

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

“Extracción y separación de fracciones de lisados totales de *Egrecia Mensiezii* para la obtención de sustancias bioactivas con aplicaciones en tratamientos contra el cáncer de mama”

Tesis

Para cubrir los criterios necesarios para obtener el título de

BIOINGENIERO

Presenta

Verónica Eleonor Olachea Ortega

Directora de Tesis

Dra. Patricia Juárez Camacho

Codirector de tesis

David Cervantes Vásquez

Ensenada B.C., a 23 de abril del 2024.



Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño

**Extracción y separación de fracciones de lisados totales de *Egrecia Mensiezii*
para la obtención de sustancias bioactivas con aplicaciones en tratamiento
contra el cáncer de mama**

Tesis

Para cubrir los requisitos necesarios para obtener el título de

Bioingeniero

Presenta:

Verónica Eleonor Olachea Ortega

Aprobada por:

Dra. Patricia Juárez Camacho

Director de tesis

Dr. David Cervantes Vásquez

Co-director

Dra. Dayanira Paniagua Meza

Sinodal

Dra. Dora Luz Flores Gutiérrez

Sinodal

M.C. Jessica Sharlin Landeros Juárez

Sinodal

RESUMEN

De la tesis de Verónica Eleonor Olachea Ortega, presentada como requisito para la obtención del título de BIOINGENIERO. Ensenada Baja California, a 23 de abril del 2024.

Extracción y separación de fracciones de lisados totales de *Egredia Mensiezii* para la obtención de sustancias bioactivas con aplicaciones en tratamientos contra el cáncer de mama

Resumen aprobado por:



Patricia Juárez Camacho

Directora de Tesis



Dr. David Cervantes Vázquez

Codirector de Tesis

Este proyecto se centra en la búsqueda y separación de compuestos provenientes de fuentes naturales como las algas marinas, con la finalidad de contribuir en la investigación de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del cáncer de mama. El cáncer de mama es una enfermedad caracterizada por el crecimiento descontrolado de células en la mama, y es una preocupación de salud significativa en todo el mundo. Actualmente, existen tratamientos efectivos contra el cáncer, sin embargo, muchos de ellos provocan daños secundarios indeseables en los pacientes. Por tal motivo, existe una búsqueda de nuevos tratamientos terapéuticos con alta especificidad y menores efectos secundarios. El mar, es una fuente inagotable de recursos marinos, incluyendo metabolitos activos provenientes de plantas marinas. En este proyecto se realizó la extracción metanólica de compuestos del alga *E. Mensiezii* y la separación de los compuestos mediante RP-HPLC, para posteriormente evaluar su efecto en la viabilidad en la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231 mediante un estudio de MTT a las 24 y 48 h.

Palabras clave: *Egredia Mensiezii*, cáncer, cáncer de mama, RP-HPLC, Proliferación celular.

ABSTRACT

From the thesis of Verónica Eleonor Olachea Ortega, announced as a requirement to get the BIOENGINEERING degree, Ensenada Baja California, April 23th 2024

Extraction and separation of total lysate fractions of *Egrecia Mensiezii* to obtain bioactive substances with applications in the treatment of breast cancer.

Abstract approved by:



Dra. Patricia Juárez Camacho

Advisor



Dr. David Cervantes Vázquez

Co-advisor

This project focuses on the search and separation of compounds from natural sources such as marine algae in order to contribute to the research of new therapeutic strategies for the treatment of breast cancer. Breast cancer is a disease characterized by the uncontrolled growth of cells in the breast and is a significant health concern worldwide. Currently, effective cancer treatments are available, however, many of them cause undesirable side effects in patients. For this reason, there is a search for new therapeutic treatments with high specificity and fewer side effects. The sea is an inexhaustible source of marine resources, including active metabolites from marine plants. In this report, the methanolic extraction of compounds from the algae *E. Mensiezii* and the separation of the compounds by RP-HPLC, to subsequently evaluate their effect on viability in the human breast cancer cell line MDA-MB- 231 by MTT study at 24 and 48 h.

Keywords: *Egrecia Mensiezii*, cancer, breast cancer, RP- HPLC, Cellular proliferation.

DEDICATORIA

A mis padres por siempre apoyarme en todo momento, por darme las herramientas necesarias para lograr mis objetivos. Este logro no habría sido posible sin su amor incondicional, paciencia y constante apoyo. Ustedes han sido mi faro, guiándome a lo largo de este exigente viaje académico. Cada página de esta tesis lleva la impronta de su dedicación y sacrificio. A ustedes, quienes siempre creyeron en mí incluso cuando yo dudaba, les dedico con profundo agradecimiento este trabajo. Este logro es tanto suyo como mío.

A mi hermano por ser un gran ejemplo, gracias por ser mi fuente constante de inspiración. Tus palabras de ánimo y tu fe en mis capacidades me han impulsado a superar obstáculos y alcanzar este logro.

A mi pareja por siempre escucharme y apoyarme en el camino, tu aliento y confianza me han impulsado a superar desafíos y perseguir mis sueños.

A la Dra Patricia Juárez por apoyarme en la realización de este proyecto, por confiar en mi desde un principio y brindarme los conocimientos necesarios.

A todos aquellos que iluminaron mi camino hacia la culminación de este proyecto. Este logro no es solo mío, sino también de todos ustedes que me brindaron su apoyo, orientación y ánimo a lo largo de este desafiante trayecto. Cada palabra de aliento, cada consejo y cada gesto amable han sido los cimientos sobre los cuales se rige esta tesis. Agradezco sinceramente a todos aquellos que compartieron su sabiduría, paciencia y tiempo para que este trabajo llegara a su realización. Su contribución ha dejado una huella imborrable en esta investigación.

AGRADECIMIENTOS

A CICESE y sobre todo al área de Innovación Biomédica, por prestarnos las instalaciones, así como los materiales necesarios para poder culminar esta tesis.

A la Dra. Patricia Juárez Camacho, por apoyarme desde los inicios y brindarme el apoyo necesario.

Al Dr. David Cervantes Vázquez por apoyarme en todo el proceso de trámites y en la escritura de esta tesis.

A la M.C. Sharlin Landeros por su paciencia, claridad, compromiso, tiempo, el constante apoyo y orientación, por ser como mi mentor y guía, espero poder reflejar la inmensa gratitud que siento hacia ti.

M.C. Samantha Jiménez Flores por tu valiosa ayuda con el apoyo y manejo del RP-HPLC, gracias por guiarme y compartir tus conocimientos.

A la FIAD-UABC por mi formación académica durante estos 4 años.

Y a todas aquellas personas que por mucho o poco que fuera pusieron un granito de arena en esta tesis, mi más grande agradecimiento.

CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	9
2.	ANTECEDENTES.....	10
1.2	ALGAS	12
1.3	MACROALGAS	13
1.2	EGREGIA MENSIEZII.....	13
1.2	EGREGIA MENSIEZII EN CANCER.....	14
3.	HIPÓTESIS.....	14
4.	OBJETIVO	15
5.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
6.	METODOLOGIA.....	15
6.1	COMPUESTOS AISLADOS CON METANOL.....	15
6.2	FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA EN FASE REVERSA (RP-HPLC) EN LA INVESTIGACIÓN DE LOS METABOLITOS ACTIVOS	16
6.3	SEPARACIÓN DE SOLUTOS POR ÓSMOSIS	17
6.4	ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE MTT	18
6.5	CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE CÉLULAS	18
6.5	EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN DE METABOLITOS	19
6.6	ENSAYO DE PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MTT.....	20
7.	RESULTADOS.....	20
7.1	RESULTADOS DE LA SEPARACIÓN POR HPLC.....	20
7.2	RESULTADOS DEL EFECTO DE LAS FRACCIONES DEL ALGA EGREGIA EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LAS CÉLULAS CANCEROSAS.....	21
8	DISCUSIÓN	25
9	CONCLUSIÓN.....	26
10	REFERENCIAS	27

CONTENIDO DE IMÁGENES

1. FIG.1 Y 2 DESCRIPCION VISUAL DE LA ESTRUCTURA DE EGREGIA M.	13
2. FIG. 3 FUNCIONAMIENTO Y PROCESO DEL ANALITO EN EL RP-HPLC	17
3. FIG. 4 PROCESO DE SEPARACION DE LOS SOLUTOS ATRAVES DE OSMOSIS	18
4. FIG. 5 CELULAS MDA-MB-231 EN ALTA Y BAJA DEFINICION	19
5. FIG. 6 RESULTADOS HPLC	21
6. FIG.7 FRACCION 1 24 Y 48 H	22
7. FIG. 8 FRACCION 2 24 Y 48 H	23
8. FIG. 9 FRACCION 3 24 Y 48 H	24
9. FIG. 10 FRACCION 4 24 Y 48 H	25
10. FIG 11 FRACCION 5 24 Y 48 H	25

1. INTRODUCCIÓN

Los organismos marinos representan una parte importante de la biodiversidad total existente. Son capaces de sintetizar moléculas bioactivas para defenderse de sus predadores; además, la síntesis necesita producirse en elevadas concentraciones, ya que deben ser capaces de excretarlas al medio ambiente acuoso y ser suficientes para llevar a cabo su actividad. Bajo esta premisa, estas sustancias constituyen candidatos para la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas potencialmente útiles en diferentes enfermedades como el cáncer. El desarrollo de estas investigaciones en el mundo, y específicamente en Cuba, muestra una tendencia ascendente. En la actualidad, varios estudios han mostrado la actividad biológica anti proliferativa de compuestos obtenidos de algas, frente a melanoma, carcinoma nasofaríngeo, laríngeo, de pulmón, mamario, cervicouterino, de colon, de riñón, enfermedad de Hodgkin y algunos tipos de leucemia. La versatilidad de actividades biológicas mostrada por las moléculas aisladas, aunado con el metabolismo secundario escasamente estudiado en estos organismos, los convierte en una fuente importante de investigación. (David et al., 2015)

El fucoidan es un polisacárido sulfatado encontrado en las paredes celulares de las algas pardas, exhibiendo propiedades bioactivas como inmunomodulador y antitumoral. Los resultados demostraron que el fucoidan actúa de manera sinérgica con fármacos antineoplásicos en modelos in vitro, in vivo y en estudios preclínicos en pacientes con cáncer, potenciando la actividad inmunomoduladora, antitumoral, reduciendo la quimiotoxicidad y aumentando la tasa de supervivencia, por lo que el fucoidan sería un adyuvante potencial para el tratamiento de diversos tipos de cáncer. (Marcelo Fabricio, 2021)

Las algas marinas también han llamado la atención en la investigación biomédica debido a sus propiedades antioxidantes. En particular, *Egregia menziesii* es un alga parda que ha mostrado actividad antioxidante in vitro, por lo cual probar su actividad en un modelo in vivo resulta de gran interés. En el trabajo reportado por Hernández cano y colaboradores en agosto del 2023. reportan el efecto en la disminución de los niveles de estrés oxidativo en sistema nervioso central y su relación con una mejora en los procesos cognitivos. Los resultados muestran que la actividad locomotora fue similar entre los grupos experimentales y los grupos controles. El análisis de la prueba de laberinto de ocho brazos muestra una disminución en la latencia para terminar la prueba y en los errores en la memoria de trabajo en el grupo de STZ-ALGA, lo cual indica una mejora en la memoria espacial. Además, la administración del extracto metanólico de *E. menziesii* mejoró la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y SOD. De este trabajo se obtiene que el alga

parda *Egregia menziesii* podría ser considerado un antioxidante con mucho campo por estudiar. (Estefanía, agosto 2023)

Otras enfermedades como los trastornos en la coagulación de la sangre que pueden conducir a un mayor riesgo de hemorragias o trombosis también han sido objeto de estudio en la búsqueda de compuestos de origen natural que ayuden a combatirla. Estas enfermedades se han incrementado en las últimas décadas y no hay suficientes alternativas de sustancias útiles para remediarlas. En la búsqueda de nuevos compuestos a partir de los recursos naturales marinos, se han investigado las macroalgas de la costa noroeste del Pacífico mexicano, con el fin de detectar actividad anticoagulante, entre ellas las algas *Egregia menziesii*, *Ulva neumatoidea*, *Porphyra perforata*, *Silvetia compressa*, y *Codium fragile*. En este o estas investigaciones se ha encontrado que los polisacáridos sulfatados comprenden un grupo complejo de macromoléculas con propiedades de gran importancia biológica. Estos polímeros aniónicos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, presentes en una gran variedad de organismos. En las algas marinas, los carragenanos y fucoidanos están compuestos principalmente por galactosa sulfatada y fucosa, respectivamente. Entre las propiedades más estudiadas de los polisacáridos sulfatados están la actividad anticoagulante y antitrombótica. Dentro de las algas cafés de las cuales se han obtenido polisacáridos sulfatados con actividad anticoagulante están *Padina gymnospora*, *Dictyota menstrualis*, *Sargassum stenophyllum*, *Spatoglossum schroederi*, *Eisenia arborea*, *Sargassum fulvellum*; de las algas rojas *Gigartina skottsbergii* y algas verdes *Codium cylindricum*. (Cicimar.ipn.mx, 2024)

2. ANTECEDENTES

El cáncer es un grupo de enfermedades en donde algunas células del cuerpo se multiplican sin control y pueden tener la capacidad de diseminarse a otras partes del cuerpo. Es posible que el cáncer comience en cualquier parte del cuerpo humano, formado por billones de células. En condiciones normales, las células humanas se forman y se multiplican mediante un proceso llamado división celular, para formar células nuevas a medida que el cuerpo las necesita. Cuando las células envejecen o se dañan, mueren y las células nuevas las reemplazan.

Sin embargo, el proceso no siempre sigue este orden, y las células normales se pueden dañar y no responden al control de señales de crecimiento celular, multiplicándose cuando no deberían. Estas células forman tumores, los cuales pueden ser cancerosos (malignos) o no cancerosos (benignos).

Existen más de 100 tipos de cáncer. En general, los tipos de cáncer llevan el nombre de los órganos o tejidos donde se forma el cáncer. Por ejemplo, el cáncer de pulmón se inicia en el pulmón, y el cáncer de encéfalo se inicia en el encéfalo. A veces el cáncer se describe por el tipo de células que lo formaron, como las células epiteliales o las células escamosas.

El cáncer de mama es una enfermedad en la cual las células de la mama se multiplican sin control. Existen distintos tipos de cáncer de mama. El tipo de cáncer de mama depende del tipo de células de la mama en donde se originó el tumor.

La mayoría de los cánceres de mama comienzan en los conductos o en los lobulillos. El cáncer de mama puede diseminarse fuera de la mama a través de los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos. Cuando el cáncer de mama se disemina a otras partes del cuerpo, se dice que ha hecho metástasis.

Los tipos más comunes de cáncer de mama son:

- Carcinoma ductal infiltrante. Las células cancerosas se originan en los conductos y después salen de ellos y se multiplican en otros tejidos mamarios. Estas células cancerosas invasoras también pueden diseminarse, o formar metástasis, en otras partes del cuerpo.
- Carcinoma lobulillar infiltrante. Las células cancerosas se originan en los lobulillos y después se diseminan de los lobulillos a los tejidos mamarios cercanos. Estas células cancerosas invasoras también pueden diseminarse a otras partes del cuerpo.

En 2020, en todo el mundo se diagnosticó cáncer de mama a 2,3 millones de mujeres, y 685, 000 fallecieron por esa enfermedad. A fines del mismo año, 7,8 millones de mujeres a las que en los cinco años anteriores se les había diagnosticado cáncer de mama seguían con vida, lo que convierte a este cáncer en el de mayor prevalencia en el mundo. El cáncer de mama afecta a mujeres de cualquier edad a partir de la pubertad en todos los países del mundo, pero las tasas son mayores entre las mujeres adultas. (World OMS, 2023)

La mortalidad por cáncer de mama mostró pocos cambios entre 1930 y 1970, periodo en el que el tratamiento primario consistía solo en la intervención quirúrgica (mastectomía radical). Las tasas de supervivencia comenzaron a mejorar en 1990, cuando los países pusieron en marcha programas de detección precoz del cáncer de mama asociados a programas de tratamiento integrales que incluyen tratamientos farmacológicos eficaces.

Pertenecer al género femenino es el principal factor de riesgo en el caso del cáncer de mama. Aproximadamente entre el 0,5% y el 1% de los casos de cáncer de mama afectan a varones. El tratamiento de esa enfermedad en los varones sigue los mismos principios que los que se aplican a las mujeres.

Algunos factores aumentan el riesgo de padecer cáncer de mama, como el envejecimiento, la obesidad, el consumo perjudicial de alcohol, los antecedentes familiares de cáncer de mama, el

historial de exposición a radiación, el historial reproductivo (como la edad de inicio de los periodos menstruales y la edad en el primer embarazo), el consumo de tabaco y el tratamiento hormonal posterior a la menopausia. Alrededor de la mitad de los casos de cáncer de mama corresponden a mujeres sin ningún factor de riesgo identificable, a excepción del género (mujer) y la edad (más de 40 años). Los antecedentes familiares de cáncer de mama aumentan el riesgo de padecerlo, pero la mayoría de las mujeres a las que les ha diagnosticado cáncer de mama no tenía antecedentes familiares conocidos de la enfermedad. La falta de antecedentes familiares conocidos no necesariamente significa que una mujer esté menos expuesta a padecer cáncer de mama. Algunas mutaciones genéticas hereditarias de alta penetrancia aumentan considerablemente el riesgo de cáncer de mama, las más dominantes son las mutaciones en los genes BRCA1, BRCA2 y PALB2. Las mujeres a las que se detectan mutaciones en esos genes importantes pueden plantearse la posibilidad de optar por estrategias de reducción del riesgo, como la extirpación quirúrgica de ambos senos. (World OMS, 2023)

Por otro lado, las algas marinas se han convertido en objetivo importante para la industria de la biotecnología debido a la alta cantidad de compuestos bioactivos descubiertos recientemente a partir de ellas. Entre la investigación que se realiza para combatir o encontrar alternativas de tratamiento para las enfermedades como el cáncer, se tiene la búsqueda de compuestos con actividad biológica extraídos de productos naturales, tales como las algas, mismos que podrían ser una alternativa de tratamiento en algunos tipos de cáncer.

1.2 ALGAS

Desde las algas microscópicas hasta las macroalgas, son organismos acuáticos que cumplen un papel importantísimo en el planeta: son grandes aportadores de oxígeno, participan con cerca del 50% de la fotosíntesis y mitigan el calentamiento global. Las algas marinas han sido empleadas como fuente de alimentación desde las primeras civilizaciones, gracias a su elevado contenido nutricional. En la actualidad, se utilizan en diversas industrias. En los últimos años, las algas marinas han despertado el interés de los investigadores debido a su composición en sustancias con actividad biológica. La biomasa metabólica de las algas marinas está influenciada por factores ambientales como la temperatura, salinidad del agua, nutrición, especie, lo que amplía aún más la diversidad y características de los compuestos que producen. En particular, las algas marrones son destacadas en la medicina tradicional asiática, donde se utilizan para tratar diversas patologías como por ejemplo obesidad, hipertensión, diabetes. Esto se debe a la producción de compuestos como polifenoles, polisacáridos y pigmentos, responsables de su bioactividad. (Olivares-Bañuelos et al., 2019)

1.3 MACROALGAS

Las macroalgas son un tipo de alga marina de tamaño macroscópico, multicelulares en general y que, por lo tanto, se diferencian de las microalgas, las cuales son de tamaño microscópico y son unicelulares. Tan solo un 10% de las especies son marinas, el resto son de agua dulce. Se distribuyen en zonas en las que la luz solar llega deficientemente para realizar la fotosíntesis. Las macroalgas las podemos clasificar en 3 grandes grupos, las algas verdes (Phylum Chlorophyta), las algas pardas (Clase Phaeophyceae) y las algas rojas (Phylum Rhodophyta). Todas poseen clorofila y sus colores se deben a la presencia de otros pigmentos. (Giulia Graziati, 2022)

1.2 EGREGIA MENSIEZII

Egregia Mensiezii pertenece a la familia *Lessoniaceae*, es un alga parda que se encuentra en las costas del Pacífico desde Baja California, México hasta, Canadá. Es una especie conocida comúnmente como algas boa de plumas. Es la única especie en el género monotípico *Egregia*. Es de color marrón oscuro, de textura brillante y rugosa, y puede alcanzar más de cinco metros de largo. Tiene hojas largas, planas, en forma de tiras, revestidas con pequeñas hojas de unos pocos centímetros de largo cada una. Hay neumatoquistes a intervalos a lo largo de las frondosa que proporcionan Flotabilidad. El alga varía en morfología; el raquis, o tira central, de la fronda puede ser lisa o corrugada, y las hojas a lo largo del borde del raquis pueden tener una variedad de formas. (Alga Parda Boa Emplumada (*Egregia Menziesii*), 2016)



FIG.1 y 2 DESCRIPCION VISUAL DE LA ESTRUCTURA DE EGREGIA MENZIESII

1.2 EGREGIA MENSIEZII EN CANCER

Diversos estudios han demostrado que es posible prevenir y detener la progresión del cáncer mediante el uso de compuestos con actividad biológica provenientes de fuentes naturales. Alrededor del mundo, en diferentes ambientes marinos se han encontrado compuestos capaces de combatir distintos tipos de cáncer, tales como los reportados en varias especies de algas como por ejemplo a *Undaria pinnatifida*, alga parda *Fucus vesiculosus* entre otras. En algunos casos se ha asociado el tipo y la cantidad de estos compuestos no sólo a la especie, sino también a la exposición y adaptación a condiciones extremas en el ambiente. (Super User, 2019)

Las algas pardas contienen compuestos bioactivos que han mostrado efectos antitumorales. Estas características se han observado repetidamente en la familia de *Lessoniáceas*. *Egregia menziesii*, miembro de esta familia, se distribuye en el Pacífico Norte y sus propiedades han sido poco estudiadas. (Olivares–Bañuelos et al., 2019)

Los beneficios terapéuticos del fucoïdan del alga parda en el tratamiento del cáncer de mama han despertado un considerable interés en los últimos años. Sin embargo, aun es limitada la investigación que utiliza esferoides que proporcionan resultados relevantes en ensayos de productos antitumorales e inmunomoduladores que simulan adecuadamente el microambiente tumoral. (Condori–Macuri et al., 2023)

El objetivo a largo plazo de este estudio es evaluar la actividad anticancerígena de extractos de las algas marinas *Egregia menziesii*. En este trabajo se obtuvieron extractos orgánicos a partir de las algas obtenidas por buceo en la bahía de Ensenada y se separaron sus componentes utilizando la técnica de HPLC como primer paso para su evaluación como terapia alternativa contra el cancer.

3. HIPÓTESIS

El alga *Egregia Menziesii* contiene compuestos activos con actividad anti proliferativa en células de cáncer de mama.

4. OBJETIVO

Extraer y separar diferentes compuestos el Alga *Egregia Mensiezii*, mediante la técnica de RP-HPLC, para posteriormente evaluar su actividad biológica en células cancerígenas de cáncer de mama mediante ensayos de MTT.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener los extractos de las algas a través de extracciones metanólica
- Separar los compuestos presentes en los extractos a través de corridas de RP-HPLC y de ósmosis
- Evaluar la viabilidad celular de los compuestos aislados en un ensayo de MTT
- Comparar el efecto de diferentes fracciones del alga *Egregia Mensiezii* en la viabilidad celular
- Identificar las fracciones inhibitorias contra el cáncer de mama para futuros experimentos

6. METODOLOGIA

6.1 COMPUESTOS AISLADOS CON METANOL

Entre la metodología experimental utilizada en este trabajo, se decidió utilizar el metanol como el solvente en esta tesis ya que es un disolvente orgánico polar, también conocido como alcohol metílico. El metanol es soluble en muchos disolventes orgánicos como los éteres, los alcoholes, las cetonas y los hidrocarburos clorados. Su solubilidad depende de la polaridad y la estructura molecular del disolvente, así como de la temperatura y la presión.

El metanol se utiliza comúnmente como componente de la fase móvil en HPLC y debido a su bajo punto de ebullición Y alta solubilidad con una variedad de compuestos. A menudo se utiliza en HPLC de fase inversa para separar compuestos polares como aminoácidos y péptidos, y en HPLC de fase normal para separar compuestos no polares.

Entre los compuestos que se pueden extraer con metanol que pueden ser beneficiosos para el ensayo de MTT tenemos:

Pigmentos: Antioxidantes, con actividad antiinflamatoria, con actividad antiviral, con actividad neuroprotectora, con actividad anti-obesidad, con actividad anti-angiogénica, con actividad contra el cáncer. (Gimenez et al., 2013)

Compuestos fenólicos: Son antioxidantes naturales que pueden ayudar a combatir el daño celular causado por los radicales libres, y se ha sugerido que podrían tener beneficios en la prevención del cáncer. (A. Cereceres-Aragón et al., 2018)

Carbohidratos libres: Las algas pardas pueden contener polisacáridos que han mostrado propiedades bioactivas, incluyendo posibles efectos anticancerígenos. (Facultad de Ciencias, 2023.)

6.2 FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA EN FASE REVERSA (RP-HPLC) EN LA INVESTIGACIÓN DE LOS METABOLITOS ACTIVOS

La Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) es una técnica analítica que permite separar mezclas complejas de sustancias de procedencia diversa, con el propósito de identificarlas, cuantificarlas y purificarlas. Esta técnica es considerada una de las técnicas de purificación más versátiles y confiables teniendo una amplia aplicación en la investigación química, bioquímica y clínica, entre otras, para la determinación de la pureza de sustancias, la detección de metabolitos de interés farmacológico de plantas, la detección de metabolitos de drogas en fluidos biológicos, el aseguramiento de la calidad de productos farmacéuticos, etc.(buzonuv@uv.mx, 2024).

La cromatografía en fase reversa permite separar moléculas en base a su polaridad. El principio de la cromatografía en fase reversa es semejante al de la cromatografía en capa fina. Sin embargo, aquí la fase estacionaria es de partículas de sílica químicamente modificadas con hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos de diferentes tipos. Esto convierte a la fase estacionaria en una matriz apolar. Por lo tanto, para este tipo de cromatografías se emplean mezclas de solventes polares, tales como agua, acetonitrilo, acetato de etilo, acetona y alcoles alifáticos. (Cromatografía En Fase Reversa (Estructura de Proteínas), 2024)

La fase móvil desempeña un papel importante en la cromatografía, especialmente en la separación de los compuestos de la muestra. Es la que transporta los compuestos disueltos en el medio de la columna hacia el detector (Gases Industriales, 2024)

Esta técnica fue utilizada en este trabajo para poder separar e identificar los compuestos presentes en los extractos de las algas. Para la realización de las pruebas en HPLC de este trabajo, una vez se obtuvieron los extractos de las algas se inyectaron 500 μl y se utilizó una columna de Zorbax 300SB-C18. Estas pruebas tienen una duración de 60 min.

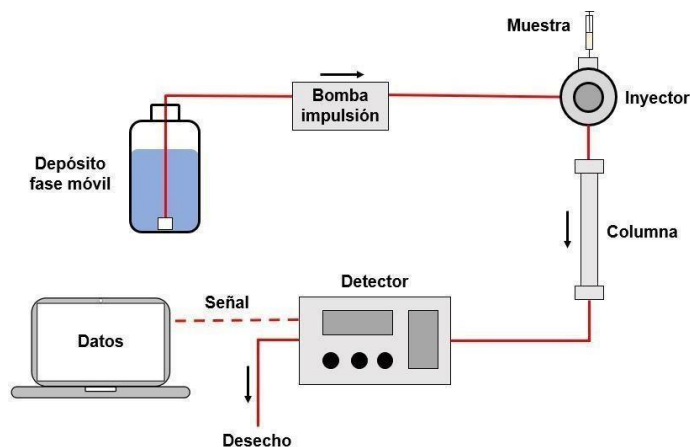


FIG. 3 FUNCIONAMIENTO Y PROCESO DEL ANALITO EN EL RP-HPLC (cromatografía líquida de alta eficiencia)

6.3 SEPARACIÓN DE SOLUTOS POR ÓSMOSIS

Es un proceso mediante el cual se purifica una muestra de agua eliminando las partículas en suspensión. La tecnología ósmosis inversa es un tipo de tratamiento fisicoquímico que copia a la naturaleza para eliminar impurezas del agua, haciéndola pasar a través de unas membranas semipermeables. (Ferroval, 2021)

Esta técnica fue utilizada en este trabajo para poder extraer las sales presentes en el extracto metanólico obtenido en la primera etapa. Se utilizó una membrana de 12,000 daltones, en las cuales se ingresó el extracto previamente pasado por el roto evaporador y se sumergieron en agua destilada, estuvieron en rotación constante y con cambios de agua cada 4 horas por 1 día. De esta prueba se observó la presencia en exceso de las sales en el extracto. Posteriormente se pasó por RP-HPLC.

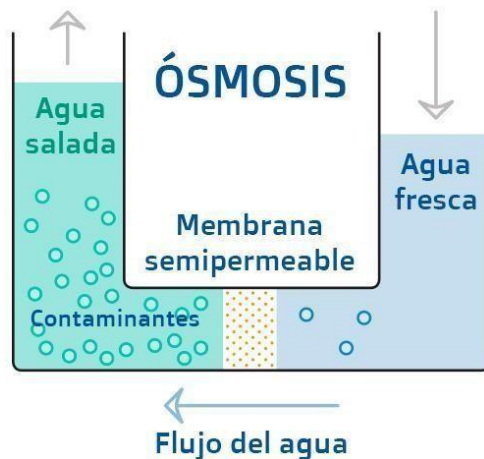


FIG. 4 PROCESO DE SEPARACIÓN DE LOS SOLUTOS ATRAVÉS DE ÓSMOSIS

6.4 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE MTT

El ensayo con MTT (sigma) se utiliza para medir la actividad metabólica celular como indicador de la viabilidad, la proliferación y la citotoxicidad celulares. Este ensayo colorimétrico se basa en la reducción de una sal de tetrazolio amarilla (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT) a cristales de formazán de color morado por las células metabólicamente activas. Las células viables contienen enzimas oxidorreductasas dependientes del NAD(P)H que reducen el MTT a formazán. Los cristales de formazán insolubles se disuelven utilizando una disolución de solubilización y la disolución coloreada resultante se cuantifica midiendo la absorbancia a 500–600 nanómetros con un espectrofotómetro multipocillos. Cuanto más oscura sea la disolución, mayor será el número de células metabólicamente activas viables. (“Protocolo Del Análisis de La Viabilidad Y La Proliferación Celulares Con MTT,” 2016).

Al aplicar el primer tratamiento que es el resultado del RP-HPLC se incubaron nuestras células por 24 hr, posterior mente se le aplico MTT, para dejarlas incubando por 5 horas, y ponerle el MTT stop, y así dejarlas incubar por 16 hr para finalmente poder ver su absorbancia en el espectrofotómetro multipocillos.

6.5 CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE CÉLULAS

En este trabajo se utilizaron células MDA-MB-231. Estas células fueron aisladas por primera vez por Cailleau y sus colaboradores en 1973, a partir de una muestra de derrame pleural de una paciente con cáncer de mama que falleció de esta enfermedad en el Anderson Hospital (Houston, EE. UU.) Los estudios bioquímicos y genéticos con estas células han contribuido enormemente a la investigación del cáncer de mama y al desarrollo de fármacos para ayudar a combatirlo. son

conocidas por ser altamente invasivas y tienen la capacidad de formar tumores en modelos animales. Son ampliamente utilizadas para estudiar la biología del cáncer, la progresión tumoral, la invasión y la metástasis. (Cailleau de, 2012)

Para iniciar nuestro mantenimiento celular debemos activarlas ya que al ser experimento nuevo están crio preservadas.

Se pusieron las células en baño maría y antes de que se descongelaran en su totalidad se pasaron a un tubo previamente preparado con PBS, para posteriormente ponerlo a centrifugar. Quitamos el sobrenadante, se re suspendió con 1 mil de medio y sembramos, esas fueron nuestras células durante todo este experimentó. Se aplicaron 5,000 células por pocillo.

Se realizaron cambios de medio cada dos días para evitar que las células llegaran a confluencia y evitar muerte celular, en esta ocasión se trabajó con confluencias del 60–70% ya que si se pasaba de estábamos propensos a tener muerte celular. En este experimento se trabajaron con dos cajas de células ya que eran experimentos de 24 y 48 h, procurábamos tener células de reserva.

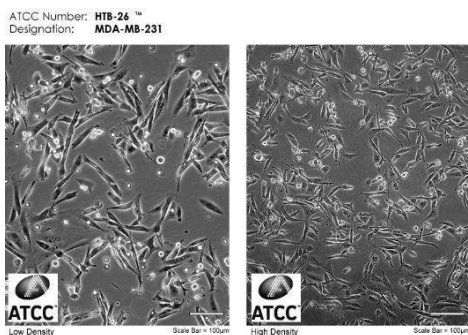


FIG. 5 CELULAS MDA-MB-231 EN ALTA Y BAJA DEFINICION (ATCC, 2020)

6.5 EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN DE METABOLITOS

Las algas se obtuvieron en la bahía de todos santos. Se secaron y pulverizaron, posteriormente se colocaron 10 g en un matraz con 250 mL del solvente correspondiente (metanol), y se sonicaron utilizando un sonicador Barson MODELO 2800: 2,8 L / 0,75 GAL por 60min. Las muestras obtenidas se filtraron. Posteriormente, se puso en el rotor evaporador marca Buchi R-100 a 65° C por una hora. Para quitarle las sales a las muestras se sometieron a un proceso de osmosis, con una membrana semipermeable de 12,000 dáltones, se realizaron cambios de agua cada 4 horas durante 1 día.

Se liofilizó por 3 días, se re suspendió con la solución B (ACN +0.1% TFA) de RP– HPLC, para poder inyectarlo al equipo de RP–HPLC fue necesario filtrarlo con unos filtros especiales para RP–HPLC y una jeringa. Se inyectaron 500 µl de soluto. Al finalizar el RP–HPLC se obtuvieron 13 corridas de MeOH, se pusieron a congelar para poner a liofilizar los tubos obtenidos, cuando estuvieron listos se colocaron en un solo tubo, para solo tener un tubo de la corrida 1, uno de la corrida 2 y así sucesivamente, posteriormente se pusieron a congelar para ponerlo a liofilizar nuevamente. Los extractos obtenidos estuvieron listos para hacer los experimentos de viabilidad celular (MTT).

6.6 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MTT

Para el MTT se sembraron las células MDA–MB–231 en una placa de 96 pozos, se utilizaron 5,000 células por pozo, en 32 pozos, al día siguiente se agregó tratamiento, re suspendido en 500 µl y una dilución 1:5. A partir de ahí se realizaron diluciones seriadas 1:2, y se aplicaron a las células. Los ensayos se incubaron a 24 y 48 h. Transcurridas esas horas se agregaron 10 µl de MTT a cada pozo. Cinco horas más tarde se detuvo la reacción con el buffer stop de MTT, se incubó la placa por 16 h. Finalmente, se leyó su absorbancia a 570 nm. Los resultados obtenidos se analizaron y graficaron utilizando el programa Grahpad.

7. RESULTADOS

7.1 RESULTADOS DE LA SEPARACIÓN POR RP-HPLC

Las algas recolectadas en la bahía de Baja California, después de su almacenamiento, se secaron y se pulverizaron para su posterior extracción con metanol. La figura 5 muestra los resultados obtenidos en la cromatografía de alta eficiencia en fase eversa (RP–HPLC). Como se puede observar, los primeros cinco picos, que fueron los más altos, indicaron una región en la que es más probable encontrar compuestos bioactivos, es por eso por lo que se descartaron los demás picos, ya que la intensidad de los picos no representa claramente la presencia de algunos otros compuestos. Como se puede observar en el eje x se muestra el tiempo trascurrido desde el inicio de la inyección de la muestra y hasta los 70 min. En el eje y se muestra la absorbancia en milí–unidades de absorbancia, el área bajo la curva a es proporcional a la abundancia de la fracción .

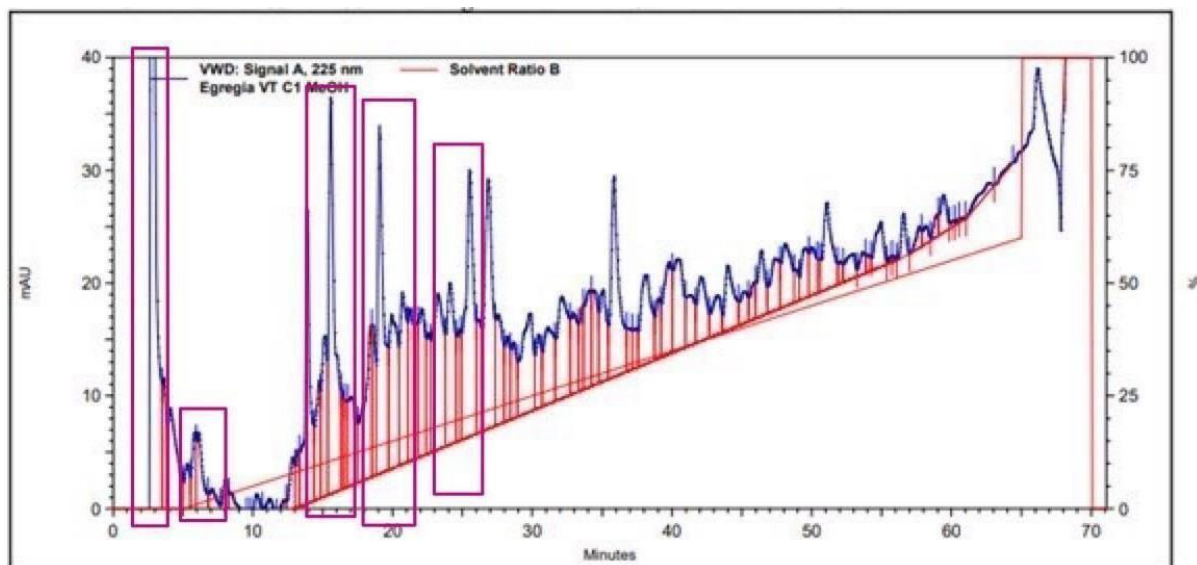


Fig. 5: Perfil de separación de los metabolitos del extracto metanólico (MeOH) en RP-HPLC. En la imagen se aprecian, encerrados en cuadros rojos, los 5 picos colectados a partir de los extractos metanólicos. Las muestras fueron recolectadas cada 5 minutos durante 60 minutos.

7.2 RESULTADOS DEL EFECTO DE LAS FRACCIONES DEL ALGA EGREGIA EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LAS CÉLULAS CANCEROSAS

Para evaluar si las fracciones del extracto total de Egregia contienen metabolitos activos que modulen la proliferación celular de las células MDA-MB-231, se tomaron las fracciones asociadas a los picos más prominentes en el ensayo de HPLC, y se evaluó su efecto en la proliferación celular utilizando la técnica de MTT. La figura 6 muestra el efecto de diferentes diluciones correspondientes a la fracción 1 a las 24 y a las 48 horas de tratamiento. Se puede observar que el tratamiento a las 24 h no tuvo un efecto significativo en la proliferación de las células. Sin embargo, a las 48 h la fracción sin diluir 1:1 y diluida 1:2 inhibieron significativamente el crecimiento celular. En la figura 7 correspondiente a la fracción 2 se puede observar que en 24 h no hay efecto significativo, sin embargo, a las 48h inhibió la proliferación celular de manera significativa a través del tiempo. En la figura 8 correspondiente a la fracción 3, podemos observar en comparación de las 24 y 48 h que no hay efecto alguno con el paso del tiempo, si se compara el control con las diluciones se puede observar que no existe la inhibición. En la figura 9 correspondiente a la fracción 4 se puede observar en la gráfica de 24h una variación, lo que pudo deberse a un error al momento del pipeto o que en esa placa en esos pocillos hayan tenido más células, pero si se comparan las corridas a las 48 y a las 24 h no se ve efecto alguno con el paso del tiempo. En la figura 10 correspondiente a la fracción 5 la gráfica de 48 h muestra que es muy probable que algunos pocillos hayan tenido células de más pero si las comparamos las gráficas de 24 y 48h se

observa que no hay efecto alguno con el paso del tiempo, sin embargo, la fracción 1 y 2 presentó inhibición significativa.

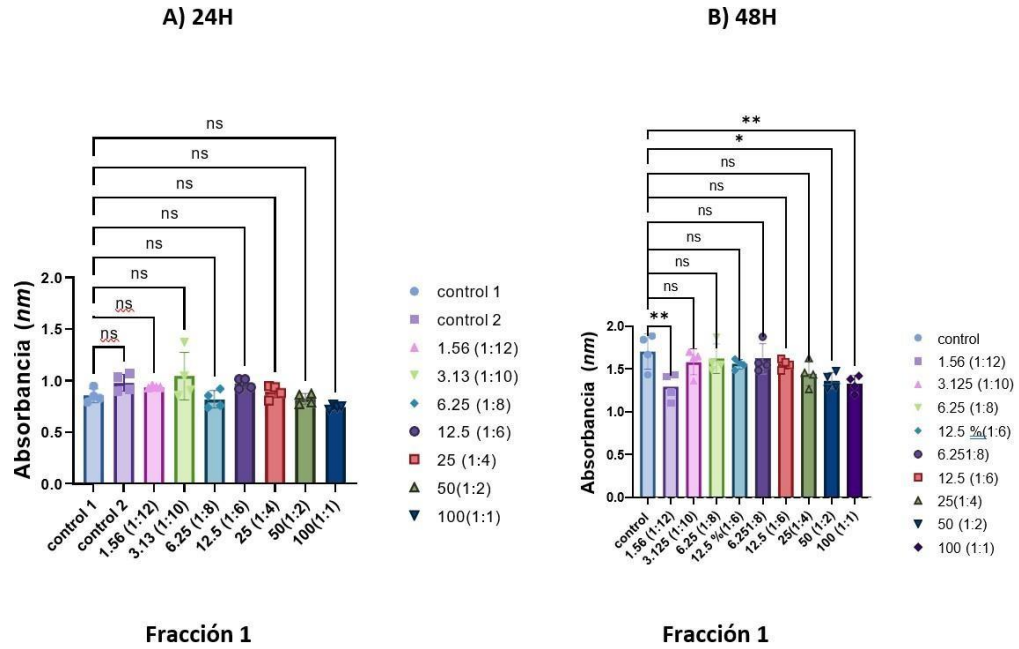


Fig. 6: a) Se puede observar que no hay efecto significativo, b) Se puede ver que la dilución al 100% inhibió la proliferación celular de manera significativa a través del tiempo. (ANOVA de una vía * $p < 0,05$ representa diferencias significativas con respecto al control positivo)

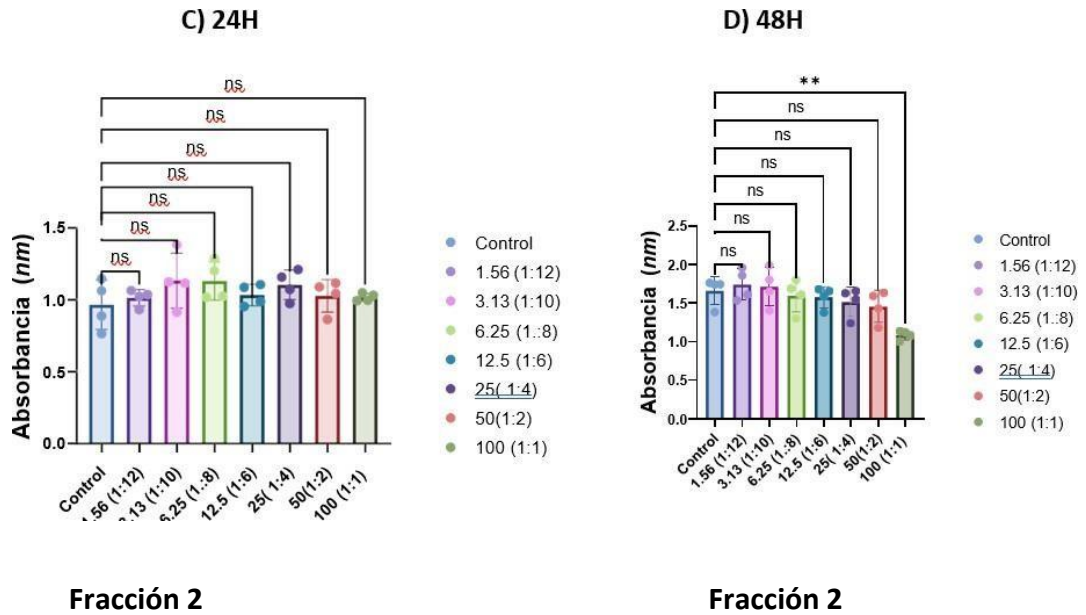


Fig. 7: c) no se ve efecto significativo, d) se puede observar que la dilución 100% inhibió la proliferación celular de manera significativa a través del tiempo. (ANOVA de una vía * $p < 0,05$ representa diferencias significativas con respecto al control positivo)

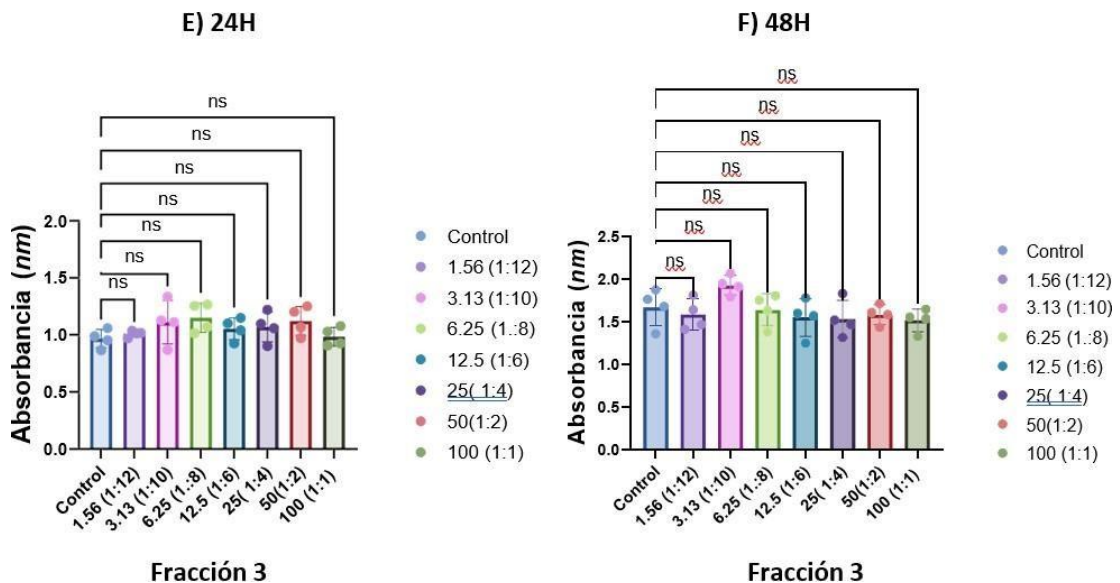


Fig. 8: e) No se ve efecto significativo, f) No se observa algún efecto significativo. (ANOVA de una vía * $p < 0,05$ representa diferencias significativas con respecto al control positivo)

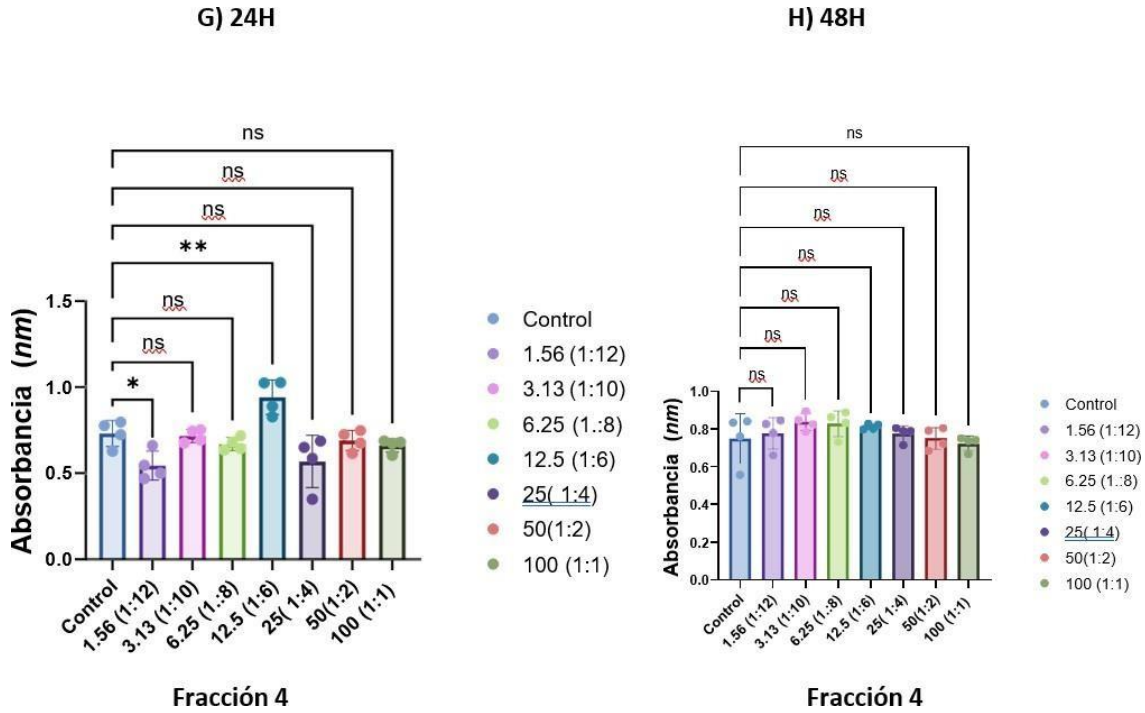


Fig. 9: g) La dilución más diluida 1:12 tuvo efecto inhibitorio y la dilución 1:6 promovió la proliferación, h) No se observa efecto significativo. (ANOVA de una vía *p<0,05 representa diferencias significativas con respecto al control positivo)

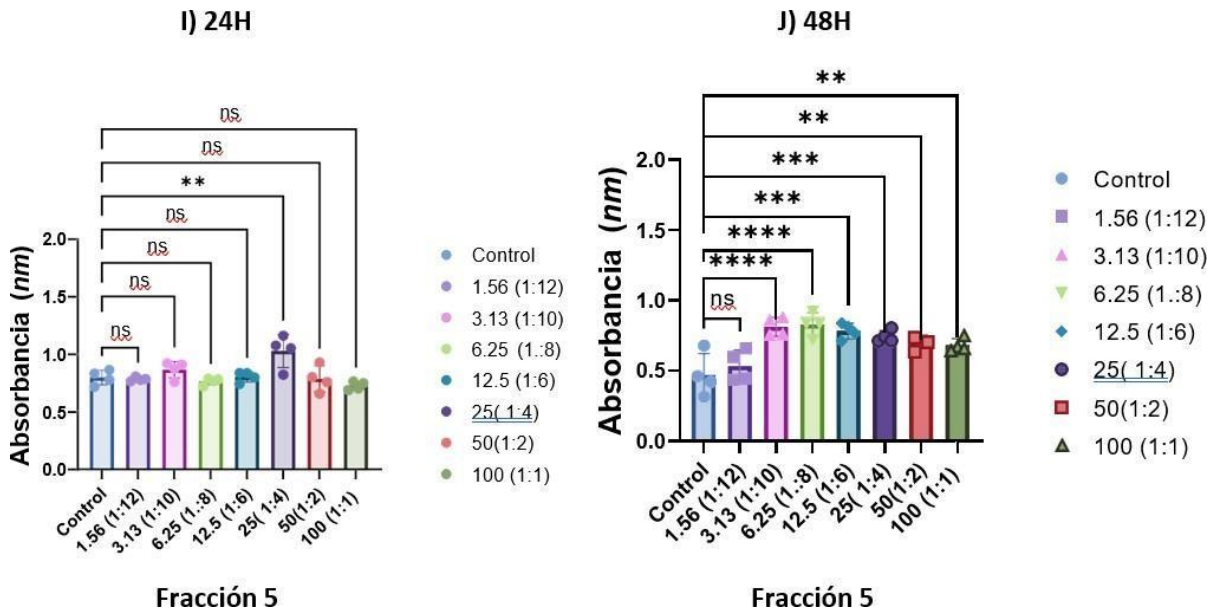


Fig.10: i) se puede observar que la dilución 1:4 aumento la proliferación, j) si los comparamos entre las 24 y 48 h no hubo efecto, pero si lo vemos por separado se observa que aumento la

proliferación. (ANOVA de una vía * $p < 0,05$ representa diferencias significativas con respecto al control positivo)

8 DISCUSIÓN

El cáncer de mama sigue siendo un desafío significativo en la salud global, afectando a millones de mujeres en todo el mundo. A medida que continuamos profundizando en nuestra comprensión de los mecanismos subyacentes y las características moleculares de esta enfermedad, se vuelve crucial abordarla desde una perspectiva científica integral. Los avances más recientes en la investigación del cáncer de mama nos llevan a considerar enfoques novedosos, como el uso de extractos de algas como *Egregia Mensiezii*, que han demostrado tener propiedades anticancerígenas. (Tatiana Nenetzen Olivares-Bañuelos et al., 2019).

En este trabajo hicimos una extracción metanólica siguiendo el protocolo de la tesis de Monica Itzel Rodríguez Farias, en el alga *Egregia Menziesii* para posteriormente someterlos a un ensayo de viabilidad celular para así obtener sustancias bioactivas con aplicación en el cáncer de mama.

En línea con investigaciones previas, como la realizada por Tatiana Nenetzen Olivares–Bañuelos en 2019, nuestros resultados respaldan la eficacia de los extractos de *Egregia Mensiezii* en la inhibición del crecimiento celular del cáncer. En particular, hemos observado una inhibición significativa en las células cancerosas, lo cual sugiere la presencia de metabolitos activos en las fracciones 1 y 2, que pueden ser responsables de esta actividad anticancerígena.

No obstante, es fundamental realizar estudios adicionales para profundizar en la comprensión de los componentes específicos presentes en estas fracciones y su mecanismo de acción exacto. Además, se necesitan investigaciones adicionales para evaluar el impacto de estas fracciones en células normales, asegurando que su uso terapéutico sea selectivo hacia las células cancerosas sin afectar el funcionamiento celular normal.

Finalmente, de acuerdo a los resultados mostrados en este trabajo es posible concluir que los extractos metanólicos del alga *Egregia Mensiezii* presenta fracciones con la presencia de compuestos con la actividad anticancerígena en el cáncer de mama. Sin embargo, se requiere más investigación para comprender completamente su potencial terapéutico y su aplicación clínica efectiva en el tratamiento de esta enfermedad devastadora.

9 CONCLUSIÓN

Los resultados demostraron que algunas de las fracciones obtenidas del alga *Egregia Mensiezii* tuvieron un efecto inhibitor en las células cancerosas de mama en condiciones específicas. Mientras que algunas fracciones no mostraron efecto significativo en la viabilidad celular, otras presentaron una clara inhibición del crecimiento celular, especialmente en concentraciones más altas y después de un período de incubación de 48 horas.

Estos hallazgos sugieren que el extracto de alga *Egregia Mensiezii* contiene compuestos bioactivos con potencial anticancerígeno. Y estos se encuentran en la fracción 1 y 2 obtenidos por la técnica de HPLC en este trabajo. Sin embrago, se requieren hacer estudios posteriores para realizar la separación de las fracciones 1 y 2 y poder determinar cuáles son los metabolitos activos presentes que estén teniendo efecto inhibitorio en el crecimiento de las células cancerosas MDA-MB-231. Del mismo modo, se requiere realizar más pruebas biológicas para comprender los mecanismos anticancerígenos de estos metabolitos y su posible aplicación terapéutica

10 REFERENCIAS

1. Acta Botánica Mexicana. (s/f). Redalyc.org. Recuperado el 19 de marzo de 2024, de <https://www.redalyc.org/pdf/574/57402904.pdf>
2. Cáncer de mama. (2024, febrero 10). MayoClinic.org. <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/breast-cancer/symptoms-causes/syc-20352470>
3. Condori-Macuri, R., Alzamora Gonzales, L., Cruz-Riquelme, R., Erasmo Colona-Vallejos, E. C.-V., & Chauca-Torres, N. (2023). Antitumor and immunomodulatory activity of fucoïdan from the brown alga *Lessonia trabeculata* (Lessoniaceae) on breast cancer spheroids. *Revista de Biología Tropical*, 71(1), e54918. <https://doi.org/10.15517/rev.biol.trop..v71i1.54918>
4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) – Instituto de Química Aplicada. (s/f). www.uv.mx. Recuperado el 18 de marzo de 2024, de <https://www.uv.mx/sara/equipamiento/hplc/>.
5. Cruzado, V., & Marcelo, F. (2021). Estudio sobre las propiedades inmunomoduladoras y antitumorales del fucoïdan de algas pardas en tratamiento combinado con quimioterapia convencional. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
6. ¿Cuál es el papel de la fase móvil en la cromatografía? (s/f). Airliquide.com. Recuperado el 19 de marzo de 2024, de <https://es.airliquide.com/soluciones/calibracion/gases-para-cromatografia/cual-es-el-papel-de-la-fase-movil-en-la-cromatografia>
7. El portal único del gobierno. (s/f). Gob.mx. Recuperado el 18 de marzo de 2024, de <https://www.gob.mx/semarnat/es/articulos/algas-de-mexico-fundamentales-para-el-planeta-laindustria-la-medicina-y-la-alimentacion?idiom=es>
8. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). (s/f). [ThermoFisher.com](http://www.thermofisher.com). Recuperado el 19 de marzo de 2024, de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/mx/es/M6494>
9. No title. (s/f). Gob.mx. Recuperado el 19 de marzo de 2024, de <https://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer-mama>

10. Olivares–Bañuelos, T., Gutiérrez–Rodríguez, A., Méndez–Bellido, R., Tovar–Miranda, R., Arroyo–Helguera, O., Juárez–Portilla, C., Meza–Menchaca, T., Aguilar–Rosas, L., Hernández–Kelly, L., Ortega, A., & Zepeda, R. (2019). Brown seaweed *egregia menziesii*'s cytotoxic activity against brain cancer cell lines. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(2), 260. <https://doi.org/10.3390/molecules24020260>
11. Ósmosis inversa. (s/f). Ferrovial. Recuperado el 18 de marzo de 2024, de <https://www.ferrovial.com/es/recursos/osmosis-inversa/>.
12. Pérez, M. D. F., Balmaseda, I. H., & Betancourt, S. M. R. (2015). Bioactivos marinos en el tratamiento del cáncer. *Revista electrónica "Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta"*, 40(7). https://revzoilomarinaldo.sld.cu/index.php/zmv/article/view/46/html_71
13. ¿Qué es el cáncer? (1980, enero 1). Instituto Nacional del Cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
14. Super User. (s/f). Algas marinas: potencial fuente de compuestos contra el cáncer. Edu.mx. Recuperado el 18 de marzo de 2024, de <https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/index.php/ediciones-antteriores/articulos-fuera-de-los-volumenes-publicados-online/318-algas-marinas-potencial-fuente-de-compuestos-contra-el-cancer>
15. Villarreal–Gómez, L. J., Soria–Mercado, I. E., Guerra–Rivas, G., & Ayala–Sánchez, N. E. (2010). Antibacterial and anticancer activity of seaweeds and bacteria associated with their surface. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 45(2), 267–275. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572010000200008>
16. (S/f–a). Cdc.gov. Recuperado el 18 de marzo de 2024, de https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic_info/what-is-breast-cancer.htm.
17. (S/f–b). Researchgate.net. Recuperado el 18 de marzo de 2024, de https://www.researchgate.net/publication/330331480_Brown_Seaweed_Egregia_menziesii's_Cytotoxic_Activity_against_Brain_Cancer_Cell_Lines.
18. (S/f–c). Who.int. Recuperado el 18 de marzo de 2024, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>.
19. (S/f–d). Sigmaaldrich.com. Recuperado el 18 de marzo de 2024, de <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technicaldocuments/protocol/cell-culture->

and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-
mtt.

20. (S/f-e). Uatx.mx:8443. Recuperado el 18 de marzo de 2024, de https://repositorio.uatx.mx:8443/handle/DSyTI_UATx/717
21. Cereceres Aragón, A., Rodríguez Tadeo, A., Álvarez Parrilla, E., & Rodrigo García, J. (2018). Ingestión de compuestos fenólicos en población adulta mayor. *Nutricion hospitalaria: organo oficial de la Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral y Enteral*, 36(2), 470–478. <https://doi.org/10.20960/nh.2171>
22. (S/f). Unam.mx. Recuperado el 24 de abril de 2024, de <https://sitios.quimica.unam.mx/departamento/proteinas/estructura/EPrpc.html>