carbohydrate Research*, 344(8), 985-995. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.02.016>
- Suprunchuk, V. E. (2019). Low-molecular-weight fucoidan: Chemical modification, synthesis of its oligomeric fragments and mimetics. *Carbohydrate Research*, 485, 107806. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.107806>
- Toccas, M. (2020). Estudio del efecto del fucoidan de *Lessonia trabeculata* nativa (alga parda) sobre la capacidad migratoria y clonogénica de la línea celular de carcinoma mamario murino 4T1. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/13998>
- Tsai, H. L., Tai, C. J., Huang, C. W., Chang, F. R., & Wang, J. Y. (2017). Efficacy of Low-Molecular-Weight Fucoidan as a Supplemental Therapy in Metastatic Colorectal Cancer Patients: A Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Marine drugs*, 15(4), 122. <https://doi.org/10.3390/md15040122>
- van Weelden, G., Bobiński, M., Okła, K., van Weelden, W. J., Romano, A., & Pijnenborg, J. (2019). Fucoidan Structure and Activity in Relation to Anti-Cancer Mechanisms. *Marine drugs*, 17(1), 32. <https://doi.org/10.3390/md17010032>
- Vishchuk, O. S., Ermakova, S. P., & Zvyagintseva, T. N. (2011). Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation, structural characteristics, and antitumor activity. *Carbohydrate research*, 346(17), 2769–2776. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.09.034>

- Wang, Y., Xing, M., Cao, Q., Ji, A., Liang, H., & Song, S. (2019). Biological Activities of Fucoidan and the Factors Mediating Its Therapeutic Effects: A Review of Recent Studies. *Marine drugs*, 17(3), 183. <https://doi.org/10.3390/md17030183>
- Wiechmann, L., & Kuerer, H. M. (2008). The molecular journey from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer. *Cancer*, 112(10), 2130-2142. <https://doi.org/10.1002/cncr.23430>
- Yu X, Zhou C, Yang H. (2015). Effect of ultrasonic treatment on the degradation and inhibition cancer cell lines of polysaccharides from *Porphyra yezoensis*. *Carbohydrate Polymers*, 117:650-656. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.09.086.
- Yuan D, Li C, Huang Q, Fu X. (2020). Ultrasonic degradation effects on the physicochemical, rheological and antioxidant properties of polysaccharide from *Sargassum pallidum*. *Carbohydrate Polymers*, 239:116230. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116230.
- Zaporozhets, T., & Besednova, N. (2016). Prospects for the therapeutic application of sulfated polysaccharides of brown algae in diseases of the cardiovascular system: review. *Pharmaceutical biology*, 54(12), 3126–3135. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1185444>
- Zayed, A., & Ulber, R. (2020). Fucoidans: Downstream Processes and Recent Applications. *Marine drugs*, 18(3), 170. <https://doi.org/10.3390/md18030170>
- Zha, S., Zhao, Q., Zhao, B. et al. (2016). Molecular weight controllable degradation of *Laminaria japonica* polysaccharides and its antioxidant properties. *J. Ocean Univ. China* 15, 637–642. <https://doi.org/10.1007/s11802-016-2943-7>
- Zhu, B., Ni, F., Xiong, Q., & Yao, Z. (2021). Marine oligosaccharides originated from seaweeds: Source, preparation, structure, physiological activity and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(1), 60-74. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1716207>