



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCIENCIAS

EVALUACIÓN DE LA INTERVENCIÓN DE COMPUESTOS ANTIPROLIFERATIVOS EXTRAÍDOS DEL MÚSCULO DE CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*) EN EL CICLO CELULAR EN LÍNEAS DE CÁNCER HUMANO.

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOCIENCIAS

presenta:

MARÍA DE GUADALUPE RUIZ ALMADA

Hermosillo, Sonora, México

Septiembre de 2022

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Hermosillo, Sonora a 14 de septiembre del 2022.

Asunto: Cesión de derechos

**UNIVERSIDAD DE SONORA
P R E S E N T E.**

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada **Evaluación de la intervención de compuestos antiproliferativos extraídos del músculo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en el ciclo celular en líneas de cáncer humano**, en los sucesivos LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de **Maestra en Ciencias**, en virtud de lo cual autorizo a la Universidad de Sonora (UNISON) para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución, distribución pública, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios de la institución y se integren a los repositorios de la universidad, estatales, regionales, nacionales e internacionales.

La UNISON se compromete a respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA que cometa el suscrito frente a terceros.

ATENTAMENTE

Marilú Ruiz A.

MARÍA DE GUADALUPE RUIZ ALMADA

Nombre y Firma del Autor


LIC. GILBERTO LEÓN LEÓN
Abogado General
UNIVERSIDAD DE SONORA

Hermosillo, Sonora, México

Septiembre, 2022.

EVALUACIÓN DE LA INTERVENCIÓN DE COMPUESTOS ANTIPROLIFERATIVOS
EXTRAÍDOS DEL MÚSCULO DE CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*) EN EL
CICLO CELULAR EN LÍNEAS DE CÁNCER HUMANO

T E S I S

que para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOCIENCIAS

presenta:

Q.B.C. MARÍA DE GUADALUPE RUIZ ALMADA

Hermosillo, Sonora, México.

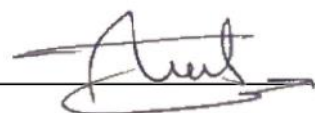
Septiembre del 2022

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis intitulada **Evaluación de la intervención de compuestos antiproliferativos extraídos del músculo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en el ciclo celular en líneas de cáncer humano** presentada por **MARÍA DE GUADALUPE RUIZ ALMADA**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de **Maestría en Biociencias** con Especialidad en **Biociencias Moleculares**.



Dra. Carmen María López Saíz
Director y Presidente



Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta
Co-Director



Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán
Sinodal interno y Secretario



Dra. Rocio Campos Vega
Sinodal externo

DEDICATORIA

Papá, tu hija a veces siente que no puede más,
que el aire pesa y la vida cercena.
Papá, tu hija a veces se pregunta si de verdad vale la pena,
si tú también dudaste, si tuviste miedo, si alguna vez fracasaste.
Pero Papá, tu hija recuerda que es tu hija y entonces se levanta,
se sacude las rodillas, los codos, la esperanza;
se da un baño tibio, se bebe un café y se construye una nueva armadura,
porque no la criaste para rendirse.
Se mira al espejo y desde ahí reconoce tu sonrisa.

A **Papá Daniel**, porque mucho de lo que soy es el reflejo de él.
Como me haces falta, te amo y te extraño.

A **Mamá Lupita**, por ayudarme a mantenerme de pie cuando más lo he necesitado.
Espero algún día ser tan valiente como tú.

*Dios, concédeme serenidad para aceptar las cosas que no puedo cambiar, valor para
cambiar aquellas que sí puedo, y sabiduría para reconocer la diferencia.*

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora por permitirme el uso del Laboratorio de cultivo de células de cáncer.

Al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora por permitirme el uso del Laboratorio de microbiología y micotoxinas, y el Laboratorio de alimentos funcionales.

Al Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud por proporcionarnos las herramientas de citometría de flujo necesarias para la investigación.

Al Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales por proporcionarnos las herramientas espectroscópicas necesarias para la identificación de compuestos.

A la Universidad de Sonora por la formación académica y personal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de estudios de posgrado otorgada (CVU 1078485) y por el proyecto de Ciencia Básica A1-S-9762 con el cual fue financiada esta investigación.

Al comité de tesis por su paciencia, Dra. Burboa Zazueta, Dr. Gutiérrez Millán y Dra. Campos Vega, por su ayuda, su orientación, el conocimiento compartido, la retroalimentación brindada durante estos dos años, por la evaluación del presente trabajo, pero, sobre todo, por su comprensión.

Al Maestro Edgar, por siempre estar en disposición de brindarme su ayuda, y proporcionarme una vez más los conocimientos necesarios para a dominar el cultivo celular.

Al Dr. Juan, por su ayuda, orientación y consejos durante los ensayos de citometría de flujo; así como a la Dra. Candia Plata por permitirme hacer uso del equipo.

A la Dra. Hisila, por sus asesorías y su excelente disponibilidad para permitir que la identificación química de los compuestos activos se llevara a cabo.

A mi directora de tesis, Dra. Carmen María López Saiz, por su paciencia y disponibilidad, por enseñarme tanto y por saber escuchar, y aún más, por su empatía, es un placer trabajar con usted. ¡Gracias!

A mis compañeros Dania, Carolina, Héctor y Álan, por la ayuda brindada siempre que fue necesario.

A mis padres y mi hermano. A Papá, por darme el mundo mientras él pudo. A Mamá, por ser tan fuerte y ayudarme a seguir adelante. Y a mi hermano Carmelo, porque a su manera siempre me ha apoyado.

A mi familia, porque desde lejos siempre están presentes.

A Dios, porque confío en que él sabe porque y para qué hace las cosas.

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad crónico-degenerativa que ocupa uno de los primeros lugares en incidencia y mortalidad en el mundo. En busca de nuevas alternativas para su tratamiento, se ha estudiado el camarón *Litopenaeus vannamei*, donde a partir de su músculo se han reportado compuestos con potencial antiproliferativo sobre células cancerosas, sin afectar el crecimiento de las células no cancerosas, sin embargo, los reportes sobre células humanas son aún escasos. El presente estudio buscó comprender cómo se afecta la proliferación celular por acción de estos compuestos, evaluando el ciclo celular y caracterizando las moléculas bioactivas. Para esto, la fracción más activa fue obtenida, y evaluada por ensayo de MTT sobre células humanas 22Rv1 (carcinoma de próstata), HeLa (adenocarcinoma de cérvix), MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama) y ARPE-19 (células no cancerosas de retina). La actividad citotóxica más elevada se observó sobre la línea 22Rv1, con una IC_{50} de $35.96 \pm 1.70 \mu\text{g/mL}$, sin afectar el crecimiento de las células no cancerosas ARPE-19. A partir de la fracción más activa se obtuvieron las subfracciones A (de color amarillo) y B (de color anaranjado), las cuales posteriormente se caracterizaron químico-estructuralmente, demostrando que ambas contenían astaxantina, EPA y ftalato de dioctilo en diferentes proporciones; además de esto, fue posible descartar la presencia de β -caroteno, DHA y ácidos grasos monoinsaturados. Las subfracciones A y B fueron evaluadas cada una por MTT, observándose una disminución de la actividad obteniendo IC_{50} de 64.15 y 61.30 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Utilizando citometría de flujo se demostró la capacidad de las subfracciones A y B para provocar el arresto celular en la etapa G_0/G_1 de las células cancerosas 22Rv1. La actividad antiproliferativa demostrada en este estudio se atribuyó a la presencia de astaxantina y EPA, sugiriendo un posible efecto sinérgico entre ambas moléculas el cual se recomienda sea estudiado a mayor profundidad.

ABSTRACT

Cancer is a chronic-degenerative disease that occupies one of the first places in incidence and mortality worldwide. In the search for new treatment alternatives, *Litopenaeus vannamei* shrimp has been studied and compounds with antiproliferative potential on cancer cells have been reported from its muscle; these compounds do not affect the growth of non-cancerous cells, however, reports on human cells are still scarce. This study sought to understand how cell proliferation is affected by the action of these compounds, evaluating the cell cycle and characterizing the bioactive molecules. To achieve this, the most active fraction was obtained, and evaluated by MTT assay on human cells 22Rv1 (prostate carcinoma), HCT-116 (colon carcinoma), A549 (lung carcinoma), HeLa (cervical adenocarcinoma), MDA-MB-231 (breast adenocarcinoma) and ARPE-19 (retinal cells). The highest antiproliferative activity was observed on 22Rv1 cell line, with an IC₅₀ of 34.09 ± 2.14 µg/mL, without affecting the growth of non-cancerous ARPE-19 cells. Subfractions A (yellow in color) and B (orange in color) were obtained from the most active fraction, and chemically characterized, studies showed that both contained astaxanthin, EPA and dioctyl phthalate in different proportions. Additionally, it was possible to rule out the presence of β-carotene, DHA and monounsaturated fatty acids. Subfractions A and B were each evaluated by MTT, showing a decrease in activity, obtaining IC₅₀ of 64.15 and 61.30 µg/mL, respectively. Using flow cytometry, the ability of subfractions A and B to cause cellular arrest at the G₀/G₁ stage of 22Rv1 cancer cells was demonstrated. The antiproliferative activity demonstrated in this study was attributed to the presence of astaxanthin and EPA, suggesting a possible synergistic effect between both molecules, which should be studied in greater depth.

ÍNDICE GENERAL

APROBACIÓN	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
I. ANTECEDENTES.....	3
1.1. Cáncer	3
1.1.1. Definición y características generales	3
1.1.2. Estadísticas	4
1.1.3. Tratamientos y efectos secundarios.....	5
1.2. Ciclo celular y cáncer.....	6
1.3. Productos naturales marinos	11
1.3.1. Fármacos anticancerígenos de origen marino	11
1.3.1.1. Citarabina	12
1.3.1.2. Mesilato de eribulina	12
1.3.1.3. Brentuximab vedotina	12
1.3.1.4. Trabectedina	13
1.4. <i>Litopenaeus vannamei</i> y sus compuestos bioactivos en relación con el cáncer	13
1.4.1. Actividad antiproliferativa de la fase lipídica del músculo de <i>Litopenaeus vannamei</i>	15

II. HIPÓTESIS	18
III. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivo general.....	19
3.2. Objetivos específicos	19
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1. Especie de estudio.....	20
4.2. Líneas celulares y cultivo.....	20
4.3. Extracción	20
4.4. Purificación	21
4.5. Ensayo de viabilidad celular	21
4.6. Caracterización química.....	22
4.7. Citometría de flujo	23
4.8. Análisis estadístico	23
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
5.1. Rendimientos de extracción y purificación.....	24
5.2. Actividad antiproliferativa/citotóxica	25
5.3. Caracterización químico-estructural	33
5.4. Arresto celular por citometría de flujo.....	39
5.5. Astaxantina y cáncer de próstata.	43
5.6. Ácido eicosapentaenoico y cáncer de próstata.....	44
VI. CONCLUSIONES	47
VII. RECOMENDACIONES	48
VIII. LITERATURA CITADA	49

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Número estimado de casos nuevos y muertes por cáncer en 2020 en mujeres y hombres de todas las edades, en todo el mundo (OMS, 2022).	5
2	Porcentajes de viabilidad celular por MTT, obtenidos sobre células de cáncer de próstata (22Rv1) utilizando concentraciones de 10 a 50 µg/mL de la fracción 4 de la fase metanólica del extracto clorofórmico del músculo de <i>L. vannamei</i> . Los datos son expresados como media ± ee, resultado de tres ensayos independientes con tres réplicas cada uno. Letras diferentes representan diferencia significativa ($\alpha < 0.05$, prueba t de Student).	28
3	Porcentajes de viabilidad celular por MTT, obtenidos sobre células de epitelio pigmentado de retina (ARPE-19), utilizando concentraciones de 10 a 50 µg/mL de la fracción 4 de la fase metanólica del extracto clorofórmico del músculo de <i>L. vannamei</i> . Los datos son expresados como media ± ee, resultado de tres ensayos independientes con tres réplicas cada uno. Letras diferentes representan diferencia significativa ($\alpha < 0.05$, prueba t de Student).	29
4	Porcentajes de viabilidad celular por MTT, obtenidos sobre células de cáncer de próstata (22Rv1) utilizando concentraciones de 12.5 a 100 µg/mL de las subfracciones A y B de la fracción 4 de la fase metanólica del extracto clorofórmico del músculo de <i>L. vannamei</i> . Los datos son expresados como media ± ee, resultado de tres ensayos independientes con tres réplicas cada uno. Letras diferentes representan diferencia significativa ($\alpha < 0.05$, prueba t de Student).	31
5	Porcentajes de viabilidad celular por MTT, obtenidos sobre células de epitelio pigmentado de retina (ARPE-19) utilizando concentraciones de 12.5 a 100 µg/mL de las subfracciones A y B de la fracción 4 de la fase metanólica del extracto clorofórmico del músculo de <i>L. vannamei</i> . Los datos son expresados como media ± ee, resultado de tres ensayos independientes con tres réplicas cada uno. Letras diferentes representan diferencia significativa ($\alpha < 0.05$, prueba t de Student).	32

6	Espectros ^1H -RMN de las subfracciones A y B obtenidas a partir de la fracción 4 de la fase metanólica del extracto clorofórmico del músculo de <i>L. vannamei</i> .	34
7	Espectros ^{13}C -RMN de las subfracciones A y B obtenidas a partir de la fracción 4 de la fase metanólica del extracto clorofórmico del músculo de <i>L. vannamei</i> .	37
8	Comparación de espectros ^1H -RMN de las subfracciones A y B obtenidas a partir de la fracción 4 de la fase metanólica del extracto clorofórmico del músculo de <i>L. vannamei</i> , con espectros ^1H -RMN obtenidos a partir de β -caroteno, astaxantina, DOP y EPA.	38
9	Arresto celular por citometría de flujo sobre células de cáncer de próstata (22Rv1) utilizando concentraciones de 12.5 a 100 $\mu\text{g/mL}$ de las subfracciones A y B de la fracción 4 de la fase metanólica del extracto clorofórmico del músculo de <i>L. vannamei</i> . Los datos son expresados como media $\pm$ ee, resultado de tres ensayos independientes con tres réplicas cada uno. En una misma columna, letras diferentes representan diferencia significativa ($\alpha < 0.05$, prueba t de Student).	41
10	Arresto celular por citometría de flujo sobre células de epitelio pigmentado de retina (ARPE-19) utilizando concentraciones de 12.5 a 100 $\mu\text{g/mL}$ de las subfracciones A y B de la fracción 4 de la fase metanólica del extracto clorofórmico del músculo de <i>L. vannamei</i> . Los datos son expresados como media $\pm$ ee, resultado de tres ensayos independientes con tres réplicas cada uno. En una misma columna, letras diferentes representan diferencia significativa ($\alpha < 0.05$, prueba t de Student).	42

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Conformación de las fases móviles utilizadas durante la cromatografía en columna abierta.	22
2	Rendimiento en base al músculo durante las diferentes etapas de extracción y purificación.	24
3	Porcentajes de viabilidad celular por MTT, obtenidos sobre células de células de cáncer de mama (MDA-MB-231), cáncer cérvico uterino (HeLa), cáncer de próstata (22Rv1) y células de epitelio pigmentado de retina (ARPE-19), utilizando concentraciones de 12.5 a 100 µg/mL de las fracciones 1, 2, 3 y 4 de la fase metanólica del extracto clorofórmico del músculo de <i>L. vannamei</i> .	26

INTRODUCCIÓN

Cáncer es un término genérico para un gran grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento celular anormal más allá de los límites normales de control, estas células posteriormente pueden invadir partes adyacentes del cuerpo y/o extenderse a otros órganos. El cáncer se encuentra entre los primeros lugares como causa de muerte a nivel mundial, con un estimado de 10 millones de defunciones en 2020 (OMS, 2022).

Los productos naturales son una de las principales fuentes de compuestos para el descubrimiento de fármacos y han demostrado su potencial considerable en el campo biomédico. En este sentido, el medio marino, que cubre aproximadamente el 70% de la superficie de la tierra, representa un área de gran biodiversidad y existe la hipótesis de que esta se correlaciona con una amplia variedad química de productos naturales. Los metabolitos secundarios de los organismos marinos les brindan una posibilidad de supervivencia en condiciones desfavorables y, en consecuencia, ofrecen abundantes compuestos bioactivos que podrían ser potenciales candidatos para tratamientos de enfermedades (Ruiz-Torres *et al.*, 2017).

Entre los productos marinos, el camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) es una de las especies de acuicultura marina más importantes debido a su impacto económico y a que es la especie de camarón más producida en el mundo (Zhang *et al.*, 2017). Esta especie es nativa de la costa oriental del Océano Pacífico, desde Sonora y el Golfo de California en el norte de México, hasta el centro y sur de América. *L. vannamei* se encuentra en hábitats marinos tropicales, donde la temperatura del agua normalmente supera los 20°C durante todo el año (FAO, 2022).

El músculo del camarón es rico en proteínas y minerales, y es bajo en contenido de grasa. Además, sus lípidos exhiben importantes propiedades biológicas, como actividades quimiopreventivas y quimioprotectoras (López-Saiz *et al.*, 2013). Además de ello, se ha reportado que la fracción lipídica del músculo de *L. vannamei* contiene compuestos antiproliferativos con actividad sobre células cancerosas murinas y humanas (López-Saiz *et al.*, 2014; Ruiz-Almada, 2020; Garcia-Romo *et al.*, 2022), sin embargo, es necesario ampliar los conocimientos acerca del mecanismo de acción por el cual se lleva a cabo esta actividad

anticancerígena, evaluando la forma en que intervienen los compuestos responsables en la muerte celular y en el ciclo celular de distintas células cancerosas.

Por todo lo anterior, surgieron diversas preguntas de investigación como: ¿Existen compuestos en el músculo del camarón blanco que sean capaces de ejercer efecto antiproliferativo en células de cáncer humanas?, ¿qué estructura química tienen estos compuestos?, ¿de qué manera intervienen en el ciclo celular y cómo podrían afectar las moléculas de señalización de éste?

I. ANTECEDENTES

1.1. Cáncer

1.1.1. Definición y características generales

El cáncer es una enfermedad crónico-degenerativa no transmisible, que se caracteriza por la rápida multiplicación de células anormales, las cuales logran sobrepasar los límites habituales establecidos por el control del ciclo celular, células que posteriormente pueden invadir partes adyacentes del cuerpo e incluso diseminarse a otros órganos por un proceso denominado metástasis (OMS, 2022).

El proceso por el cual se desarrolla el cáncer es sumamente complejo, y esta complejidad viene dada desde la mayor predisposición que existe en algunos individuos comparado a otros, hasta los diferentes tipos de cáncer que existen y la variación de las subpoblaciones celulares que pueden encontrarse dentro de un mismo tipo de cáncer, e incluso dentro de un mismo individuo. Sin embargo, todas las enfermedades cancerosas se originan a partir de la suma de diversos factores, los cuales pueden ser exógenos como la alimentación, la contaminación ambiental, la luz ultravioleta y otros tipos de radiación, el uso de medicamentos, el alcoholismo y/o tabaquismo, e incluso la exposición a algunos agentes infecciosos; pero también intervienen factores endógenos, algunos controlables como la obesidad y los efectos positivos que proporciona el ejercicio físico, y otros no controlables como la predisposición heredada genéticamente. Además de éstos, existen factores como el sistema reproductivo, el nivel socioeconómico, la ocupación, el sedentarismo y la edad, que también intervienen en la existencia de un menor o mayor riesgo de padecer cáncer (Colditz *et al.*, 1996; Laggiou *et al.*, 2005).

De acuerdo con Hanahan y Weinberg (2011), las células cancerosas presentan características particulares o “sellos distintivos” que les permiten sobrevivir y proliferar de manera descontrolada, lo que posteriormente les da la posibilidad de migrar hacia otras partes del cuerpo. Estas características distintivas consisten en que las células cancerosas logran alterar los puntos de control de la supervivencia celular al mantener la señalización proliferativa, evadir los supresores de crecimiento, resistir la muerte celular, habilitar la inmortalidad replicativa,

inducir la angiogénesis, para finalmente activar la invasión a otros tejidos y metástasis a otros órganos. Sin embargo, para lograr estas particularidades, las células presentan primeramente inestabilidad genómica que da lugar a mutaciones que permiten su adecuación a las características anteriormente mencionadas, y se adaptan a un estado inflamatorio constante utilizando herramientas del sistema inmune a su favor. Además de lo anterior, las células cancerosas también reprograman su metabolismo energético para cumplir con la demanda que requiere una proliferación mantenida; así como también logran engañar y evadir a las células del sistema inmune evitando la eliminación.

1.1.2. Estadísticas

El cáncer representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial, con un estimado de 10 millones de defunciones para el año del 2020, esto significa que una de cada seis muertes en el mundo es causada por algún tipo de cáncer (OMS, 2022). Entre los principales tipos de cáncer, tomando en cuenta sus tasas de incidencia y mortalidad, se encuentran el cáncer de mama, pulmón, cáncer colorrectal, de próstata y de estómago para la población en general (**FIGURA 1**). Para el caso del sexo femenino, el cáncer de mama, colorrectal y pulmón ocupan los tres primeros lugares en incidencia, sin embargo, el cáncer de mama y de pulmón son los responsables del mayor número de defunciones por cáncer entre las mujeres de todo el mundo. Por otra parte, para el sexo masculino, los primeros lugares en incidencia son ocupados por el cáncer de pulmón, próstata y colorrectal, siendo el cáncer de pulmón la razón del mayor número de defunciones, seguido en segundo lugar por el cáncer de hígado a pesar de encontrarse en el quinto lugar de morbilidad (OMS, 2022, IARC, 2022).

Para el caso específico de México, los tipos de cáncer más comunes entre las mujeres son el cáncer de mama (28.2%), cérvix (8.9%), tiroides (8.6%), colorrectal (6.6%) y de útero (5.2%); sin embargo, los responsables del mayor número de muertes por cáncer en 2020 entre las féminas de México fueron el cáncer de mama (7,931 muertes), cérvix (4,335), hígado (3,650), colorrectal (3,585) y de estómago (3,060); tipos de cáncer similares a los reportados para los hombres, donde los primeros lugares en morbilidad los ocupan el cáncer de próstata (29.9%), colorrectal (8.9%), estómago (5.2%), pulmón (5%) y linfoma no-Hodgkin (4.6%), con mayores tasas de mortalidad para el cáncer de próstata (7,457 muertes), pulmón (4,304), colorrectal

(4,170), estómago (3,675) e hígado (3,525), esto para el último reporte registrado, correspondiente al año de 2020 (IARC, 2022).

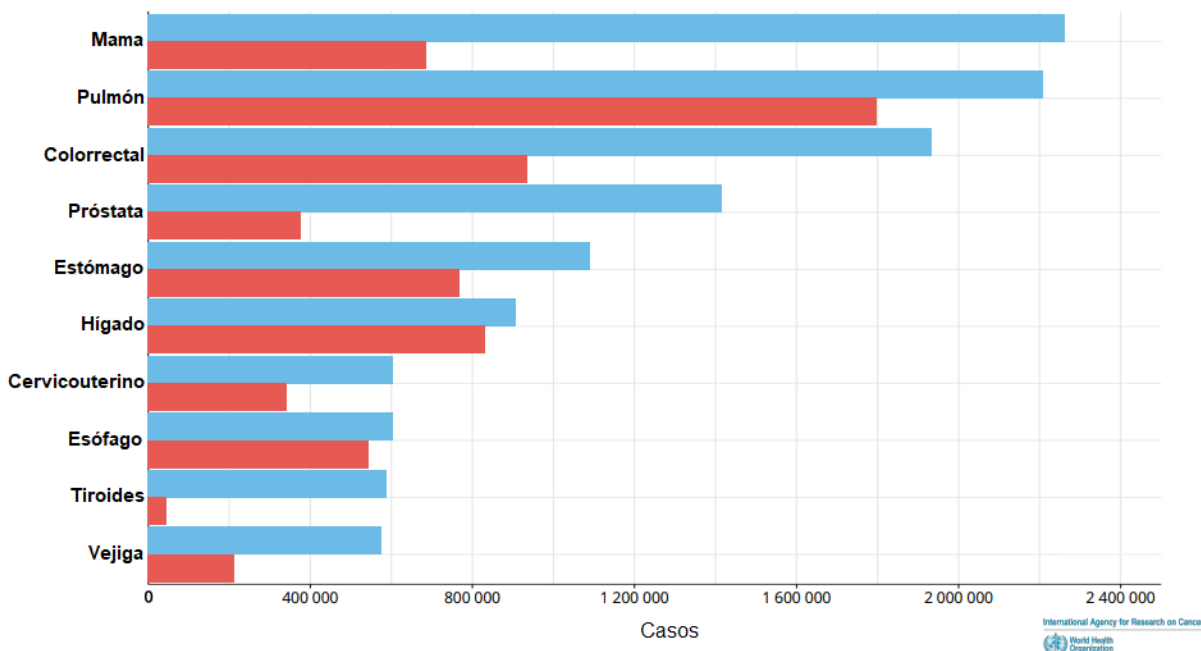


Figura 1. Número estimado de casos nuevos y muertes por cáncer en 2020 en mujeres y hombres de todas las edades, en todo el mundo (OMS, 2022).

1.1.3. Tratamientos y efectos secundarios

Entre las distintas estrategias que existen para combatir los diferentes tipos de cáncer, encontramos tratamientos muy diversos, con variabilidad en mecanismos de acción y técnicas de empleo igualmente diversas. Entre dichas alternativas podemos encontrar la cirugía, la quimioterapia y radioterapia, la terapia dirigida, la inmunoterapia y la terapia hormonal, así

como el trasplante de células madre o de médula ósea, o el empleo de la medicina de precisión que permite conocer el tratamiento que tiene una mayor probabilidad de efectividad según el paciente (American Cancer Society, 2022; NCI, 2022).

Unas de las primeras alternativas y de las aun mayormente utilizadas, es la quimioterapia, esta técnica utiliza fármacos que tienen como blanco aquellos impulsores moleculares de la carcinogénesis, es decir, tales necesarios para el crecimiento celular, la progresión del ciclo celular y por consiguiente la proliferación, impactando directamente en la progresión y el crecimiento tumoral (Seebacher *et al.*, 2019). Desafortunadamente, una de las implicaciones negativas de la quimioterapia es su baja especificidad, ya que los compuestos quimioterapéuticos también logran dañar a células no cancerosas, provocando un efecto citotóxico sobre éstas, el cual se refleja en efectos secundarios muy significativos que disminuyen la calidad de vida del paciente (Zhong *et al.*, 2021).

Los fármacos utilizados en la quimioterapia están mayormente diseñados para interrumpir el ciclo de células que proliferan rápidamente, como lo son las células cancerosas, sin embargo, también existen células normales en el cuerpo humano que se dividen más rápidamente que la mayoría, como por ejemplo algunas células precursoras que se encuentran en la médula ósea, algunos folículos pilosos y células que se encuentran a lo largo del tracto digestivo o en el sistema reproductivo, por lo que son altamente propensas a ser dañadas por los compuestos quimioterapéuticos. Además de esto, algunos fármacos han logrado afectar células cardíacas, de riñones y pulmones, de la vejiga, así como el sistema nervioso (American Cancer Society, 2022). Si bien la quimioterapia presenta desventajas considerables, sigue siendo de alta importancia y actualmente se combina con otros métodos con el fin de aumentar su efectividad y disminuir los efectos adversos. Y es por ello por lo que la investigación que envuelve este ámbito sigue en constante actualización, mejorando químicamente moléculas ya conocidas y buscando otras nuevas para evaluar su potencial farmacológico.

1.2. Ciclo celular y cáncer

Durante la proliferación celular, las células pasan por un proceso altamente regulado que da como resultado la replicación del ADN, posteriormente la segregación de este material genético y su asignación a cada célula hija, así como finalmente la división celular que da lugar a dos

células nuevas independientes (Coller, 2019), esta serie de eventos es conocida como ciclo celular. El ciclo celular consta de dos etapas distintas, la interfase, que engloba las fases encargadas de la duplicación de todo el contenido celular necesario para generar dos células funcionales, y la fase M, durante la cual se lleva a cabo la separación de la célula madre en dos células hijas genéticamente iguales (Matthews *et al.*, 2021). El objetivo de estos acontecimientos y su alta regulación es lograr la duplicación y separación del ADN genómico de una forma altamente precisa y eficaz.

La etapa denominada como interfase se conforma por las fases G_1 , S y G_2 . Durante la fase G_1 (fase preparatoria 1) la célula sintetiza y acumula las proteínas necesarias para llevar a cabo la replicación del ADN, de manera que hay crecimiento celular y por consecuencia la célula se vuelve más grande; posteriormente, durante la fase S (fase de síntesis) se lleva a cabo la duplicación de todo el material genético; y, durante la fase G_2 (fase preparatoria 2) la célula finaliza la replicación del ADN y se prepara para la siguiente fase sintetizando las proteínas necesarias para realizar la mitosis y duplicando todo su contenido celular. Por otra parte, la fase M se conforma por la mitosis y la citocinesis, las cuales están estrechamente acopladas. La mitosis involucra la segregación cromosómica y la división del núcleo celular; y posteriormente, durante la citocinesis el citoplasma de la célula se divide dando lugar a las dos células hijas. (Mercadante y Kasi, 2021; Wang, 2021). El inicio de cada fase durante la progresión del ciclo celular depende de la finalización adecuada de la fase anterior.

Además del anterior, las células en G_1 pueden salir del ciclo celular y entrar en la fase G_0 , estado no proliferativo también conocido como quiescencia, esta fase del ciclo involucra un estado de reposo. La mayoría de las células en un cuerpo adulto sano están en un estado no proliferativo (Matthews *et al.*, 2021; Wang, 2021).

De acuerdo con Alberts *et al.* (2015), el ciclo celular es regulado por el sistema de control del ciclo celular, sin embargo, en la mayoría de las células cancerosas se encuentra alterado favoreciendo el crecimiento celular y la proliferación. Este sistema de control funciona desencadenando los acontecimientos del ciclo celular en una secuencia determinada. Los participantes más importantes dentro del proceso de control del ciclo celular son miembros de una familia de proteínas cinasa denominadas cinasas dependientes de ciclinas (CDK). La

actividad de estas cinasas puede aumentar o disminuir conforme la célula progresa a través del ciclo, provocando cambios cíclicos en la fosforilación de proteínas intracelulares que inician o regulan los principales acontecimientos del ciclo celular. Los reguladores más importantes de las CDK son las proteínas denominadas ciclinas; las CDK, como su nombre lo indica, dependen de las ciclinas para realizar su actividad: a no ser que estén unidas a una ciclina, no tienen actividad de proteína cinasa. Existen cuatro clases de ciclinas más importantes, cada una de las cuales está definida por la etapa del ciclo celular en la que se unen a las CDK y actúan. Todas las células eucariotas necesitan tres de estas clases:

1. Las ciclinas G_1/S activan las CDK en las postrimerías de G_1 y así ayudan a desencadenar la progresión a través del inicio del ciclo, quedando la célula determinada a entrar en el ciclo celular. Sus niveles descienden en la fase S.

2. Las ciclinas S se unen a las CDK poco después de la progresión del ciclo, ayudando a estimular la duplicación de los cromosomas. Los niveles de las ciclinas S permanecen elevados hasta la mitosis, estas ciclinas contribuyen al control de algunos acontecimientos mitóticos iniciales.

3. Las ciclinas M activan las CDK que estimulan la entrada en la mitosis en el punto de control G_2/M . Las ciclinas M son degradadas hacia la mitad de la mitosis.

En la mayoría de las células una cuarta clase de ciclinas, las ciclinas G_1 , ayudan a controlar las actividades de las ciclinas G_1/S .

Los puntos de control del ciclo celular ayudan a mantener la integridad y fidelidad del material genético. Uno de los puntos de control más indispensables es el encargado de detectar daños en el ADN y responder a ellos, esto por medio de la detención o “arresto” del ciclo celular en las fases previas a la mitosis. La detención del ciclo en la fase G_1 le da el tiempo necesario a la célula para reparar el ADN antes de que éste sea replicado y así evitar el surgimiento de problemas durante su duplicación, sin embargo, también se puede llevar la detención en la fase S, en este punto se ralentiza la síntesis de ADN y se busca su reparación para continuar con el ciclo debidamente. De igual forma también se puede llevar el arresto en la fase G_2 , donde se evita que los daños en el ADN no detectados en las dos fases anteriores lleguen al punto de la segregación cromosómica. Un error en el ADN no detectado durante estas primeras fases del

ciclo proporciona las condiciones para el surgimiento de una mutación cromosómica. Por otra parte, durante el ensamblaje del huso mitótico se encuentra el segundo punto de control reglamentario, donde se supervisa que los microtúbulos del huso se unan debidamente a los cromosomas con el fin de garantizar una distribución uniforme del ADN hacia las dos células hijas (Panagopoulos y Altmeyer, 2021; Zou y Lin, 2021).

El estado en reposo o quiescencia de las células proporciona una ventana para la correcta organización y formación de estructuras tridimensionalmente complejas en el cuerpo humano, como lo son de tejidos y órganos. El salto de las células del estado de reposo a la proliferación y viceversa también representa un punto de control de la multiplicación celular (Coller, 2019). Cuando la célula ha detectado errores en el ADN que no logran repararse de forma inmediata, la entrada a la quiescencia es una opción para proporcionarle el tiempo necesario a la acción de los mecanismos de reparación, sin embargo, la célula también puede salir del ciclo celular de una manera irreversible si la reparación del ADN no ha logrado llevarse a cabo, activando la senescencia o la muerte celular apoptótica (Matthews *et al.*, 2021).

Las disfunciones en los puntos de control del ciclo celular dan como resultado material genético con errores no reparados, lo que proporciona una alta y progresiva inestabilidad genómica (Zou y Lin, 2021), siendo ésta una de las características habilitadoras más importantes para el desarrollo de las células cancerosas (Hanahan y Weinberg, 2011). Las mutaciones mantenidas en el material genético conllevan a la activación de oncogenes promotores del crecimiento y al silenciamiento de genes supresores de tumores, lo que finalmente conduce a una proliferación mantenida y desregulada, dando lugar a la expansión clonal de células mutadas (Panda *et al.*, 2019).

Uno de los supresores de tumores más importantes en las células, es la proteína p53, también conocida como "el guardián del genoma". Entre sus diferentes acciones que mantienen la homeostasis celular, participa en las vías de señalización que dirigen a la célula a la muerte celular, pero además juega un papel importante en la entrada y salida de la célula al estado de reposo (Ghatak *et al.*, 2020). La entrada de la célula al estado proliferativo después de G₀, es mediada por p53 dependiente de factores de crecimiento (Itahana, 2002). p53 es uno de los oncogenes comúnmente mutados en las células cancerosas, con respecto al ciclo celular, las

mutaciones en el gen TP53 que dirige a la síntesis de esta proteína, conllevan a una proliferación mantenida donde las células no entran a la fase de reposo y se multiplican a pesar de los daños no reparados en el ADN, permitiendo así el salto de los puntos de control. Las mutaciones en p53 también se ven reflejadas en la capacidad que tiene las células cancerosas de no llevar a cabo la muerte celular (Moulder *et al.*, 2018).

Las máximas reguladoras del ciclo celular, las CDK y las ciclinas, no son la excepción a las alteraciones que presentan las células cancerosas. Por mencionar algunas, las mutaciones que llevan a una actividad desregulada de CDK1 o su ciclina B se relacionan de forma negativa con el cáncer de mama, de pulmón y el colorrectal. Por otra parte, la desregulación de la ciclina A y/o E, que se unen a CDK2 se ha relacionado al desarrollo de algunos carcinomas, como el de mama, colon y próstata. La progresión acelerada de la célula por la fase G₁ conlleva a niveles altos de la ciclina E, lo cual a nivel clínico se correlaciona con un mal pronóstico. La desregulación directa de la CDK2 se asocia al desarrollo del cáncer de mama, de pulmón, neuroblastoma, linfoma de células B, glioblastoma multiforme, carcinoma hepatocelular y leucemia mieloide aguda; además de participar de forma significativa en la metástasis del cáncer de próstata. También, amplificaciones descontroladas de CDK4 se han observado en liposarcomas y glioblastomas, así como de CDK6 en cánceres gastrointestinales y carcinoma neuroendocrino de próstata. El cáncer medular de tiroides y el carcinoma hepatocelular se han asociado con niveles elevados de CDK5; CDK5 fosforila la proteína del retinoblastoma (pRb), otras de las oncoproteínas más importantes, ya que permite la progresión del ciclo celular mediante la activación de otras ciclinas y CDK; por otro lado, CDK5 también participa en vías de señalización involucradas en la metástasis de algunos tipos de cáncer. En otro sentido, CDK9 participa en la transcripción de factores antiapoptóticos de la familia Bcl-2, por lo que su desregulación ocasiona pérdida del control de la apoptosis. La CDK11^{p110} se sobre expresa en muchas líneas celulares cancerosas humanas, como células de osteosarcoma, leucemia de células T, leucemia mielógena crónica y algunos adenocarcinomas. La expresión inadecuada de CDK12 se relaciona con propiedades oncogénicas, debido a su correlación directa con el estado del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), sobre expresado en cánceres de mama, ovario, vejiga, páncreas y estómago (Łukasik *et al.*, 2021; Otto y Sicinski, 2017; Santo *et al.*, 2015).

1.3. Productos naturales marinos

Desde la antigüedad los productos naturales han sido utilizados para beneficiar o mejorar la salud del ser humano, desde los remedios caseros hasta la medicina actual, el uso de los recursos naturales ha sido un pilar clave. Los productos naturales representan una de las principales fuentes de compuestos para el descubrimiento de nuevos y eficaces fármacos, debido a los diferentes tipos de moléculas que se pueden obtener de la naturaleza. Este tipo de compuestos representan una gran familia de diversa constitución química con una amplia variedad de actividades biológicas, que se originan a partir de fuentes bacterianas, fúngicas, vegetales terrestres y marinos, así como de microorganismos y animales marinos (Katz y Baltz, 2016; Wilson *et al.*, 2020).

El uso de los productos naturales como alternativa anticancerígena no es la excepción, de manera que más del 60% de los compuestos que se utilizan como fármacos para combatir el cáncer provienen o son derivados de fuentes naturales. Si bien, la mayoría de los productos naturales no se convierten en fármacos tal como son obtenidos, una gran cantidad de moléculas y sus características particulares sirven para la síntesis química de otros compuestos o de análogos más eficaces (Cragg y Pezzuto, 2015).

En este sentido, el medio marino es una fuente de gran biodiversidad, la cual se correlaciona con una amplia variedad química de productos naturales, ya que alberga una gran cantidad de organismos con múltiples actividades biosintéticas que utilizan para garantizar su supervivencia en este hábitat que a menudo resulta hostil. Esto, debido a que el ecosistema marino, comparado a otros, presenta características particulares como sus bajas temperaturas, las altas presiones, los cambios en salinidad o la poca accesibilidad a la luz solar, las cuales, a través de la evolución, han condicionado a los organismos marinos permitiendo la síntesis de moléculas únicas. (Choudhary *et al.*, 2017; Khalifa *et al.*, 2019).

1.3.1. Fármacos anticancerígenos de origen marino

Dentro de las bioactividades que envuelven a un producto natural con potencial anticancerígeno, se encuentran una diversidad de mecanismos, como lo son el antiproliferativo, citotóxico, antioxidante, proapoptótico, antimutagénico, antiinflamatorio, e incluso el quimiopreventivo, además de aquellos involucrados en la inhibición de la invasión y la metástasis, entre otros

(Suarez-Jimenez *et al.*, 2012; López-Saiz *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2022). Y a pesar de que existen una gran cantidad de compuestos naturales de origen marino reportados, muy pocos han sido aprobados para su uso en humanos, los cuales se muestran a continuación.

1.3.1.1. Citarabina

La citarabina (1- β -arabinofuranosilcitosina), un análogo del nucleósido de desoxicitidina, fue obtenido a partir de la esponja caribeña *Tethya crypta*, siendo el primer producto natural marino aprobado por la FDA para su uso como fármaco anticancerígeno en humanos, en 1969 (Nigam *et al.*, 2019; Lamba, 2009). Desde 1974, este compuesto es utilizado en todos los regímenes para tratar la leucemia mieloide aguda, y se utiliza solo o en combinación con una antraciclina, como la daunorrubicina o idarrubicina (Di Francia *et al.*, 2021). La citarabina también se utiliza en otros tipos de cáncer hematológicos, como la leucemia linfoblástica aguda, la leucemia mielocítica crónica, la eritroleucemia y el linfoma de células del manto (Lamba, 2009). La citarabina interfiere con la división celular inhibiendo la síntesis de ADN durante la fase S del ciclo celular (Waseem *et al.*, 2018).

1.3.1.2. Mesilato de eribulina

El mesilato de eribulina es el análogo sintético del producto natural marino halicondrina B, este último es un poliéter macrólido de gran tamaño aislado de la esponja marina japonesa *Halichondria okadai*. La molécula sintética fue aprobada por la FDA en 2010 para el tratamiento del cáncer de mama metastásico en humanos (Jacot *et al.*, 2019). Este compuesto actúa interfiriendo con la dinámica de los microtúbulos y secuestrando la tubulina en agregados no productivos; estos eventos llevan a la interrupción del ciclo celular y su detención en G₂/M, de manera que la mitosis no se lleva a cabo y después de un bloqueo prolongado la célula es conducida hacia la muerte celular apoptótica (Huyck *et al.*, 2011).

1.3.1.3. Brentuximab vedotina

El fármaco Brentuximab vedotina es un conjugado que se conforma por el anticuerpo específico para el antígeno de superficie CD30, marcador distintivo del linfoma de Hodgkin, y monometil auristatina E. Este último es un agente antimitótico capaz de evitar la polimerización de la tubulina, de manera que evita la división celular e inhibe la progresión a través del ciclo, conduciendo finalmente a la apoptosis (Chen *et al.*, 2019). La monometil auristatina E es el

análogo sintético de la dolastatina 10, compuesto obtenido a partir de la libre marina *Dolabella auricularia* (Luesch *et al.*, 2001; Senter y Sievers, 2012). La Brentuximab vedotina fue aprobado en 2011 por la FDA para su uso en humanos (Senter y Sievers, 2012), representando un claro ejemplo de la terapia dirigida que surge a partir del uso de los productos naturales y pone en evidencia la importancia del estudio de éstos.

1.3.1.4. Trabectedina

La trabectedina es un compuesto alquilante de tetrahidroisoquinolina obtenido por primera vez a partir del tunicado marino *Ecteinascidia turbinata*. Actualmente la trabectedina se sintetiza químicamente y fue aprobada por la FDA en 2015 para uso como fármaco anticancerígeno en humanos, se utiliza como terapia de segunda línea para el sarcoma de tejidos blandos y para el cáncer de ovario recurrente sensible al platino, este último en combinación con otros fármacos como la doxorrubicina. La trabectedina logra unirse al N₂ de las moléculas de guanina que se encuentran en el surco menor del ADN, controlando la expresión de genes relacionados a la proliferación, la diferenciación y la apoptosis de las células cancerosas; además, la trabectedina logra afectar el microambiente tumoral, alterando la capacidad de las células tumorales para reclutar a macrófagos asociados a tumores, disminuyendo la producción de factores de crecimiento, quimiocinas y citocinas promotoras (Carminati *et al.*, 2018; Nigam *et al.*, 2019).

1.4. *Litopenaeus vannamei* y sus compuestos bioactivos en relación con el cáncer

Con lo que respecta al camarón blanco del Pacífico, *L. vannamei*, éste representa la especie de camarón económicamente más importante desde el punto de la acuicultura, ya que en alrededor del 90% de la producción mundial de camarón es utilizando este ejemplar. *L. vannamei* es una especie rica en aminoácidos, péptidos, proteínas y otros productos bioquímicos útiles, por lo que se considera de alto valor nutritivo y además es conocido como un producto de buen sabor (Qiao *et al.*, 2018). El camarón es una de las especies marinas de las que ya se ha reportado la obtención de productos con actividades biológicas, esto a partir de sus diversas especies y de sus diferentes regiones anatómicas. Sin embargo, mucho del aprovechamiento ha sido mayormente a partir de la cabeza y el exoesqueleto, debido a que éstos no son utilizados como alimento para el ser humano y normalmente son desechados.

De acuerdo con Sowmya y Sachindra (2012), el principal desecho del procesamiento del camarón, la cáscara, es una fuente importante de compuestos carotenoides, mayormente astaxantina y sus subproductos esterificados, reafirmando la capacidad de este compuesto como un fuerte antioxidante. De manera que la cáscara del camarón se considera materia prima para la obtención de antioxidantes naturales con utilidad en alimentos y aplicaciones biomédicas. La astaxantina es el pigmento más abundante en el camarón blanco *L. vannamei* (Qiao *et al.*, 2018).

Por otra parte, según López-Saiz *et al.* (2013), *L. vannamei* es una fuente de compuestos quimiopreventivos; la quimiopreención hace referencia al uso de agentes naturales, sintéticos o biológicos para revertir, suprimir o prevenir el desarrollo del cáncer en sus distintas etapas. De acuerdo con los autores, dentro de los compuestos que conforman la fracción lipídica del camarón, aquellos con potencial quimiopreventivo son principalmente los carotenoides y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). Los carotenoides pueden ejercer su efecto quimiopreventivo y quimioprotector por medio de mecanismos antioxidantes, antiproliferativos, antimutagénicos y antiinflamatorios. Por el contrario, los AGPI pueden ejercer un efecto quimiopreventivo debido a su acción antiinflamatoria y antiangiogénica, así como a su capacidad de intervenir en la acción de factores de transcripción y de influenciar la producción de radicales libres.

En 2016, López-Saiz *et al.* evaluaron el potencial antimutagénico de la fracción soluble en cloroformo del músculo de *L. vannamei*, reportando un alto potencial para este tipo de extracto, donde el carotenoide astaxantina pareciera ser el responsable de la bioactividad, sin embargo, tomando en cuenta la caracterización química realizada por los autores, no se descartó la posibilidad de que los compuestos responsables de la mayor actividad sean compuestos apocarotenoides. Los apocarotenoides se definen como productos de escisión de los carotenoides originales (Harrison y Quadro, 2018).

En otro sentido, Kuedo *et al.* (2016), reportaron que los extractos de astaxantina obtenidos a partir de la cáscara de *L. vannamei* tienen la capacidad de disminuir la inflamación aguda al lograr reducir el edema local inducido por carragenina, y que a su vez este carotenoide puede jugar un papel positivo en el tratamiento del dolor inflamatorio; confirmando así el potencial antiinflamatorio del carotenoide astaxantina. La capacidad de los carotenoides para modular el desequilibrio oxido-reducción celular es muy conocido, además de su potencial para intervenir

en procesos endoteliales y metabólicos relacionados con inflamación (Ambati *et al.*, 2014; Chang y Xiong, 2020).

Además de lo anterior, también se ha reportado la obtención de la hemocianina a partir del camarón *L. vannamei*. De acuerdo con Zheng *et al.* (2016), la hemocianina de *L. vannamei* tiene la capacidad de disminuir el crecimiento y la proliferación de las células cancerosas humanas HeLa *in vitro*, por medio de la muerte celular apoptótica mediada por mitocondrias. Por otro lado, Liu *et al.* (2017) demostraron que la hemocianina de *L. vannamei* tiene la capacidad de ejercer un efecto antitumoral en ratones con tumores S180, posiblemente a que ejerce un efecto positivo sobre el sistema inmune y la actividad antioxidante. La hemocianina es una glicoproteína extracelular que se encuentra en la hemolinfa de moluscos y artrópodos. Su función principal es el transporte de oxígeno, sin embargo, también participa en el almacenamiento de energía, la osmorregulación, el ciclo de muda y la formación del exoesqueleto (Zheng *et al.*, 2016)

1.4.1. Actividad antiproliferativa de la fase lipídica del músculo de *Litopenaeus vannamei*

La proliferación es referida como el rápido crecimiento de la población celular (Alberts *et al.*, 2015), por lo que la actividad antiproliferativa hace referencia a los compuestos que son capaces de intervenir en el proceso de división celular, ciclo celular o muerte celular.

Wilson *et al.* (2010), reportaron por primera vez que la fase lipídica del músculo de *L. vannamei* (obtenida con cloroformo) tiene la capacidad de afectar la proliferación de células cancerígenas murinas, específicamente de linfoma de células B, línea celular M12.C3.F6. En dicho estudio, también se llevó a cabo la semi-caracterización de los extractos y se reportó que la bioactividad era debido a la presencia de ácidos grasos de cadena larga, intuyendo los autores la presencia de AGPI n-3, mayormente conocidos como AGPI omega-3. Los ácidos grasos omega-3 (ω -3) se caracterizan por tener un doble enlace entre el tercer y cuarto carbono desde el extremo metilo. Estos ácidos grasos pueden ser monoinsaturados donde la cadena hidrocarbonada sólo contiene ese doble enlace, o poliinsaturados que contienen dos o más dobles enlaces conjugados a lo largo de la cadena hidrocarbonada que conforma la molécula (Cholewski *et al.*, 2018).

Entre los AGPI ω -3 más representativos se encuentran el ácido alfa-linolénico (ALA), el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA). El ALA es un AGPI ω -3 esencial, es decir, los humanos no pueden sintetizarlo *de novo*, de manera que debe adquirirse completamente de fuentes exógenas; si bien ALA es un precursor del EPA y DHA, esto depende de una alta disponibilidad de ALA, la cual resulta insuficiente en los humanos, por lo que estos últimos son considerados condicionalmente esenciales (Richter *et al.*, 2017; Weyland *et al.*, 2015). De manera que la biodisponibilidad adecuada de estos tres AGPI en el cuerpo depende en su gran mayoría de la ingesta alimentaria.

López-Saiz *et al.* (2014), evaluaron la fase lipídica del músculo de *L. vannamei* sobre la línea celular murina M12.C3.F6; los autores realizaron una partición utilizando metanol y hexano, a partir del extracto clorofórmico, seguido de un fraccionamiento de la fase metanólica por HPLC semipreparativo. En este estudio se demostró que los compuestos con mayor actividad antiproliferativa se encontraban en las fracciones menos polares obtenidas de la fase metanólica del extracto clorofórmico del músculo del camarón blanco *L. vannamei*. Entre los compuestos a los que dichos investigadores atribuyeron la actividad antiproliferativa, de acuerdo con los estudios de caracterización, se reportó un triglicérido esterificado con un ácido graso saturado, EPA, así como un AGPI de cadena larga como responsable de la bioactividad de las fracciones más prometedoras, además de la presencia del compuesto ftalato de di-(2-etilhexilo) (ftalato de dioctilo o DOP) en una de las subfracciones bioactivas con menor potencial.

Tomando como referencia las investigaciones anteriores, Ruiz-Almada (2020) evaluó el potencial de las fracciones menos polares de la fase metanólica del extracto clorofórmico del músculo de *L. vannamei* sobre líneas celulares humanas, demostrando que el músculo del camarón blanco contiene compuestos de naturaleza lipídica capaces de afectar la viabilidad de células de cáncer de próstata, 22Rv1, con un efecto dosis-respuesta evidente, esto sin afectar a las mismas concentraciones a las células no cancerosas ARPE-19 de epitelio de retina utilizadas como control. Además, en dicho estudio también se reportó que estos mismos compuestos no logran afectar significativamente a las células de cáncer de colon, HCT-116.

Por otra parte, García-Romo *et al.* (2022), siguiendo un proceso de extracción similar a los estudios descritos, reportó que el músculo del camarón blanco *L. vannamei* contiene compuestos lipídicos capaces de afectar a las células de cáncer de próstata humano 22Rv1 sin afectar a las células no cancerosas utilizadas como control, reportando características de muerte celular apoptótica en las células cancerosas afectadas. Además, también se evaluó su efecto sobre las células de cáncer de cérvix (HeLa), mama (MDA-MB-231), pulmón (A549) y colon (HCT-116), las cuales no resultaron susceptibles a los compuestos bioactivos. Los investigadores reportaron que las fracciones bioactivas contenían DOP, EPA y un compuesto derivado de alcaloides de indolocarbazol, sin embargo, demostraron que DOP no tiene actividad antiproliferativa sobre la línea 22Rv1, y que, si bien EPA si aporta al potencial, los autores atribuyeron la mayor bioactividad a la presencia del derivado de alcaloides de indolocarbazol.

II. HIPÓTESIS

Los compuestos antiproliferativos de naturaleza lipídica extraídos del músculo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) tienen la capacidad de provocar el arresto celular en líneas cancerosas humanas a través de su intervención en la regulación de dicho ciclo.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar la intervención de compuestos antiproliferativos extraídos del músculo del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en el ciclo de líneas celulares de cáncer humano.

3.2. Objetivos específicos

- Evaluar el potencial citotóxico de los compuestos extraídos del músculo del camarón *Litopenaeus vannamei* en células de cáncer humano.
- Caracterizar químico-estructuralmente los compuestos extraídos del camarón blanco que tengan mayor bioactividad sobre líneas celulares de cáncer humano.
- Determinar la intervención de los compuestos antiproliferativos del músculo del camarón *L. vannamei* en el ciclo celular de líneas de cáncer humano, valorando el tipo de arresto celular.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Especie de estudio

Los especímenes del camarón *L. vannamei* fueron obtenidos en mercados locales de la ciudad de Hermosillo, Sonora en México. Se utilizaron camarones de talla adulta y se adquirieron durante las diferentes estaciones del año. Las muestras fueron empaquetadas y almacenadas a -20°C en bolsas de polietileno hasta su posterior uso.

4.2. Líneas celulares y cultivo

Células de carcinoma de próstata 22Rv1 (ATCC® CRL-2505™), adenocarcinoma invasivo de mama MDA-MB-231 (ATCC® CRM-HTB-26™), adenocarcinoma de cérvix HeLa (ATCC® CRM-CCL-2™) y células no cancerosas de epitelio pigmentado de retina ARPE-19 (ATCC® CRL-2302™) fueron donadas por el Laboratorio de cultivo de células de cáncer del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas y mantenidas en óptimas condiciones en una incubadora VWR a una temperatura de 37°C, con una atmósfera con el 5% de CO₂ y humedad del 80%, utilizando medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (SIGMA®) para la línea celular 22Rv1 y medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (SIGMA®) para las líneas celulares restantes, ambos suplementados con 15% de suero fetal bovino (SFB) (gibco®). Las condiciones mencionadas también fueron utilizadas durante los ensayos de viabilidad y arresto celular.

4.3. Extracción

Para la obtención de la fase lipídica reportada con mayor potencial antiproliferativo (Wilson-Sanchez *et al.*, 2010; López-Saiz *et al.*, 2014), el músculo de *L. vannamei* fue obtenido retirando la cabeza y el exoesqueleto del crustáceo, posteriormente fue homogenizado con cloroformo en una proporción 1:5 (p/p) utilizando un procesador de alimentos, el producto fue colocado en un matraz Erlenmeyer donde fue agitado constantemente durante 1 h a temperatura ambiente (25°C) protegido de la luz, la mezcla obtenida se sometió a filtración con vacío utilizando papel filtro Whatman No.1 y el filtrado obtenido fue llevado a sequedad bajo presión negativa, utilizando un rotavapor (Yamato, RE300) a no más de 35°C. El extracto clorofórmico fue

recuperado con partes iguales de metanol y hexano, se dejó reposar durante 1 h en un matraz de separación a 4°C y finalmente las partes inmiscibles fueron recolectadas por separado, la fase metanólica fue llevada nuevamente a sequedad bajo presión negativa con la ayuda de un rotavapor. La muestra obtenida fue recuperada con cloroformo y almacenada a -20°C en un vial color ámbar hasta su posterior uso.

4.4. Purificación

La fase metanólica obtenida fue fraccionada mediante cromatografía de columna abierta bajo gravedad, utilizando como fase estacionaria sílica-gel (SIGMA®, 70-230 mesh); las medidas del empaque de la columna fueron de 75 cm de longitud y 5 cm de diámetro. Como fase móvil, se utilizó una mezcla de solventes incrementando el grado de polaridad, formado por mezclas en distinta proporción de los solventes hexano y acetona (**Tabla 1**), las cuales se ajustaron a un volumen final de 500 mL aumentando gradualmente en un 5% el porcentaje de acetona, iniciando de cero. Los eluatos se recolectaron por unidad de volumen (250 mL) y fueron monitoreados utilizando cromatografía en capa fina (TLC), revelando las señales en una cámara de luz ultravioleta de alta y baja frecuencia, para unir aquellas con bandas similares en una misma fracción. De las fracciones obtenidas se seleccionaron las primeras cuatro (López-Saiz *et al.*, 2014) para su evaluación. Todo el procedimiento de obtención se realizó protegiendo de la luz y el calor.

4.5. Ensayo de viabilidad celular

El potencial citotóxico de las fracciones seleccionadas fue evaluado mediante el ensayo estándar de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol) (Mosmann, 1983). Para ello, 10,000 células por cada 100 µL fueron colocadas por pozo en una microplaca de 96 pozos, tras 24 h de incubación el medio fue retirado y sustituido, según la línea celular, por medio DMEM o RPMI suplementado con SFB que contenía distintas concentraciones (12.5, 25, 50 y 100 µg/mL ó 10, 20, 30, 40 y 50 µg/mL, según el ensayo) de las fracciones a evaluar disueltas previamente en dimetilsulfóxido (DMSO); las células con los estímulos fueron incubadas por 48 h. Finalizada la incubación, se agregaron 10 µL de solución madre de MTT (5 mg/mL) y se realizó una última incubación de 4 h, posteriormente el medio fue retirado y se agregaron 50 µL

de DMSO para disolver los cristales de formazán . Tras diez min, las absorbancias fueron medidas en un lector de microplacas (800 TS de Agilent) utilizando 570 nm como longitud de onda de prueba y 630 nm como referencia. Se evaluaron tres repeticiones y tres réplicas de cada tratamiento.

Tabla 1. Conformación de las fases móviles utilizadas durante la cromatografía en columna abierta.

No. de fase móvil	Solventes				Volumen final
	Hexano		Acetona		
	Porcentaje	mL	Porcentaje	mL	
1	100	500	0	0	500 mL
2	95	475	5	25	500 mL
3	90	450	10	50	500 mL
4	85	425	15	75	500 mL
5	80	400	20	100	500 mL
6	75	375	25	125	500 mL
7	70	350	30	150	500 mL
8	65	325	35	175	500 mL
9	60	300	40	200	500 mL

4.6. Caracterización química

Las muestras fueron analizadas por Resonancia Magnética de Nuclear, tanto de protón (^1H -RMN) como de carbono (^{13}C -RMN), los espectros fueron analizados en un espectrómetro Bruker Avance 400 (Bruker Instruments Inc. USA), a 400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C .

Para la lectura, 20 mg de las muestras se disolvieron en 1 mL de cloroformo deuterado (CDCl_3) (SIGMA®) y se utilizó tetrametil silano (TMS) como estándar interno.

4.7. Citometría de flujo

Para la determinación del tipo de arresto celular se siguió la metodología descrita por Ho *et al.* (2019), con algunas modificaciones; 200,000 células fueron colocadas en 1 mL de medio de cultivo por pozo en microplacas de 12 pozos, tras 24 h de incubación el medio fue retirado y sustituido, como correspondiera, con medio DMEM o RPMI suplementado con SFB con distintas concentraciones de las fracciones a evaluar (12.5, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$) disueltas previamente en DMSO, las células con los estímulos fueron incubadas por 24 h. Posterior a la incubación, las células fueron lavadas con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X (centrifugando a 250 $\times g$, 5 min, a 4°C) y despegadas con tripsina, tras un segundo lavado con PBS frío las células fueron fijadas con formaldehído frío al 2% durante 12 min a 4°C. Después de la fijación, las células se lavaron dos veces con PBS frío y posteriormente se incubaron en 0.5 mL de Triton X-100/PBS al 0.5% a 37°C durante 15 min y se tiñeron con 1 μL de yoduro de propidio (PI) (eBioscience, cat. 00-6990-42). Inmediatamente después (máximo 1 h), el ciclo celular fue evaluado por citometría de flujo. La intensidad media de la fluorescencia roja del PI de las células individuales teñidas fue medida en el canal PE-A, utilizando un citómetro BD FACSVeTM (Becton Dickinson). Un mínimo de 10,000 eventos fueron registrados y los datos fueron analizados utilizando el software BD FACSuiteTM (BD Biosciences). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, cada réplica contenía 3 repeticiones.

4.8. Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Todos los datos fueron expresados como media $\pm$ error estándar (ee), datos obtenidos de tres repeticiones con tres réplicas cada una. Se realizó la comparación de medias utilizando la prueba de t de Student con un valor de $\alpha < 0.05$. Los valores de concentración media inhibitoria o IC_{50} fueron obtenidos a partir de las curvas dosis-respuesta, utilizando un modelo de regresión Probit. Se utilizó el paquete estadístico JMP 9.0.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Rendimientos de extracción y purificación

Las muestras obtenidas de la extracción clorofórmica y de la fracción metanólica presentaron coloración naranja brillante, la cual puede ser atribuible a la presencia de compuestos del tipo carotenoide en la capa epidérmica del músculo (Rodríguez-Bernal *et al.* 2017). El rendimiento del extracto, partición y fracciones fueron analizados (**Tabla 2**). Los rendimientos obtenidos en el presente trabajo son más bajos que los reportados por López-Saiz *et al.* (2014), pero similares a los reportados por García-Romo *et al.* (2022), las diferencias se pueden deber a la alimentación y a la época de captura del espécimen; se ha reportado que las proporciones de AGPI pueden variar, sin embargo, el consumo siempre se ha recomendado dentro de una dieta balanceada (Ayas *et al.*, 2013).

Tabla 2. Rendimiento en base al músculo durante las diferentes etapas de extracción y purificación.

	Rendimiento en base al músculo (%)
Extracto clorofórmico	0.412 ± 0.04
Fase metanólica	0.285 ± 0.03
Fracciones	
F1	0.012 ± 0.003
F2	0.013 ± 0.003
F3	0.030 ± 0.01
F4	0.022 ± 0.003

Los datos son expresados como media ± ee, resultado de un mínimo de cuatro extracciones independientes.

5.2. Actividad antiproliferativa/citotóxica

Para la evaluación de la viabilidad celular por MTT en diferentes tipos de cáncer, se utilizaron las cuatro líneas celulares: células de cáncer de mama (MDA-MB-231), cáncer cérvico uterino (HeLa), cáncer de próstata (22Rv1) y células no cancerosas de retina (ARPE-19); y se utilizaron concentraciones seriadas (12.5, 25, 50 y 100 µg/mL) para las fracciones a analizar (fracción 1, 2, 3 y 4) obtenidas a partir de la fase lipídica del músculo del camarón *L. vannamei*. Además, se utilizó como control positivo el fármaco quimioterapéutico cisplatino, a una concentración de 100 µg/mL.

De acuerdo con López-Saiz *et al.* (2014) y Ruiz-Almada *et al.* (2020) entre las fracciones que conforman la fase metanólica del extracto lipídico del camarón blanco (obtenida con cloroformo), aquellas que fueron reportadas con actividad antiproliferativa significativa sobre células de linfoma murino (M12.C3.F6) y cáncer de próstata (22Rv1) son las que contienen los compuestos de menor polaridad, por lo que de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna, se seleccionaron las cuatro primeras para ser evaluadas sobre células cancerosas humanas.

Ruiz-Almada (2020), siguiendo la misma metodología, reportó que el músculo de *L. vannamei* contiene compuestos de naturaleza lipídica con “potencial” antiproliferativo dependiente de la dosis sobre células de cáncer de próstata (22Rv1), sin afectar las células no cancerosas, pero, que dichos compuestos no fueron capaces de afectar la viabilidad celular de células de cáncer de colon (HCT-116), sin embargo, en dicha investigación, no fueron reportadas IC₅₀.

En el caso de la primera evaluación, descrita anteriormente, en los resultados obtenidos (**Tabla 3**) se puede observar cómo, a las concentraciones empleadas, las tres primeras fracciones no lograron afectar la viabilidad de ninguna de las líneas de cáncer evaluadas, así como tampoco afectaron las células no cancerosas. Sin embargo, los resultados obtenidos para la fracción 4 muestran inhibición de la proliferación celular.

Tabla 3. Porcentajes de viabilidad celular por MTT, obtenidos sobre células de células de cáncer de mama (MDA-MB-231), cáncer cérvico uterino (HeLa), cáncer de próstata (22Rv1) y células de epitelio pigmentado de retina (ARPE-19), utilizando concentraciones de 12.5 a 100 µg/mL de las fracciones 1, 2, 3 y 4 de la fase metanólica del extracto clorofórmico del músculo de *L. vannamei*.

Frac.	Conc. (µg/mL)	Porcentaje de viabilidad celular			
		MDA-MB-231	HeLa	22Rv1	ARPE-19
1	100	116.89 ± 9.31 ^{abcd}	87.85 ± 10.25 ^{cd}	111.88 ± 6.14 ^{bcd}	96.42 ± 3.68 ^{abcd}
	50	133.21 ± 11.08 ^a	112.37 ± 5.49 ^a	131.05 ± 5.33 ^a	99.56 ± 2.88 ^{abcd}
	25	94.78 ± 4.81 ^e	98.87 ± 6.61 ^{abc}	116.22 ± 9.01 ^{abc}	96.36 ± 4.78 ^{abcd}
	12.5	110.06 ± 4.14 ^{bcde}	93.61 ± 4.42 ^{abc}	105.31 ± 3.92 ^{cd}	91.94 ± 3.83 ^{bcd}
2	100	120.60 ± 6.84 ^{ab}	93.65 ± 5.64 ^{abc}	99.45 ± 7.90 ^{de}	84.43 ± 6.41 ^{cde}
	50	120.27 ± 6.26 ^{abc}	99.62 ± 5.15 ^{abc}	125.79 ± 8.45 ^{ab}	89.19 ± 4.59 ^{bcd}
	25	92.27 ± 4.54 ^e	89.93 ± 6.68 ^{bcd}	111.44 ± 3.83 ^{bcd}	83.39 ± 6.27 ^{de}
	12.5	100.39 ± 3.11 ^{cde}	101.53 ± 4.00 ^{abc}	99.24 ± 5.89 ^{de}	92.08 ± 2.98 ^{bcd}
3	100	107.12 ± 3.71 ^{bcde}	95.51 ± 5.70 ^{abc}	113.50 ± 5.64 ^{bcd}	104.77 ± 6.28 ^{ab}
	50	120.97 ± 5.04 ^{ab}	102.67 ± 2.36 ^{abc}	112.43 ± 5.24 ^{bcd}	92.74 ± 4.29 ^{abcd}
	25	95.69 ± 5.19 ^e	91.96 ± 5.90 ^{abcd}	102.53 ± 3.35 ^{cd}	96.88 ± 3.07 ^{abcd}
	12.5	116.77 ± 4.48 ^{abcd}	110.15 ± 8.65 ^{ab}	99.47 ± 3.56 ^{de}	84.65 ± 3.43 ^{cde}
4	100	0.49 ± 0.49 ^g	3.02 ± 1.11 ^f	3.13 ± 0.24 ^g	2.50 ± 1.24 ^f
	50	68.14 ± 18.10 ^f	71.14 ± 19.69 ^d	0.63 ± 0.42 ^g	70.18 ± 17.37 ^e
	25	97.25 ± 7.18 ^{de}	101.64 ± 5.72 ^{abc}	85.78 ± 8.83 ^e	108.68 ± 3.58 ^a
	12.5	125.44 ± 2.05 ^{ab}	105.31 ± 8.30 ^{abc}	97.66 ± 4.53 ^{de}	100.92 ± 3.91 ^{abc}
Cisp.	100	64.22 ± 6.44 ^f	28.79 ± 6.79 ^e	51.19 ± 4.48 ^f	83.66 ± 3.49 ^{de}

Los datos son expresados como media ± ee, resultado de tres ensayos independientes con tres réplicas cada uno.
En una misma columna, letras diferentes representan diferencia significativa ($\alpha < 0.05$, prueba *t* de Student).

A la concentración más alta de 100 µg/mL utilizada de la fracción 4, las cuatro líneas celulares se vieron afectadas de manera significativa, es decir, tanto células cancerosas como no cancerosas. Los porcentajes de viabilidad celular fueron muy cercanos a cero para las cuatro líneas celulares, el efecto fue incluso mayor que el control positivo (cisplatino).

Para las concentraciones más bajas de 12.5 y 25 µg/mL, la viabilidad de dos tipos de células de cáncer (mama y cérvix), y las células no cancerosas (retina) no se vio afectada; por otra parte, la viabilidad de la línea celular de cáncer de próstata (22Rv1) cuando se utilizaron estas concentraciones disminuyó por debajo del 100 %. Para la concentración de 50 µg/mL, la viabilidad celular disminuyó alrededor de un 30 % para las líneas celulares MDA-MB-231 y HeLa, pero para las células 22Rv1 el porcentaje de viabilidad disminuyó una vez más hasta cero, como sucede a 100 µg/mL, lo que sugiere mayor susceptibilidad a los compuestos citotóxicos/antiproliferativos presentes en la fase lipídica del músculo de *L. vannamei* para las células 22Rv1 comparado a otro tipo de células cancerosas.

Si bien, las células no cancerosas ARPE-19 se ven afectadas a la concentración más alta de la fracción 4, a 50 µg/mL sólo disminuye en un 30 % como se observa también en las otras dos líneas cancerosas. De manera que este primer screening de bioactividad sugiere que existen concentraciones entre los 25 y los 50 µg/mL de la fracción 4 que pueden disminuir la viabilidad celular de las células de cáncer de próstata 22Rv1 de manera significativa sin afectar a las células no cancerosas control utilizadas, entre ellas la IC₅₀.

Por todo lo anterior, la fracción 4 de la fase metanólica del extracto clorofórmico de *L. vannamei* es la que presenta la mayor actividad citotóxica, y la línea celular más sensible es carcinoma de próstata (22Rv1), siendo seleccionadas para continuar en los ensayos posteriores. Esto concuerda con los resultados obtenidos por García-Romo *et al.* (2022) y Ruiz-Almada (2020), quienes reportaron un efecto citotóxico más pronunciado para la línea 22Rv1 a partir de este procedimiento de extracción. La línea 22Rv1 fue desarrollada en el laboratorio y es derivada del xenoinjerto CWR22R; se ha reportado que esta línea expresa receptores andrógenos a diferencia de las otras líneas celulares de cáncer de próstata (Sramkoski *et al.*, 1999).

Para el segundo ensayo de viabilidad por MTT se utilizaron concentraciones entre 10 y 50 µg/mL de la fracción cromatográfica 4 sobre las células de cáncer de próstata 22Rv1 (**Figura**

2), con el fin de encontrar la concentración capaz de disminuir el 50% de población celular (IC_{50}) comparado al control de células no estimuladas. En el gráfico es posible observar el efecto dosis-respuesta estadísticamente significativo que ejerce la fracción 4 sobre este tipo de células, donde aún a 40 $\mu\text{g/mL}$ se disminuyó la viabilidad celular por debajo del 50%. Tomando en cuenta estos resultados y utilizando un modelo de regresión Probit, la IC_{50} fue de 35.96 ± 1.70 $\mu\text{g/mL}$. Según el Instituto Nacional del Cáncer (NCI), el límite establecido para considerar un extracto activo es de 30 $\mu\text{g/mL}$ y de 4 $\mu\text{g/mL}$ para compuestos puros (Alonso-Castro *et al.*, 2011), y si bien el valor de IC_{50} obtenido no se encuentra dentro de este intervalo, el valor si es muy cercano.

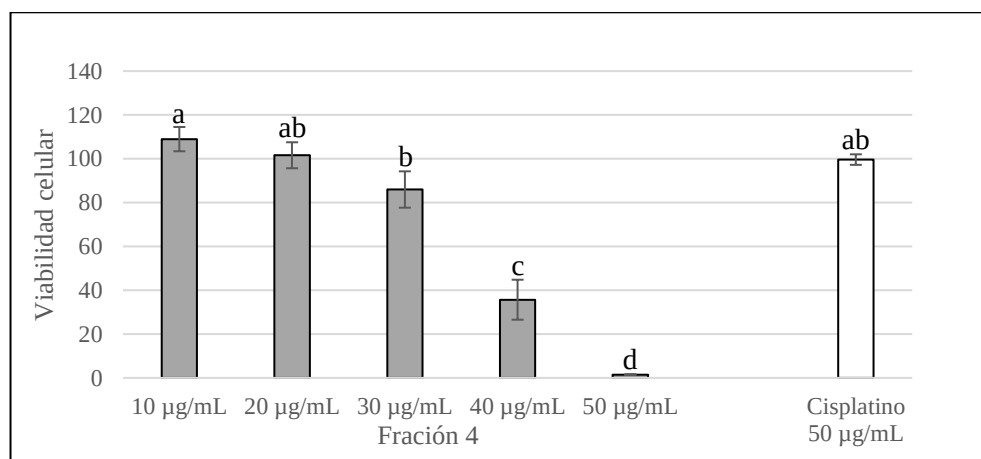


Figura 2. Porcentajes de viabilidad celular por MTT, obtenidos sobre células de cáncer de próstata (22Rv1) utilizando concentraciones de 10 a 50 $\mu\text{g/mL}$ de la fracción 4 de la fase metanólica del extracto clorofórmico del músculo de *L. vannamei*. Los datos son expresados como media $\pm$ ee, resultado de tres ensayos independientes con tres réplicas cada uno. Letras diferentes representan diferencia significativa ($\alpha < 0.05$, prueba t de Student).

Además de lo anterior, utilizando las mismas concentraciones de la fracción cromatográfica 4, también se evaluó el efecto sobre las células de retina ARPE-19 utilizadas como control (**Figura 3**), donde se demuestra que no existe efecto citotóxico de la fracción 4 sobre las células ARPE-19 para concentraciones menores a 50 $\mu\text{g/mL}$, de hecho, la IC_{50} calculada para las células ARPE-19 es de 63.70 ± 3.64 , la cual es casi el doble de la obtenida para las células cancerosas 22Rv1.

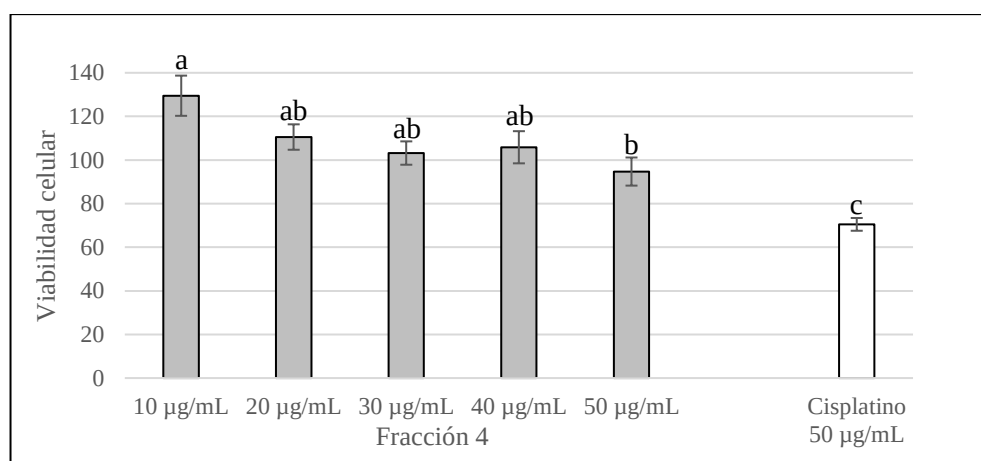


Figura 3. Porcentajes de viabilidad celular por MTT, obtenidos sobre células de epitelio pigmentado de retina (ARPE-19), utilizando concentraciones de 10 a 50 $\mu\text{g/mL}$ de la fracción 4 de la fase metanólica del extracto clorofórmico del músculo de *L. vannamei*. Los datos son expresados como media $\pm$ ee, resultado de tres ensayos independientes con tres réplicas cada uno. Letras diferentes representan diferencia significativa ($\alpha < 0.05$, prueba t de Student).

Uno de los grandes problemas que representa el cáncer es la poca selectividad que tienen muchos de los fármacos que se utilizan para combatirlo, ya que la mayoría también afecta los tejidos no cancerosos y esto se ve reflejado en los efectos secundarios importantes que presentan

los pacientes oncológicos que son tratados con compuestos quimioterapéuticos (American Cancer Society, 2022; Herrstedt *et al.*, 2022). De manera que cuando se estudian compuestos con potencial citotóxico/antiproliferativo *in vitro*, se busca que estos afecten lo mínimamente posible a las células no cancerosas que se utilicen como control.

Como se describió previamente, para obtener las fracciones cromatográficas de la fase metanólica del extracto clorofórmico del músculo de *L. vannamei*, se realizó una cromatografía en columna abierta donde los eluatos se recolectaron por unidad de volumen, estos eluatos fueron monitoreados por TLC y se unieron aquellos que presentaran bandas similares, formando así cada fracción. En el caso de la fracción 4, que fue la más bioactiva, estaba conformada por dos eluatos, por lo que se evaluaron por separado en los ensayos posteriores. Cuando se redujo el volumen de ambos eluatos, estos presentaron ambos una consistencia aceitosa, pero su color era distinto; el eluato 4.1 (por orden de recolección) era de color amarillo brillante, mientras que el eluato 4.2 era de color anaranjado brillante. El eluato 4.1 fue etiquetado como subfracción A y el 4.2 como subfracción B.

La viabilidad celular de las células cancerosas 22Rv1 (**Figura 4**) y las células control no cancerosas ARPE-19 (**Figura 5**) bajo el efecto de las subfracciones A y B fue evaluado utilizando concentraciones entre 12.5 y 100 $\mu\text{g/mL}$.

Para el caso de la línea celular ARPE-19 de epitelio pigmentado de retina, el comportamiento dosis respuesta para ambas subfracciones (A y B) es bastante similar al obtenido para la fracción 4 completa, donde a 100 $\mu\text{g/mL}$ la viabilidad se ve completamente afectada, pero a 50 $\mu\text{g/mL}$ aumenta de manera muy considerable, de tal forma que a 12.5 y 25 $\mu\text{g/mL}$ no se ven afectadas. Tomando en cuenta estos resultados, se calcularon los valores de las IC_{50} sobre células ARPE-19 para las subfracciones A y B, obteniéndose 74.29 y 70.05 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Si bien las IC_{50} obtenidas para ambas subfracciones son similares a la obtenida para la fracción 4 completa, la citotoxicidad disminuyó un poco al separar la fracción en dos subfracciones.

Como ya se ha mencionado anteriormente, al estudiar el potencial citotóxico/antiproliferativo sobre células cancerosas, se busca que los mismos compuestos no ejerzan un efecto sobre las células no cancerosas control, de manera que la disminución de la

afección de las células ARPE-19 por las subfracciones A y B con respecto a la fracción 4 es aparentemente favorable; sin embargo, este fenómeno también se observa sobre las células 22Rv1 de cáncer de próstata. Las células de cáncer de próstata evaluadas siguen siendo altamente afectadas por las subfracciones A y B a 100 $\mu\text{g/mL}$, sin embargo, al utilizar 50 $\mu\text{g/mL}$ de las subfracciones (individualmente) la viabilidad celular aumenta en alrededor de un 60 %, lo cual no sucede para la fracción 4 de la que provienen ambas subfracciones. Si bien la pérdida de la bioactividad sobre 22Rv1 es evidente (**Figura 4**), una vez más se calcularon las IC_{50} para esta línea celular, pero para las subfracciones A y B individualmente, obteniéndose 64.15 $\mu\text{g/mL}$ para la primera y 61.30 $\mu\text{g/mL}$ para la segunda.

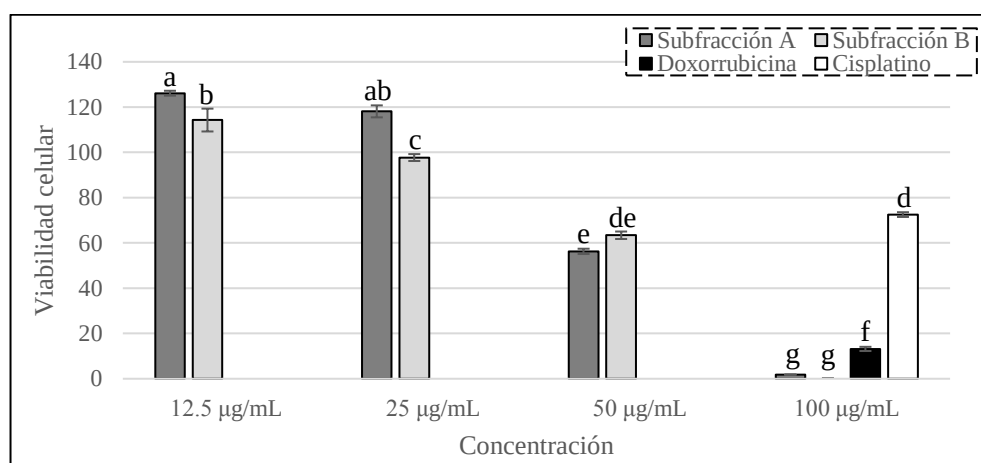


Figura 4. Porcentajes de viabilidad celular por MTT, obtenidos sobre células de cáncer de próstata (22Rv1) utilizando concentraciones de 12.5 a 100 $\mu\text{g/mL}$ de las subfracciones A y B de la fracción 4 de la fase metanólica del extracto clorofórmico del músculo de *L. vannamei*. Los datos son expresados como media $\pm$ ee, resultado de tres ensayos independientes con tres réplicas cada uno. Letras diferentes representan diferencia significativa ($\alpha < 0.05$, prueba t de Student).

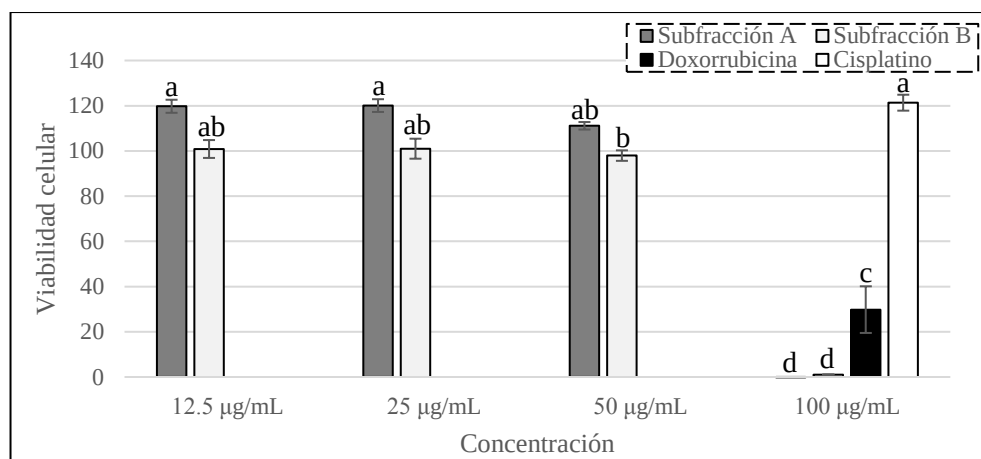


Figura 5. Porcentajes de viabilidad celular por MTT, obtenidos sobre células de epitelio pigmentado de retina (ARPE-19) utilizando concentraciones de 12.5 a 100 µg/mL de las subfracciones A y B de la fracción 4 de la fase metanólica del extracto clorofórmico del músculo de *L. vannamei*. Los datos son expresados como media $\pm$ ee, resultado de tres ensayos independientes con tres réplicas cada uno. Letras diferentes representan diferencia significativa ($\alpha < 0.05$, prueba t de Student).

Los resultados anteriores sugieren que la fracción 4 contiene más de un compuesto responsable de la bioactividad, con un posible efecto sinérgico o aditivo entre los mismos, de manera que al separarse en las subfracciones A y B este efecto se ve disminuido y por lo tanto también la bioactividad que se presentó en la fracción 4 completa.

Si bien no es posible asegurar que la fracción A y la fracción B contienen cada uno de los compuestos que participan en conjunto, por el contrario, es mayormente probable que ambas aún los contengan, pero en proporciones diferentes de manera que el efecto en conjunto no se lleva a cabo. Esto representa un hallazgo importante que debe ser investigado a mayor profundidad. En farmacología y toxicología, el efecto aditivo equivale a la suma del efecto que ejercen dos o más compuestos por separado al combinarse; por otro lado, el efecto sinérgico se observa cuando dos o más sustancias que tienen efecto por si solas, al combinarse ejercen un efecto mayor importante, mayor que el aditivo (Tekin *et al.*, 2016); el efecto sinérgico es un efecto altamente buscado en el desarrollo de nuevos fármacos; la combinación de varios fármacos ha demostrado ser altamente eficaz y terapéuticamente más efectiva (Yin *et al.*, 2014).

5.3. Caracterización químico-estructural

Con la finalidad de determinar las estructuras químicas involucradas en la reducción de la viabilidad celular de las líneas analizadas, se procedió a hacer el análisis espectrofotométrico de las subfracciones. A partir de las técnicas de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se obtuvieron los espectros de las subfracciones A y B obtenidas de la fracción cromatográfica 4 que resultó con mayor actividad citotóxica sobre células 22Rv1 de cáncer de próstata.

Para lograr identificar los compuestos presentes en las subfracciones A y B, primeramente, se analizaron los espectros de ^1H -RMN obtenidos para ambas subfracciones (**Figura 6**). En esta técnica los espectros que se obtienen proporcionan información sobre los distintos tipos de hidrógenos que se encuentran presentes en una muestra, o en una molécula cuando se analiza un compuesto puro (Pavia *et al.*, 2009; Wade, 2013). Para este caso, en ambas subfracciones se tienen al menos 25 tipos de señales distintas, esto significa que existen al menos 25 tipos distintos de hidrógenos en las muestras. Por otra parte, los mismos desplazamientos químicos se pueden observar en ambos espectros, lo que sugiere que ambas subfracciones podrían contener los mismos compuestos sólo que en diferente proporción, esto tomando en cuenta que ambas conforman la totalidad de la fracción 4 y que la única diferencia física entre la subfracción A y la subfracción B es el color.

Para el caso de ^1H -RMN, la integral de una señal es proporcional al número de protones que forman esa señal, es decir, permite conocer cuántos hidrógenos idénticos hay en la molécula que se analiza (Pavia *et al.*, 2009), sin embargo, en el caso del presente estudio, las subfracciones A y B están conformadas por mezclas de compuestos, por lo que esta propiedad del espectro se enmascara por las distintas señales y la proporción se pierde.

aquellos protones que se encuentran unidos a un carbono adyacente a un carbono que forma un doble enlace con otro carbono (Wade, 2013). Los AGPI también contienen protones alílicos que generan señal en este intervalo, sin embargo, es generada sólo por dos hidrógenos que además se encuentran apantallados por el grupo carboxílico cercano, por lo que deja de ser una señal representativa. En los espectros obtenidos a partir de las subfracciones A y B no se logra observar la señal mencionada, por lo que es posible descartar la presencia de AGMI; aunque, si bien los AGPI también la generan mínimamente, al analizarse una mezcla y no un compuesto puro, se vuelve imposible su visualización. Siguiendo en campo alto, se encuentra una señal entre 2.7 y 2.9 ppm, la cual indica la presencia de protones bis-alílicos, que son aquellos unidos a un carbono adyacente a dos carbonos que forman un doble enlace cada uno (Tyl *et al.*, 2008; López-Saiz *et al.*, 2014), esto sugiere la presencia de al menos una molécula que en su estructura contiene una cadena hidrocarbonada con múltiples dobles enlaces como la que contienen los AGPI.

Las señales presentes entre 3.2 y 3.8 ppm en los espectros de las subfracciones A y B pueden ser generadas por la presencia de protones que se encuentran unidos a carbonos que también forman un enlace sencillo con oxígeno, ya sea en un grupo éter o en un alcohol; sin embargo, la exactitud del desplazamiento químico para estos grupos funcionales depende de ambiente químico que rodea a los protones (Pavia *et al.*, 2009; Wade, 2013). Por otra parte, hacia campo bajo, para ambas subfracciones encontramos señales entre 4.1 y 4.5 ppm, las cuales coinciden con aquellas generadas por los protones unidos a carbonos que se encuentran unidos al grupo funcional éster, pero esta vez por el extremo del oxígeno y no del carbono (Pavia *et al.*, 2009; López-Saiz *et al.*, 2014). Tomando en cuenta que existen distintas señales en los espectros de las subfracciones A y B que sugieren la presencia de AGPI, y dos tipos de señales distintas que proponen la presencia de uno o varios grupos éster en las muestras analizadas, es posible, que dichos AGPI se encuentren esterificados con un glicerol, o al menos una proporción de éstos. De hecho, de acuerdo con los autores citados, señales más específicas entre 4.1-4.35 ppm sugieren protones de un glicerol esterificado.

De acuerdo con Alexandri *et al.* (2017), en los espectros ^1H -RMN existe una región definida entre 5.2 - 6.4 ppm para los protones que se encuentran unidos a un carbono formador de un doble enlace con otro carbono, es decir los protones olefínicos, sin embargo, es posible

encontrar este tipo de protones de dobles enlaces aislados y de dobles enlaces conjugados. De manera que es posible identificar la presencia de protones olefínicos tanto en la subfracción A como en la subfracción B, con mayor probabilidad de pertenecer a dobles enlaces no conjugados como los que se encuentran en los ácidos grasos, sin embargo, hasta este punto no es posible descartar la posible presencia de protones olefínicos de dobles enlaces conjugados, como los que presentan los carotenoides.

Si bien los espectros evidencian la presencias de AGPI, esto de acuerdo con la mayoría de las señales obtenidas a partir de ^1H -RMN para ambas subfracciones, en campo bajo se encuentran dos señales en el área de los compuestos aromáticos, específicamente entre 7.5 y 7.75 ppm, las cuales posiblemente corresponden a la presencia de un compuesto del tipo ftalato en ambas subfracciones, ya que el compuesto DOP contiene en su estructura química un anillo aromático, así como dos grupos éster, lo que también concuerda con algunas señales de los espectros; además de esto, la presencia del DOP ya ha sido reportado en la fase lipídica del músculo de los camarones *Litopenaeus stylirostris* y *L. vannamei* (López-Saiz *et al.*, 2014; García-Romo *et al.*, 2020), como se mencionó anteriormente.

A partir del análisis por ^{13}C -RMN, también se obtuvo un espectro para la subfracción A y otro para la subfracción B, para ambos casos se agruparon cuatro tipos de señales (**Figura 7**). Los espectros de ^{13}C -RMN proporcionan información de los distintos tipos de carbonos que pueden encontrarse en una molécula y comúnmente se utiliza en conjunto con la técnica de ^1H -RMN para determinar la estructura de un compuesto desconocido. Hacia campo alto se encuentra primeramente un grupo de señales entre 10 y 40 ppm, este intervalo se encuentra dentro del establecido para los grupos metilo ($\text{R}-\text{CH}_3$), metileno (R_2-CH_2), y/o metino (R_3-CH). Hacia campo medio es posible observar una señal entre 75 y 80 ppm, que es generada por aquellos carbonos que se encuentran unidos directamente al oxígeno por medio de un enlace simple. Más hacia campo bajo 120 - 130 ppm, se observan desplazamientos en el área de los anillos aromáticos, lo cual sustenta la existencia del compuesto DOP ya mencionado anteriormente, tanto en la subfracción A como en la subfracción B. Y finalmente en campo bajo, se puede visualizar una última señal alrededor de las 180 ppm, que se genera por átomos de carbono que forman parte de un grupo funcional carbonílico ($\text{C}=\text{O}$), probablemente de un ácido

carboxílico o a un éster, ya que el área establecida para éstos es entre 155 y 185 ppm, y para los grupos aldehídos y cetonas es 185 - 220 ppm (Pavia *et al.*, 2009).

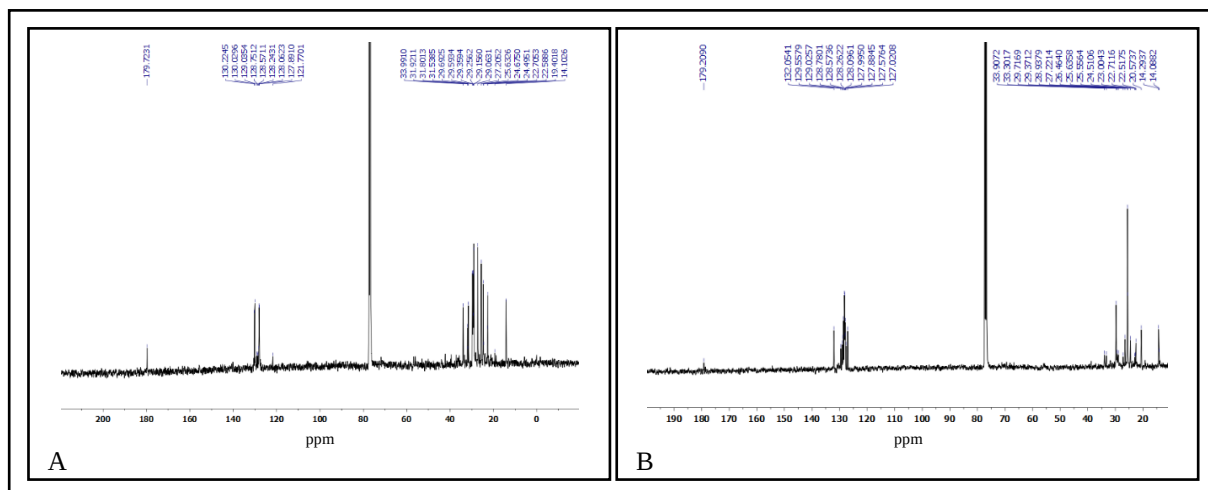


Figura 7. Espectros ^{13}C -RMN de las subfracciones A y B obtenidas a partir de la fracción 4 de la fase metanólica del extracto clorofórmico del músculo de *L. vannamei*.

Tomando en cuenta que las subfracciones A y B contienen compuestos de naturaleza lipídica, los resultados de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN sugieren la presencia de AGPI posiblemente esterificados a un glicerol y del compuesto DOP. Si bien se puede excluir la presencia de AGMI y DHA, aún no se puede descartar la presencia de compuestos carotenoides.

De acuerdo con los posibles compuestos presentes en las subfracciones A y B, también se obtuvieron los espectros ^1H -RMN de muestras estandarizadas de DOP y EPA, así como de los carotenoides β -caroteno y astaxantina, y fueron comparados con los espectros ^1H -RMN de las subfracciones A y B como se muestra en la **Figura 8**. Lo que permitió confirmar la presencia

de DOP y EPA; además de esto, es posible asegurar que las muestras analizadas también contienen carotenoides, más específicamente astaxantina. Si bien estos resultados no descartan la presencia de otros carotenoides, con respecto al β -caroteno, es posible asegurar que no se encuentra presente en ninguna de las dos subfracciones.

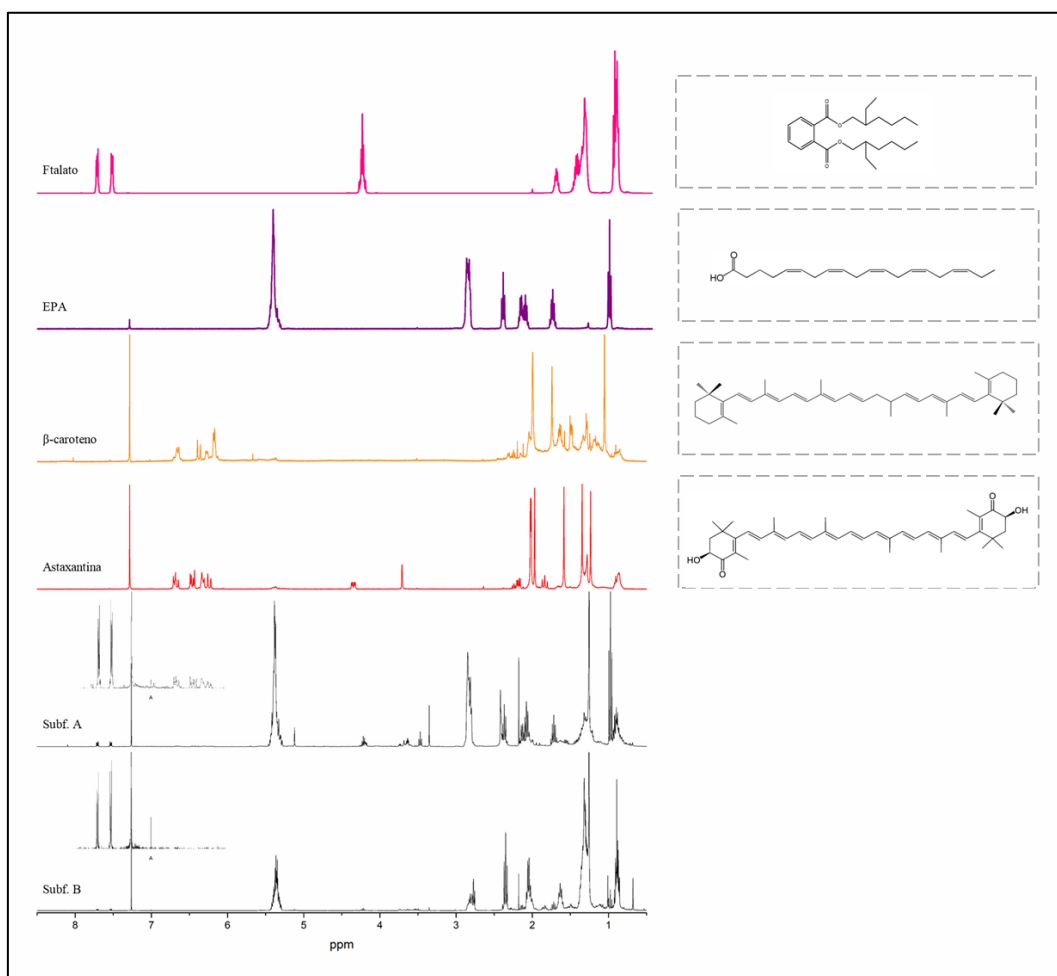


Figura 8. Comparación de espectros ^1H -RMN de las subfracciones A y B obtenidas a partir de la fracción 4 de la fase metanólica del extracto clorofórmico del músculo de *L. vannamei*, con espectros ^1H -RMN obtenidos a partir de β -caroteno, astaxantina, DOP y EPA.

5.4. Arresto celular por citometría de flujo

Como se ha mencionado anteriormente, todas las células eucariotas se multiplican mediante división celular. Para que una célula pueda dividirse y generar dos células hijas pasa por un complejo proceso conocido como ciclo celular, el cual consta de cuatro fases secuenciales: fase G₁, fase S, fase G₂ y fase M, durante este proceso la célula crece y se prepara para la multiplicación (Bhoora y Punchoo, 2020). Muchos de los compuestos de origen natural que han demostrado disminuir o inhibir la viabilidad y/o la proliferación de células cancerosas, así como afectar la progresión del ciclo celular de éstas, han sido considerados como posibles candidatos a convertirse en fármacos o adyuvantes anticancerígenos (Bailón-Moscoso *et al.*, 2017).

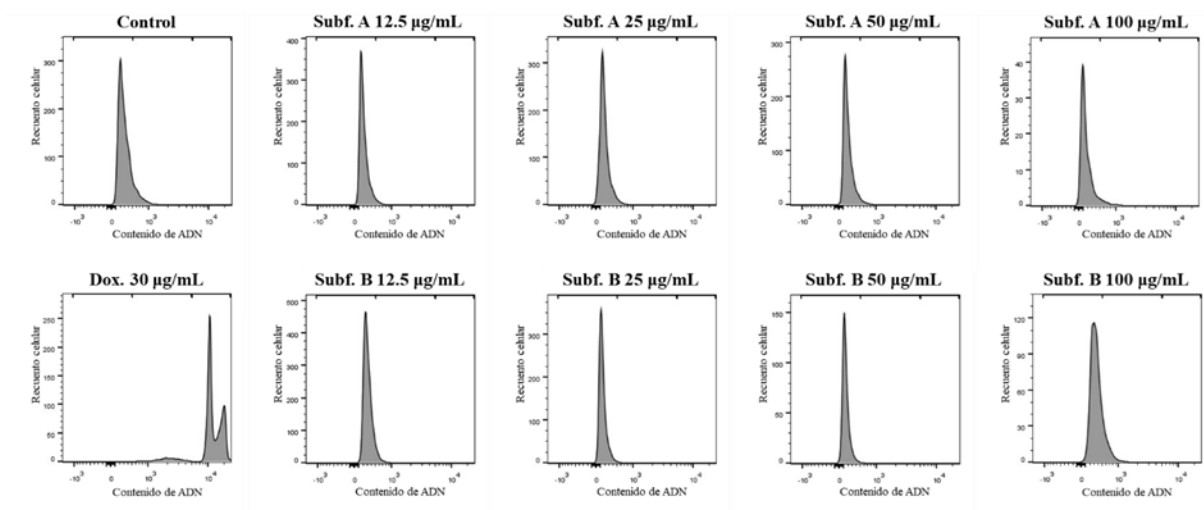
Durante la proliferación celular, la progresión a través del ciclo depende de una gran cantidad de puntos de control que funcionan como semáforos entre las fases celulares (Bhoora y Punchoo, 2020), sin embargo, muchos de éstos se ven alterados en las células cancerosas, permitiendo la multiplicación descontrolada (Hanahan y Weinberg, 2011). Determinar si un compuesto citotóxico tiene la capacidad de provocar el arresto celular, así como la fase en la que sucede, forma parte fundamental del entendimiento de un mecanismo de acción antiproliferativo; ya que, si un compuesto tiene la capacidad de provocar la detención del ciclo en células cancerosas, esto significa que intervine en la cascada de señalización que regula esa fase del ciclo donde las células se ven arrestadas.

Para la presente investigación, se determinó el tipo de arresto celular que provocan las subfracciones A y B obtenidas de la fracción cromatográfica 4 de la fase metanólica del extracto clorofórmico de *L. vannamei*, por medio de una tinción con PI. Debido a que el PI tiene la capacidad de intercalarse en el ADN, puede utilizarse para separar las células en tres etapas del ciclo celular: fase G₀/G₁, fase S y fase G₂/M, debido a que cada una de éstas, respecto a la anterior, contiene una mayor cantidad de ADN, que conlleva a una cantidad mayor de moléculas de PI intercaladas y por lo tanto una mayor intensidad de fluorescencia (Alberts *et al.*, 2015; Hire *et al.*, 2017). El recuento de estas células por citometría de flujo permite conocer cuantas células se encuentran en cada una de las fases.

El tipo de arresto celular que provocan las subfracciones A y B sobre células de cáncer de próstata 22Rv1 fue determinado a concentraciones de 12.5, 25, 50 y 100 µg/mL de cada una

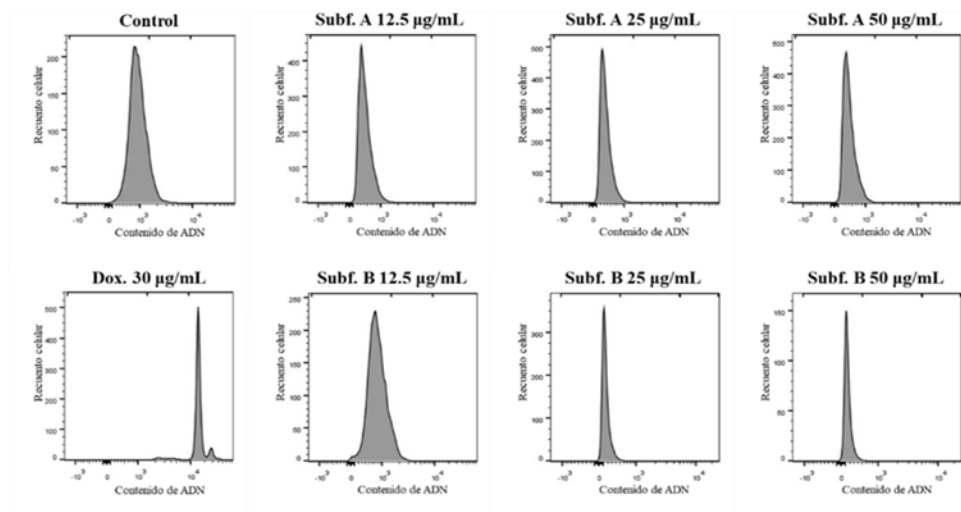
(**Figura 9**). Los histogramas obtenidos a partir de este experimento parecieran no mostrar un efecto importante por ambas subfracciones, sin embargo, los valores numéricos de los porcentajes ponen en evidencia que tanto la subfracción A como la B ejercen una acumulación de casi el 100 % de las células en la etapa G₀/G₁ para todas las concentraciones evaluadas, efecto estadísticamente significativo comparado al control no estimulado que presenta un menor porcentaje en esta misma etapa, y uno mayor para la etapa S. Como control positivo fue utilizado el fármaco quimioterapéutico doxorubicina, el cual es un compuesto proapoptótico y que por el contrario de las subfracciones evaluadas, demostró provocar el arresto celular en células 22Rv1 en la etapa G₂/M.

Si bien el arresto celular sobre las células cancerosas demostrado es un panorama positivo, un comportamiento similar se observó para la línea celular no cancerosa ARPE-19 (**Figura 10**), donde nuevamente las células fueron arrestadas en la etapa G₀/G₁ por los compuestos presentes en las subfracciones A y B evaluadas, incluso demostrando un efecto estadísticamente significativo para las concentraciones de 12.5, 25 y 50 µg/mL respecto al control no estimulado. Por otra parte, utilizando 100 µg/mL de las subfracciones por separado, no fue posible realizar la lectura de las células estimuladas, lo que significa que, a altas concentraciones, los compuestos presentes en las subfracciones A y B son altamente citotóxicos para las células no cancerosas ARPE-19, lo cual concuerda con el 0 % de viabilidad celular obtenido por MTT al utilizar esta misma concentración. Con respecto al control positivo doxorubicina, una vez más, éste provocó el arresto celular en G₂/M utilizando una concentración de 30 µg/mL.



Condición		Porcentaje de células por fase del ciclo celular		
Tratamiento	Concentración	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control negativo		88.64 ± 1.04 ^c	10.59 ± 0.99 ^{ab}	0.06 ± 0.04 ^b
Fracción 1	100	95.04 ± 1.15 ^{ab}	4.77 ± 1.11 ^{cd}	0.26 ± 0.08 ^b
	50	97.07 ± 0.49 ^a	2.69 ± 0.46 ^d	0.16 ± 0.12 ^b
	25	95.53 ± 1.00 ^{ab}	4.00 ± 0.78 ^{cd}	0.13 ± 0.07 ^b
	12.5	93.97 ± 1.08 ^{ab}	5.72 ± 0.97 ^{bcd}	0.07 ± 0.05 ^b
Fracción 2	100	92.45 ± 2.55 ^b	9.17 ± 3.46 ^{abc}	0.05 ± 0.03 ^b
	50	97.18 ± 1.20 ^a	2.65 ± 1.12 ^d	0.02 ± 0.01 ^b
	25	96.10 ± 1.94 ^{ab}	3.55 ± 1.79 ^d	0.06 ± 0.06 ^b
	12.5	95.70 ± 0.57 ^{ab}	4.08 ± 0.55 ^{cd}	0.02 ± 0.01 ^b
Doxorrubicina	30	4.09 ± 0.81 ^d	11.20 ± 3.77 ^a	86.63 ± 4.31 ^a

Figura 9. Arresto celular por citometría de flujo sobre células de cáncer de próstata (22Rv1) utilizando concentraciones de 12.5 a 100 µg/mL de las subfracciones A y B de la fracción 4 de la fase metanólica del extracto clorofórmico del músculo de *L. vannamei*. Los datos son expresados como media ± ee, resultado de tres ensayos independientes con tres réplicas cada uno. En una misma columna, letras diferentes representan diferencia significativa ($\alpha < 0.05$, prueba t de Student).



Condición		Porcentaje de células por fase del ciclo celular		
Tratamiento	Concentración	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control negativo		76.69 ± 3.38 ^b	22.15 ± 3.26 ^a	0.06 ± 0.01 ^b
Fracción 1	100	-	-	-
	50	97.21 ± 1.07 ^a	2.16 ± 0.79 ^b	0.12 ± 0.06 ^b
	25	97.88 ± 0.93 ^a	1.91 ± 0.85 ^b	0.08 ± 0.03 ^b
	12.5	98.32 ± 0.71 ^a	2.28 ± 0.83 ^b	0.18 ± 0.07 ^b
Fracción 2	100	-	-	-
	50	96.22 ± 1.29 ^a	3.89 ± 1.45 ^b	0.09 ± 0.04 ^b
	25	96.93 ± 0.90 ^a	3.07 ± 0.86 ^b	0.11 ± 0.04 ^b
	12.5	94.84 ± 1.54 ^a	5.05 ± 1.50 ^b	0.15 ± 0.10 ^b
Doxorrubicina	30	0.70 ± 0.20 ^c	3.84 ± 0.66 ^b	95.46 ± 0.85 ^a

Figura 10. Arresto celular por citometría de flujo sobre células de epitelio pigmentado de retina (ARPE-19) utilizando concentraciones de 12.5 a 100 µg/mL de las subfracciones A y B de la fracción 4 de la fase metanólica del extracto clorofórmico del músculo de *L. vannamei*. Los datos son expresados como media ± ee, resultado de tres ensayos independientes con tres réplicas cada uno. En una misma columna, letras diferentes representan diferencia significativa ($\alpha < 0.05$, prueba t de Student).

5.5. Astaxantina y cáncer de próstata.

La astaxantina es una xantofila de origen natural que ya ha logrado ser químicamente sintetizada, ésta es un carotenoide no provitamina A (Stachowiak y Szulc, 2021). La astaxantina (3, 3'-dihidroxi- β , β' -caroteno-4, 4'-diona) es un compuesto de color rojo que en su estructura contiene dos grupos ceto en cada estructura de anillo (National Center for Biotechnology Information, 2022), a los cuales se atribuyen la mayoría de las distintas bioactividades que se han reportado para este compuesto. Esta molécula se ha logrado extraer a partir de diversos organismos, principalmente marinos, como por ejemplo fitoplancton, algas y microalgas, salmón, algunos crustáceos entre ellos el camarón, entre otros (Shao *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2020). Existen una gran cantidad de estudios alrededor de la astaxantina, para la cual se han reportado bioactividades como la inmunomoduladora, la antiinflamatoria, anticancerígena, hepato y neuroprotectora, entre otras (Fakhri *et al.*, 2018), sin embargo, su potencial antioxidante es una de las más importantes.

La astaxantina es conocida como un súper antioxidante, ya que su actividad contra especies reactivas de oxígeno (ROS) es 75 veces mayor que la del ácido α -lipoico, 550 veces mayor que la de la vitamina E, e incluso 800 veces mayor que la ejercida por la coenzima Q10 (Shao *et al.*, 2016). Además de esto, este carotenoide no se ha reportado como perjudicial para la salud, así como tampoco ha presentados efectos secundarios adversos (Ambati *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2020). En lo que respecta a la astaxantina como un compuesto citotóxico/antiproliferativo, se ha reportado ampliamente su actividad anticancerígena sobre células y/o xenoinjertos de cáncer de mama, colon, próstata, cérvix, hígado, esófago, neuroblastoma, entre otros; incluso existen reportes de que lograr prevenir la migración y la invasión de células malignas (Paloza *et al.*, 2009; Nagendraprabhu y Sudhandiran, 2011; Ambati *et al.*, 2014; Shao *et al.*, 2016; Šimat *et al.*, 2022).

De acuerdo con Ni *et al.* (2017), al utilizar astaxantina sobre xenoinjertos de células PC-3 de cáncer de próstata en ratones a una concentración de 100 $\mu\text{g/g}$, fue posible inhibir el crecimiento tumoral de forma significativa, obteniendo una tasa de inhibición cercana al 50%. Además, también se observó una disminución en la proteína Ki67, la cual alcanza niveles máximos de expresión durante la mitosis y se encuentra ausente en las células estacionadas o que no se encuentran en replicación (Panal *et al.*, 2014), así como del antígeno nuclear de

proliferación celular (PCNA). También se obtuvo un aumento significativo en los niveles de los supresores de tumores miR-375 y miR-487b en los tejidos tumorales, así como en la expresión de la caspasa-3 (caspasa ejecutora), que actúa al final de la cascada apoptótica intrínseca (Ponder y Boise, 2019), todo esto acompañado de un aumento en el total de células apoptóticas.

Por otra parte, Sun *et al.* (2020), demostraron que la astaxantina tiene la capacidad de inhibir la proliferación como la clonación de células de cáncer de próstata humano DU145, de manera muy eficaz, además de reducir su capacidad metastásica. De acuerdo con los autores, entre las proteínas que se han reportado como blanco de la acción de la astaxantina encontramos STAT3, NF- κ B, PI3K/AKT, MAPK, PPAR γ , entre otras, las cuales intervienen en la regulación/modulación de vías de señalización relacionadas a la supervivencia celular, como el crecimiento, la progresión a través del ciclo, la división celular, la expresión génica, así como la apoptosis (Fresno *et al.*, 2003; Youssef y Badr, 2011; Xia *et al.*, 2014; Braicu *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019). Además, también se ha reportado la acción de la astaxantina sobre células LNCap-FGC de cáncer de próstata (Anderson, 2005), donde se demostró que al utilizar este compuesto se observaba una disminución en la proliferación de las células *in vitro*, además de una inhibición casi completa de la enzima 5 α -reductasa, la cual participa en la producción de dihidrotestosterona, necesaria para el crecimiento celular prostático; inhibidores la enzima 5 α -reductasa ya han sido considerados como tratamiento preventivo de cáncer de próstata (Chau y Figg, 2018).

5.6. Ácido eicosapentaenoico y cáncer de próstata.

El ácido eicosapentaenoico o EPA es uno de los AGPI ω -3 más importantes, junto al DHA, ya que como el ser humano no tiene la capacidad de sintetizarlos de *novo*, y como ya se ha mencionado, son considerados ácidos grasos esenciales. Esto pasa porque las células de los mamíferos no tienen la enzima convertidora ω -3 desaturasa, la cual transforma los ácidos grasos ω -6 en ω -3 en otros organismos, principalmente marinos (Simopoulos, 2002). Químicamente, el EPA se designa como 20:5, n-3, lo cual indica que es un ácido graso que en su estructura contiene una cadena hidrocarbonada de 20 carbonos con 5 dobles enlaces, donde el primer doble enlace se encuentra ubicado en el tercer átomo de carbono desde el extremo distal de la cola del ácido graso (extremo contrario al que contiene el grupo carboxílico) (Brinton y Mason, 2017).

Referente a los AGPI ω -3, existen una gran cantidad de estudios relacionados a enfermedades humanas, incluso relacionados sólo al cáncer. Éstos han demostrado ejercer su actividad anticancerígena sobre distintos tipos de cáncer y a partir de diferentes mecanismos de acción. Los AGPI, entre éstos el EPA, han logrado afectar el crecimiento de células de cáncer de mama, páncreas, próstata, colon, carcinomas orales, neuroblastomas, mielomas, y demás (Nikolakopoulou *et al.*, 2013; So *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2017; Serini y Calviello, 2017; Shen *et al.*, 2018; Freitas y Campos, 2019; Giordano *et al.*, 2020; Tousignant *et al.*, 2020; Chiu *et al.*, 2021).

Con respecto al EPA y su acción sobre el cáncer de próstata, se ha demostrado que este ácido graso tiene la capacidad de afectar la proliferación a 100 μ g/mL, observándose un efecto dosis respuesta en la línea celular cancerosa P-C3, así como una disminución en la invasión y migración de estas células a 25 μ g/mL (Oono *et al.*, 2017). Utilizando esta misma línea celular, se reportó que ácidos grasos ω -3 tienen la capacidad de inducir la apoptosis, aunque el EPA en menor grado que el DHA; así mismo, individualmente lograron disminuir la expresión de la ciclina A2, disminuyendo los niveles del ARNm utilizando concentraciones de 100 μ M; además, a esta misma concentración, también fue posible observar un aumento en la expresión de la proteína p21 (Eser *et al.*, 2013). La ciclina A2 activa quinasas involucradas en la regulación de la fase S y el inicio de la mitosis, participando así en el control de la división celular, de manera que se utiliza como un marcador de la proliferación celular (Loukil *et al.*, 2015). La proteína p21 se encuentra disminuida en una gran cantidad de neoplasias, por lo que también es conocida como una oncoproteína, ésta funciona como un inhibidor de la progresión del ciclo celular en células normales, de manera que es reportado como un efector antiproliferativo (Ierardi *et al.*, 2001; Shamloo y Usluer, 2019).

Por otra parte, se ha reportado que utilizando concentraciones de 20 μ M, EPA logra disminuir la señalización en la vía Akt/mTOR en células de adenocarcinoma de próstata LNCaP, disminuyendo la actividad de la proteína Akt1 y de los niveles de la proteína ribosomal fosfo-S6 (Roudsari *et al.*, 2021). La cascada de señalización de la vía Akt/mTOR da como resultado el inicio del proceso de transcripción que dirige a la síntesis de las proteínas quinasas necesarias para la transición de fase G₁ a la fase S (Iwenofu *et al.*, 2008). Por lo que esta última vía de señalización es una de las posiblemente afectadas en la línea celular cancerosa 22Rv1 analizada

en el presente estudio, porque como ya se mencionó anteriormente, se logró observar el arresto celular en la fase G_0/G_1 .

También se ha reportado que en las células DU125 de cáncer de próstata humano estimuladas con EPA, se suprime la fosforilación que activa las proteínas ERK, FAK y p70S6K, involucradas en la activación y progresión del ciclo celular (Liu *et al.*, 2014). La cascada de señalización ERK participa en la transducción de señales intracelulares en respuesta a estímulos extracelulares, entre éstos, algunos factores de crecimiento, hormonas y neurotransmisores (Lu *et al.*, 2020). En algunos tumores, la proteína FAK (Focal Adhesion Kinase) estimula la motilidad, la supervivencia y proliferación celular regulando la señalización celular dentro del microambiente tumoral (Sulzmaier, 2014). Y la proteína p70S6k (serina/treonina quinasa) se activa por la estimulación de señales mitógenas, interviniendo en la progresión a través de ciclo celular de la fase G_0/G_1 a la fase S (Kwon *et al.*, 2002). En el estudio de Liu *et al.* (2014), mencionado anteriormente, las células tratadas con EPA que sólo recibieron medio de cultivo sin SFB, no presentaron cambios importantes, lo que confirma la intervención del EPA en la cascada de señalización de estímulos proliferativos externos, como lo es el factor de crecimiento presente en el SFB que se utiliza en el cultivo de células.

VI. CONCLUSIONES

La fracción del músculo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* reportada con mayor actividad citotóxica, tiene la capacidad de afectar la viabilidad de células de carcinoma de próstata humano sin afectar a células no cancerosas de epitelio pigmentado de retina.

Dicha fracción, está conformada por los compuestos lipídicos ftalato de dioctilo, ácido eicosapentaenoico esterificado a glicerol y astaxantina, atribuyéndose su capacidad citotóxica sobre células de cáncer de próstata a los últimos dos.

La fracción reportada con mayor actividad fue capaz de provocar el arresto celular en la fase G₀/G₁ en células de carcinoma de próstata humano.

VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda evaluar la acción sinérgica que puede existir entre el triglicérido con ácido eicosapentaenoico esterificado y el carotenoide astaxantina, con respecto a su acción citotóxica sobre líneas de cáncer de próstata humano, determinando si éstas en conjunto, afectan a moléculas involucradas en las vías de señalización que regulan la progresión a través del ciclo celular, específicamente durante la transición de la fase G_0/G_1 a la fase S.

Evaluar en conjunto con el arresto celular por citometría de flujo el tipo de muerte celular que ejerce la fracción reportada con mayor bioactividad sobre las células de cáncer de próstata 22Rv1, utilizando la doble tinción PI – Anexina-V.

VIII. LITERATURA CITADA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. 2015. *Molecular Biology of the Cell*. Sixth edition. New York, USA: Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Alexandri, E., Ahmed, R., Siddiqui, H., Choudhary, M. I., Tsiafoulis, C. G. y Gerothanassis, I. P. 2017. High Resolution NMR Spectroscopy as a Structural and Analytical Tool for Unsaturated Lipids in Solution. *Molecules* 22(10):1663. doi:10.3390/molecules22101663.
- Alonso-Castro, A., M. Villarreal, L. Salazar-Olivo, M. Gomez-Sánchez, F. Dominguez y A. Garcia-Carranca. 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology* 133:945-972. doi:10.1016/j.jep.2010.11.055.
- Ambati, R. R., Phang, S. M., Ravi, S. y Aswathanarayana, R. G. 2014. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications, a review. *Mar Drugs* 7;12(1):128-52. doi: 10.3390/md12010128.
- American Cancer Society, Inc. 2022. Treatments and Side Effects. Disponible en: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects.html>.
- Anderson, M. L. 2005. A Preliminary Investigation of the Enzymatic Inhibition of 5 α -Reductase and Growth of Prostatic Carcinoma Cell Line LNCap-FGC by Natural Astaxanthin and Saw Palmetto Lipid Extract In Vitro. *Journal of Herbal Pharmacotherapy* 5(1),17-26. doi:10.1080/j157v05n01_03.
- ATCC Human Cell Lines. 2022. 22Rv1 (ATCC® CRL-2505™). Disponible en: <https://www.atcc.org/products/crl-2505>.
- ATCC Human Cell Lines. 2022. ARPE-19 (ATCC® CRL-2302™). Disponible en: <https://www.atcc.org/products/crl-2302>.
- ATCC Human Cell Lines. 2022. HeLa (ATCC® CRM-CCL-2™). Disponible en: <https://www.atcc.org/products/crm-ccl-2>.
- ATCC Human Cell Lines. 2022. MDA-MB-231 (ATCC® CRM-HTB-26™). Disponible en: <https://www.atcc.org/products/crm-htb-26>.
- Ayas, D., Ozogul, Y. y Yazgan, H. 2013. The effects of season on fat and fatty acids contents of shrimp and prawn species. *European Journal of Lipid Science and Technology* 115(3):356-362. doi:10.1002/ejlt.201200081.

- Bailón-Moscoso, N., Cevallos-Solorzano, G., Romero-Benavides, J. C. y Orellana, M. I. 2017. Natural Compounds as Modulators of Cell Cycle Arrest: Application for Anticancer Chemotherapies. *Current genomics* 18(2):106-131. doi:10.2174/1389202917666160808125645.
- Bhoora, S. y Punchoo, R. 2020. Policing Cancer: Vitamin D Arrests the Cell Cycle. *International journal of molecular sciences*, 21(23):9296. doi:10.3390/ijms21239296.
- Braicu, C., Buse, M., Busuioc, C., Drula, R., Gulei, D., Raduly, L., Rusu, A., Irimie, A., Atanasov, A. G., Slaby, O., Ionescu, C. y Berindan-Neagoe, I. 2019. A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *Cancers (Basel)* 11(10):1618. doi:10.3390/cancers11101618.
- Brinton, E. A. y Mason, R. P. 2017. Prescription omega-3 fatty acid products containing highly purified eicosapentaenoic acid (EPA). *Lipids Health Dis* 31;16(1):23. doi:10.1186/s12944-017-0415-8.
- Carminati, L., Pinessi, D., Borsotti, P., Minoli, L., Giavazzi, R., D'Incalci, M., Belotti, D. y Taraboletti, G. 2018. Antimetastatic and antiangiogenic activity of trabectedin in cutaneous melanoma. *Carcinogenesis* doi:10.1093/carcin/bgy177.
- Chang, M. X. y Xiong, F. 2020. Astaxanthin and its Effects in Inflammatory Responses and Inflammation-Associated Diseases: Recent Advances and Future Directions. *Molecules* 25(22):5342. doi:10.3390/molecules25225342.
- Chau, C. H. y Figg, W. D. 2018. Revisiting 5 α -reductase inhibitors and the risk of prostate cancer. *Nature Reviews Urology* 15(7), 400-401. doi:10.1038/s41585-018-0018-9.
- Chen, R., Herrera, A. F., Hou, J., Chen, L., Wu, J., Guo, Y., Synold, T. W., Ngo, V. N., Puverel, S., Mei, M., Popplewell, L., Yi, S., Song, J. Y., Tao, S., Wu, X., Chan, W., Forman, S. J., Kwak, L. W., Rosen, S. T. y Newman, E. M. 2019. Inhibition of MDR1 overcomes resistance to brentuximab vedotin in Hodgkin lymphoma. *Clinical Cancer Research clincanres* 1768.2019. doi:10.1158/1078-0432.ccr-19-1768.
- Chiu, C. F., Hsu, M. I., Yeh, H. Y., Park, J. M., Shen, Y. S., Tung, T. H., Huang, J. J., Wu, H. T. y Huang, S. Y. 2021. Eicosapentaenoic Acid Inhibits KRAS Mutant Pancreatic Cancer Cell Growth by Suppressing Hepassocin Expression and STAT3 Phosphorylation. *Biomolecules* 11(3):370. doi:10.3390/biom11030370.
- Cholewski, M., Tomczykowa, M. y Tomczyk, M. 2018. A Comprehensive Review of Chemistry, Sources and Bioavailability of Omega-3 Fatty Acids. *Nutrients* 10(11):1662. doi:10.3390/nu10111662.

- Choudhary, A., Naughton, L., Montánchez, I., Dobson, A. y Rai, D. (2017). Current Status and Future Prospects of Marine Natural Products (MNPs) as Antimicrobials. *Marine Drugs* 15(9):272. doi:10.3390/md15090272.
- Colditz, G., DeJong, W., Hunter, D., Trichopoulos, D. y Willett, W. 1996. Cancer Causes & Control. Harvard Report on Cancer Prevention 7(S1):S3–S4. doi:10.1007/bf02352719.
- Coller, H. A. 2019. Regulation of Cell Cycle Entry and Exit: A Single Cell Perspective. *Comprehensive Physiology* 317-344. doi:10.1002/cphy.c190014.
- Cragg, G. M. y Pezzuto, J. M. 2015. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. *Medical Principles and Practice* 25(2):41–59. doi:10.1159/000443404.
- Di Francia, R., Crisci, S., De Monaco, A., Cafiero, C., Re, A., Iaccarino, G., De, Filippi. R., Frigeri, F., Corazzelli, G., Micera A. y Pinto, A. 2021. Response and Toxicity to Cytarabine Therapy in Leukemia and Lymphoma: From Dose Puzzle to Pharmacogenomic Biomarkers. *Cancers* 13(5):966. doi:10.3390/cancers13050966.
- Eser, P. O., Vanden, Heuvel, J. P., Araujo, J. y Thompson, J. T. 2013. Marine- and plant-derived ω -3 fatty acids differentially regulate prostate cancer cell proliferation. *Mol Clin Oncol* 1(3):444-452. doi:10.3892/mco.2013.76.
- Fakhri, S., Abbaszadeh, F., Dargahi, L. y Jorjani, M. 2018. Astaxanthin: A Mechanistic Review on its Biological Activities and Health benefits. *Pharmacological Research*. doi:10.1016/j.phrs.2018.08.012.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2022. Cultured Aquatic Species Information Programme: *Penaeus vannamei* Boone 1931. Disponible en: https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/Penaeus_vannamei/en.
- Freitas, R. D. S. y Campos, M. M., 2019. Protective Effects of Omega-3 Fatty Acids in Cancer-Related Complications. *Nutrients* 26;11(5):945. doi:10.3390/nu11050945.
- Fresno, Vara, J. A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C. y González-Barón, M. 2003 PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 30(2):193-204. doi:10.1016/j.ctrv.2003.07.007.
- García-Romo, J. S., Hernández-Zazueta, M. S., Galvez-Iriqui, A. C., Plascencia-Jatomea, M., Burboa-Zazueta, M. G., Sandoval-Petris, E., Robles-Sánchez, R. M., Juárez-Onofre, J. E., Hernández-Martínez, J., Santacruz-Ortega, H. del C., López-Saiz C. M. y Burgos-Hernández, A. 2022. Isolation and identification of a new antiproliferative indolocarbazole alkaloid derivative extracted from farmed shrimp (*Litopenaeus vannamei*) muscle. *J Microbiol Biotech Food Sci* (5)e2173. doi:10.55251/jmbfs.2173.

- García-Romo, J. S., Noguera, L., Gálvez, A. C., Hernández, M. S., Valenzuela, D. F., González, R. I., Plascencia, M., Burboa, M. G., Sandoval, E., Robles, R.M., Juárez, J., Hernández, J., Santacruz, H. y Burgos-Hernández, A. 2020. Antioxidant, antihemolysis, and retinoprotective potentials of bioactive lipidic compounds from wild shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) muscle. *CyTA - Journal of Food* 18(1):153-163. doi:10.1080/19476337.2020.1719210.
- Ghatak, D., Das Ghosh, D. y Roychoudhury, S. 2021. Cancer Stemness: p53 at the Wheel. *Frontiers in Oncology* 10. doi:10.3389/fonc.2020.604124.
- Giordano, C., Plastina, P., Barone, I., Catalano, S. y Bonofiglio, D. 2020. n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Amides: New Avenues in the Prevention and Treatment of Breast Cancer. *International journal of molecular sciences* 21(7):2279. doi:10.3390/ijms21072279.
- Hanahan, D. y Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Harrison, E. H. y Quadro, L. 2018. Apocarotenoids: Emerging Roles in Mammals. *Annual Review of Nutrition* 38(1):153-172. doi:10.1146/annurev-nutr-082117-051841.
- Herrstedt, J., Lindberg, S. y Petersen, P. C. 2022. Prevention of Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting in the Older Patient: Optimizing Outcomes. *Drugs & aging* 39(1):1-21. doi:10.1007/s40266-021-00909-8.
- Hire, R. R., Srivastava, S., Davis, M. B., Kumar Konreddy, A. y Panda, D. 2017. Antiproliferative Activity of Crocin Involves Targeting of Microtubules in Breast Cancer Cells. *Scientific reports* 7,44984. doi:10.1038/srep44984.
- Ho, S. Y., Wu, W. S., Lin, L. C., Wu, Y. H., Chiu, H. W., Yeh, Y. L., Huang, B. M. y Wang, Y. J. 2019. Cordycepin Enhances Radiosensitivity in Oral Squamous Carcinoma Cells by Inducing Autophagy and Apoptosis Through Cell Cycle Arrest. *International Journal of Molecular Sciences* 20(21):5366. doi:10.3390/ijms20215366.
- Huyck, T. K., Gradishar, W., Manuguid, F. y Kirkpatrick, P. 2011. Eribulin mesylate. *Nature Reviews Drug Discovery* 10(3):173-174. doi:10.1038/nrd3389.
- IARC, International Agency for Research on Cancer. 2022. Cancer today. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/home>.
- Ierardi, E., Principi, M., Francavilla, R., Passaro, S., Noviello, F., Burattini, O. y Francavilla, A. 2001. *Digestive Diseases and Sciences* 46(5):1083-1087. doi:10.1023/a:1010774331331.
- Itahana, K., Dimri, G. P., Hara, E., Itahana, Y., Zou, Y., Desprez, P.-Y. y Campisi, J. 2002. A Role for p53 in Maintaining and Establishing the Quiescence Growth Arrest in Human

- Cells. Journal of Biological Chemistry 277(20):18206-18214. doi:10.1074/jbc.m201028200.
- Iwenofu, O., Lackman, R. y Staddon, A. 2008. Phospho-S6 ribosomal protein: a potential new predictive sarcoma marker for targeted mTOR therapy. *Mod Pathol* 21:231-237. doi:10.1038/modpathol.3800995.
- Jacot, W., Heudel, P., Fraisse, J., Gourgou, S., Guiu, S., Dalenc, F., Pistilli, B., Campone, M., Levy, C., Debled, M., Leheuteur, M., Chaix, M., Lefeuvre, C., Goncalves, A., Uwer, L., Ferrero, J.-M., Eymard, J.-C., Petit, T., Mouret-Reynier, M.-A., Courtinard, C., Cottu, P., Robain, M. y Mailliez, A. 2019. Real-life activity of eribulin mesylate among metastatic breast cancer patients in the multicenter national observational ESME program. *International Journal of Cancer*. doi:10.1002/ijc.32402.
- Katz, L. y Baltz, R. H. 2016. Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 43(2-3):155-176. doi:10.1007/s10295-015-1723-5.
- Khalifa, S. A. M., Elias, N., Farag, M. A., Chen, L., Saeed, A., Hegazy, M.-E. F., Moustafa, S., El-Wahed, A. A., Al-Mousawi, S. M., Musharraf, S. G., Chang, F.-R., Iwasaki, A., Suenaga, A., Alajlani M. M., Göransson U. y El-Seedi, H. R. 2019. Marine Natural Products: A Source of Novel Anticancer Drugs. *Marine Drugs* 17(9):491. doi:10.3390/md17090491.
- Kuedo, Z., Sangsuriyawong, A., Klaypradit, W., Tipmanee, V. y Chonpathompikunlert, P. 2016. Effects of Astaxanthin from *Litopenaeus Vannamei* on Carrageenan-Induced Edema and Pain Behavior in Mice. *Molecules* 21(3),382. doi:10.3390/molecules21030382.
- Kwon, H. K., Bae, G. U., Yoon, J. W., Kim, Y. K., Lee, H. Y., Lee, H. W. y Han, J. W. 2002. Constitutive activation of p70S6k in cancer cells. *Arch Pharm Res* 25(5):685-90. doi:10.1007/BF02976945.
- Lagiou, P., Adami, H. O. y Trichopoulos, D. 2005. Causality in cancer epidemiology. *European Journal of Epidemiology* 20(7):565–574. doi:10.1007/s10654-005-7968-y.
- Lamba, J. K. 2009. Genetic factors influencing cytarabine therapy. *Pharmacogenomics* 10(10):1657-74. doi:10.2217/pgs.09.118.
- Lee, H., Jeong, A. J. y Ye, S. K. 2019. Highlighted, STAT3 as a potential drug target for cancer therapy. *BMB Rep* 52(7):415-423. doi:10.5483/BMBRep.2019.52.7.152.
- Li, J., Guo, C. y Wu, J. 2020. Astaxanthin in Liver Health and Disease: A Potential Therapeutic Agent. *Drug design, development and therapy* 14:2275–2285. doi:10.2147/DDDT.S230749.

- Lin, G., Zhu, S., Wu, Y., Song, C., Wang, W., Zhang, Y., Chen, Y. L. y He, Z. 2017. ω -3 free fatty acids and all-trans retinoic acid synergistically induce growth inhibition of three subtypes of breast cancer cell lines. *Scientific reports* 7(1):2929. doi:10.1038/s41598-017-03231-9.
- Liu, S., Zheng, L., Aweya, J. J., Zheng, Z., Zhong, M., Chen, J., Wang, F. y Zhang, Y. 2017. *Litopenaeus vannamei* hemocyanin exhibits antitumor activity in S180 mouse model in vivo. *PLOS ONE* 12(8):e0183783. doi:10.1371/journal.pone.0183783.
- Liu, T., Li Q., Xu, X., Li, G., Tian, C. y Zhang, T. 2022. Molecular mechanisms of anti-cancer bioactivities of seaweed polysaccharides. *Chinese Herbal Medicines*. doi:10.1016/j.chmed.2022.02.003.
- Liu, Z., Hopkins, M. M., Zhang, Z., Quisenberry, C. B., Fix, L. C., Galvan, B. M. y Meier, K. E. 2014. Omega-3 fatty acids and other FFA4 agonists inhibit growth factor signaling in human prostate cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther* 352(2):380-94. doi:10.1124/jpet.114.218974.
- López-Saiz, C. M., Suárez-Jiménez, G. M., Plascencia-Jatomea, M. y Burgos-Hernández, A. 2013. Shrimp Lipids: A Source of Cancer Chemopreventive Compounds. *Marine Drugs* 11:3926-3950. doi:10.3390/md11103926.
- López-Saiz, C. M., Velázquez, C., Hernández, J., Cinco, F. C., Plascencia, M., Robles, M., Machi, L. y Burgos, A. 2014. Isolation and structural elucidation of antiproliferative compounds of lipidic fractions from White Shrimp muscle (*Litopenaeus vannamei*). *Molecular Sciences* 15:23555-23570. doi:10.3390/ijms151223555.
- López-Saiz, C.-M., Hernández, J., Cinco-Moroyoqui, F.-J., Velázquez, C., Ocaño-Higuera, V.-M., Plascencia-Jatomea, M., Robles-Sánchez, M., Machi-Lara, L. y Burgos-Hernández, A. 2016. Antimutagenic Compounds of White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*): Isolation and Structural Elucidation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 1-7. doi:10.1155/2016/8148215.
- Loukil, A., Cheung, C. T., Bendris, N., Lemmers, B., Peter, M. y Blanchard, J. M. 2015. Cyclin A2: At the crossroads of cell cycle and cell invasion. *World J Biol Chem* 6(4):346-50. doi:10.4331/wjbc.v6.i4.346.
- Lu, Y., Liu, B., Liu, Y., Yu, X. y Cheng, G. 2020. Dual effects of active ERK in cancer: A potential target for enhancing radiosensitivity. *Oncol Lett* 20(2):993-1000. doi:10.3892/ol.2020.11684.
- Luesch, H., Moore, R. E., Paul, V. J., Mooberry, S. L., y Corbett, T. H. 2001. Isolation of Dolastatin 10 from the Marine Cyanobacterium *Symploca* Species VP642 and Total

- Stereochemistry and Biological Evaluation of Its Analogue Symplostatin 1. *Journal of Natural Products* 64(7):907-910. doi:10.1021/np010049y.
- Łukasik, P., Załuski, M. y Gutowska, I. 2021. Cyclin-Dependent Kinases (CDK) and Their Role in Diseases Development–Review. *International Journal of Molecular Sciences* 22(6):2935. doi:10.3390/ijms22062935.
- Matthews, H. K., Bertoli, C. y de Bruin, R. A. M. 2021. Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi:10.1038/s41580-021-00404-3.
- Mercadante, A. A. y Kasi A. 2021. Genetics, Cancer Cell Cycle Phases. StatPearls Publishing. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563158/>.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65(1-2):55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- Moulder, D., Hatoum, D., Tay, E., Lin, Y. y McGowan, E. 2018. The Roles of p53 in Mitochondrial Dynamics and Cancer Metabolism: The Pendulum between Survival and Death in Breast Cancer? *Cancers*, 10(6),189. doi:10.3390/cancers10060189.
- Nagendraprabhu, P. y Sudhandiran, G. 2011. Astaxanthin inhibits tumor invasion by decreasing extracellular matrix production and induces apoptosis in experimental rat colon carcinogenesis by modulating the expressions of ERK-2, NFκB and COX-2. *Invest New Drugs* 29(2):207-24. doi:10.1007/s10637-009-9342-5.
- National Center for Biotechnology Information. 2022. PubChem Compound Summary for CID 5281224, Astaxanthin. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Astaxanthin>.
- NCI, National Cancer Institute. 2021. What Is Cancer?. Disponible en: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
- Ni, X., Yu, H., Wang, S., Zhang, C. y Shen, S. 2017. Astaxanthin Inhibits PC-3 Xenograft Prostate Tumor Growth in Nude Mice. *Marine Drugs* 15(3):66. doi:10.3390/md15030066.
- Nigam, M., Suleria, H. A. R., Farzaei, M. H. y Mishra, A. P. 2019. Marine anticancer drugs and their relevant targets: a treasure from the ocean. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. doi:10.1007/s40199-019-00273-4.
- Nikolakopoulou, Z., Nteliopoulos, G., Michael-Titus, A. T. y Parkinson, E. K. 2013. Omega-3 polyunsaturated fatty acids selectively inhibit growth in neoplastic oral keratinocytes by differentially activating ERK1/2. *Carcinogenesis* 34(12):2716–2725. doi:10.1093/carcin/bgt257.

- OMS, Organización Mundial de la Salud. 2022. Cancer, World Health Organization. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- Oono, K., Takahashi, K., Sukehara, S., Kurosawa, H., Matsumura, T., Taniguchi, S. y Ohta, S. 2017. Inhibition of PC3 human prostate cancer cell proliferation, invasion and migration by eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Mol Clin Oncol* 7(2):217-220. doi:10.3892/mco.2017.1287.
- Otto, T. y Sicinski, P. 2017. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 17(2):93-115. doi:10.1038/nrc.2016.138.
- Palozza, P., Torelli, C., Boninsegna, A., Simone, R., Catalano, A., Mele, M. C. y Picci, N. 2009. Growth-inhibitory effects of the astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* in human colon cancer cells. *Cancer Letters* 283(1):108-117. doi:10.1016/j.canlet.2009.03.031.
- Panagopoulos, A. y Altmeyer, M. 2021. The Hammer and the Dance of Cell Cycle Control. *Trends in Biochemical Sciences* 46(4):301-314. doi:10.1016/j.tibs.2020.11.002.
- Panal, Cusati, M., Herrera, de la Muela, M., Hardisson, Hernaez, D., Choqueneira, Dionisio, M., Román, Guindo, A. y de Santiago, Garcia, F. J. 2014. Correlación entre la expresión de Ki67 con factores clásicos pronósticos y predictivos en el cáncer de mama precoz. *Revista de Senología y Patología Mamaria*, 27(4):163-169. doi:10.1016/j.senol.2014.07.005.
- Panda, S. K., Ray, S., Nayak, S. R., Behera, S., Bhanja, S. S. y Acharya, V. 2019. A Review on Cell Cycle Checkpoints in Relation to Cancer. *The Journal of Medical Sciences* 5(4). doi:10.5005/jp-journals-10045-00138.
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S. y Vyvyan, J. R. 2009. Introduction to spectroscopy. Department of Chemistry. Western Washington University. Bellingham, Washington, Estados Unidos de América.
- Ponder, K. G. y Boise, L. H. 2019. The prodomain of caspase-3 regulates its own removal and caspase activation. *Cell Death Discovery* 5(1). doi:10.1038/s41420-019-0142-1.
- Qiao, X., Yang, L., Gao, Q., Yang, S., Li, Z., Xu, J. y Xue, C. 2018. Oxidation evaluation of free astaxanthin and astaxanthin esters in Pacific white shrimp during iced storage and frozen storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. doi:10.1002/jsfa.9417.
- Richter, C. K., Bowen, K. J., Mozaffarian, D., Kris-Etherton, P. M. y Skulas-Ray, A. C. 2017. Total Long-Chain n-3 Fatty Acid Intake and Food Sources in the United States Compared to Recommended Intakes: NHANES 2003-2008. *Lipids* 52(11):917-927. doi:10.1007/s11745-017-4297-3.

- Rodríguez-Bernal, C., García, A., Ponce-Palafox, J. T., Spanopoulos, M., Puga-López, D., Arredondo-Figueroa, J. y Martínez-Cardenas, L. 2017. The Color of Marine Shrimps and Its Role in the Aquaculture. *International Journal of Aquaculture and Fishery Sciences* 3:062-065. doi:10.17352/2455-8400.000030.
- Roudsari, N. M., Lashgari, N. A., Momtaz, S., Abaft, S., Jamali, F., Safaiepour, P., Narimisa, K., Jackson, G., Bishayee, A., Rezaei, N., Abdolghaffari, A. H. y Bishayee, 2021. A. Inhibitors of the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Prostate Cancer Chemoprevention and Intervention. *Pharmaceutics* 13(8):1195. doi:10.3390/pharmaceutics13081195.
- Ruiz-Almada, M. de G. 2020. Evaluación del potencial antiproliferativo de fracciones obtenidas del extracto lipídico del músculo del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) sobre líneas celulares de cáncer de colon y cáncer de próstata. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas. Hermosillo, Sonora, México.
- Ruiz-Torres, V., Encinar, J. A., Herranz, M., Pérez, A., Galiano, V., Barrajón, E. y Micol, V. 2017. The use of virtual screening for the discovery of small-molecule cancer drugs. *Molecules* 22. doi:10.3390/molecules22071037.
- Santo, L., Siu, K. T., & Raje, N. 2015. Targeting Cyclin-Dependent Kinases and Cell Cycle Progression in Human Cancers. *Seminars in Oncology* 42(6):788-800. doi:10.1053/j.seminoncol.2015.09.
- Seebacher, N. A., Stacy, A. E., Porter, G. M. y Merlot, A. M. 2019. Clinical development of targeted and immune based anti-cancer therapies. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 38(1). doi:10.1186/s13046-019-1094-2.
- Senter, P. D. y Sievers, E. L. 2012. The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. *Nature Biotechnology* 30(7):631-637. doi:10.1038/nbt.2289.
- Serini, S. y Calviello, G. 2017. Modulation of Ras/ERK and Phosphoinositide Signaling by Long-Chain n-3 PUFA in Breast Cancer and Their Potential Complementary Role in Combination with Targeted Drugs. *Nutrients* 9(3):185. doi:10.3390/nu9030185.
- Shamloo, B. y Usluer, S. 2019. p21 in Cancer Research. *Cancers (Basel)* 11(8):1178. doi:10.3390/cancers11081178.
- Shao, Y., Ni, Y., Yang, J., Lin, X., Li, J. y Zhang, L. 2016. Astaxanthin Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Mice H22 Hepatoma Cells. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* 22:2152-2160. doi:10.12659/msm.899419.

- Shen, Z., Ma, Y., Ji, Z., Hao, Y., Yan, X., Zhong, Y., Tang, X. y Ren, W. 2018. Arachidonic acid induces macrophage cell cycle arrest through the JNK signaling pathway. *Lipids in health and disease* 17(1):26. doi:10.1186/s12944-018-0673-0.
- Šimat, V., Rathod, N. B., Čagalj, M., Hamed, I. y Generalić Mekinić, I. 2022. Astaxanthin from Crustaceans and Their Byproducts: A Bioactive Metabolite Candidate for Therapeutic Application. *Marine drugs* 20(3):206. doi:10.3390/md20030206.
- Simopoulos, A. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 56(8):365-379. doi:10.1016/s0753-3322(02)00253-6.
- So, W. W., Liu, W. N. y Leung, K. N. 2015. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Trigger Cell Cycle Arrest and Induce Apoptosis in Human Neuroblastoma LA-N-1 Cells. *Nutrients* 7(8):6956-6973. doi:10.3390/nu7085319.
- Sowmya, R. y Sachindra, N. M. 2012. Evaluation of antioxidant activity of carotenoid extract from shrimp processing byproducts by in vitro assays and in membrane model system. *Food Chemistry* 134(1):308-314. doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.147.
- Sramkoski, R. M., Pretlow, T. G. 2nd., Giaconia, J. M., Pretlow, T. P., Schwartz, S., Sy, M. S., Marengo, S. R., Rhim, J. S., Zhang, D. y Jacobberger, J. W. 1999. A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 35(7):403-9. doi:10.1007/s11626-999-0115-4.
- Stachowiak, B. y Szulc, P. 2021. Astaxanthin for the Food Industry. *Molecules (Basel, Switzerland)* 26(9):2666. doi:10.3390/molecules26092666.
- Suarez-Jimenez, G. M., Burgos-Hernandez, A. y Ezquerra-Brauer, J. M. 2012. Bioactive Peptides and Dipeptides with Anticancer Potential: Sources from Marine Animals. *Marine Drugs* 10(12):963-986. doi:10.3390/md10050963.
- Sulzmaier, F. J., Jean, C. y Schlaepfer, D. D. 2014. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer* 14(9):598-610. doi:10.1038/nrc3792.
- Sun, S. Q., Zhao, Y. X., Li, S. Y., Qiang, J. W. y Ji, Y. Z. 2020. Anti-Tumor Effects of Astaxanthin by Inhibition of the Expression of STAT3 in Prostate Cancer. *Marine drugs* 18(8):415. doi:10.3390/md18080415.
- Tekin, E., Beppler, C., White, C., Mao, Z., Savage, V. M. y Yeh, P. J. 2016. Enhanced identification of synergistic and antagonistic emergent interactions among three or more drugs. *Journal of The Royal Society Interface* 13(119):20160332. doi:10.1098/rsif.2016.0332.
- Tousignant, K. D., Rockstroh, A., Poad, B., Talebi, A., Young, R., Taherian Fard, A., Gupta, R., Zang, T., Wang, C., Lehman, M. L., Swinnen, J. V., Blanksby, S. J., Nelson, C. C. y

- Sadowski, M. C. 2020. Therapy-induced lipid uptake and remodeling underpin ferroptosis hypersensitivity in prostate cancer. *Cancer & metabolism* 8:11. doi:10.1186/s40170-020-00217-6.
- Tyl, C. E., Brecker, L. y Wagner, K. H. 2008. ¹H NMR spectroscopy as tool to follow changes in the fatty acids of fish oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(2):141-148. doi:10.1002/ejlt.200700150.
- Wade, G. Jr. 2013. *Organic Chemistry*.
- Wang Z. Regulation of Cell Cycle Progression by Growth Factor-Induced Cell Signaling. *Cells* 10(12):3327. doi:10.3390/cells10123327.
- Waseem, H., Henriquez Felipe, C., Hashmi, A. T., Ansar, M., Batool, A., Saverimuthu, A. y Kamholz, S. L. 2018. Isolated Bilateral Ear and Scalp Rash After Cytarabine Therapy for Acute Myelogenous Leukemia. *American Journal of Therapeutics* 1. doi:10.1097/mjt.0000000000000850.
- Weylandt, K. H., Serini, S., Chen, Y. Q., Su, H.-M., Lim, K., Cittadini, A. y Calviello, G. 2015. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: The Way Forward in Times of Mixed Evidence. *BioMed Research International* 1-24. doi:10.1155/2015/143109.
- Wilson, B. A. P., Thornburg, C. C., Henrich, C. J., Grkovic, T. y O'Keefe, B. R. 2020. Creating and screening natural product libraries. *Natural Product Reports*. doi:10.1039/c9np00068b.
- Wilson-Sanchez, G., Moreno, C., Velazquez, C., Plascencia, M., Acosta, A., Machi, L., Aldana, M. L., Ezquerra, J. M., Robles, R. y Burgos, A. 2010. Antimutagenicity and antiproliferative studies of lipidic extracts from White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Marine Drugs* 8:2795-2809. doi:10.3390/md8112795.
- Xia, Y., Shen, S. y Verma, I. M. 2014. NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res* 2(9):823-30. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0112.
- Yin, N., Ma, W., Pei, J., Ouyang, Q., Tang, C. y Lai, L. 2014. Synergistic and Antagonistic Drug Combinations Depend on Network Topology. *PLOS ONE* 9(4):e93960. doi:10.1371/journal.pone.0093960.
- Youssef, J. y Badr, M. 2011 Peroxisome proliferator-activated receptors and cancer: challenges and opportunities. *Br J Pharmacol* 164(1):68-82. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01383.x.
- Zhang, X., Zhang, X., Yuan, J., Du, J., Li, F. y Xiang, J. 2017. Actin genes and their expression in pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Molecular Genetics and Genomics* 293(2), 479-493. doi:10.1007/s00438-017-1397-y.

- Zheng, L., Zhao, X., Zhang, P., Chen, C., Liu, S., Huang, R., Zhong, M., Wei, C. y Zhang, Y. 2016. Hemocyanin from Shrimp *Litopenaeus vannamei* Has Antiproliferative Effect against HeLa Cell In Vitro. PLOS ONE 11(3):e0151801. doi:10.1371/journal.pone.0151801.
- Zhong, L., Li, Y., Xiong, L., Wang, W., Wu, M., Yuan, T., Yang, W., Tian, C., Miao, Z., Wang, T. y Yang, S. 2021. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. Signal Transduction and Targeted Therapy 6(1). doi:10.1038/s41392-021-00572-w.
- Zou, T. y Lin, Z. 2021. The Involvement of Ubiquitination Machinery in Cell Cycle Regulation and Cancer Progression. International Journal of Molecular Sciences 22(11):5754. doi:10.3390/ijms22115754.