

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Farmacia



**PROPIEDADES TERAPÉUTICAS DE LA
FUCOXANTINA APLICADAS AL
CÁNCER DE PULMÓN**

IMBERT Inés Brigitte Pascale

Villaviciosa de Odón, Julio 2022.

ÍNDICE:

RESUMEN:	3
ABSTRACT:	3
INTRODUCCION:	5
1. El cáncer de pulmón:	5
2. La fucoxantina:	7
OBJETIVOS:	8
METODOLOGÍA:	9
DISCUSIÓN:	10
1. Efectos antitumorales de la FX en el CP:.....	10
1.1. La FX inhibe la proliferación de células de CP <i>in vitro</i> :	10
1.2. La FX inhibe el ciclo celular <i>in vitro</i> :	12
1.3. La FX induce la apoptosis <i>in vitro</i> :	13
1.4. Efecto de la FX en la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular <i>in vitro</i> : ..	13
1.5. Efecto de la FX en la expresión de proteínas reguladoras de la apoptosis <i>in vitro</i> :	14
1.6. Efecto de la FX sobre metástasis <i>in vitro</i> :	15
1.7. La FX inhibe la metástasis de las células de CP <i>in vivo</i> :	16
1.8. La FX induce la apoptosis <i>in vivo</i> :	17
2. Inestabilidad de la FX:.....	18
2.1. Inestabilidad de procesamiento y almacenamiento de la FX :	18
2.2. Inestabilidad de digestión gastrointestinal de la FX:	22
3. Nano- y micro-encapsulación de la FX:.....	26
3. Sostenibilidad:.....	28
CONCLUSIONES:	30
BIBLIOGRAFÍA:	31
ANEXOS:	34
Índice de figuras:.....	34
Tabla de abreviaturas:	36
Anexo 1: Nuevos casos y muertes por 36 cánceres y todos los cánceres combinados en 2020 (Sung et al., 2021).....	37
Anexo 2: Estructura química de de (a) fucoxantina all-trans (a), 9'-cis fucoxantina (b), 13-cis fucoxantina (c) y 13'-cis fucoxantina (d) (Cordenonsi et al., 2017).	38
Anexo 3: Estructuras químicas de la Fucoxantina (FX) y de sus metabolitos Fucoxantol (FXOL) y Amarouciaxantina A (AMA) (L. J. Martin, 2015).	39
Anexo 4: Biotransformación de fucoxantina. La Fucoxantina (FX) se hidroliza a	40
Fucoxantol en el tracto gastrointestinal y luego se convierte en Amarouciaxantina A (AMA) en el hígado (Bae et al., 2020).....	40

RESUMEN:

Hoy en día, uno de los principales problemas en los sistemas sanitarios a nivel global es la alta incidencia en pacientes con procesos tumorales. El cáncer puede suponer un gran impacto, no sólo se debe determinar como una pérdida en la salud física, sino que los procesos cancerígenos modifican la salud emocional. Esto supone un alto coste a nivel social ya que el cáncer, como enfermedad, es un proceso que nunca se sabe cómo puede resultar. Pero no se puede dejar de lado el coste económico, es decir, el coste propio del tratamiento antineoplásico/ quirúrgico del paciente, sino las implicaciones respecto a su trabajo y la baja que pueda conllevar.

En este TFG, se quiere demostrar como una sustancia natural, el carotenoide fucoxantina (FX), presente en las algas marinas, concretamente en *Laminaria japonica*, *Undaria pinnatifida*, *Costaria costata*, *Sargassum brinckeri*, tiene capacidad antitumoral suficiente para utilizarse como tratamiento anticancerígeno, como tratamiento coadyuvante o como profilaxis en personas con alta probabilidad de tener cáncer. Con ello, se podrían reducir los efectos secundarios, tanto a nivel local como a nivel sistémico, que poseen los tratamientos citostáticos que existen en la actualidad. Además, la vía de administración de la FX es oral, lo que implica facilidad de uso por el paciente.

El beneficio principal en la explotación de esta xantófila reside en que es un producto natural muy abundante en el mundo marino, fácil de sintetizar, extraer, poco costoso y que ya se utiliza en un amplio catálogo de bioactividades como son prevención y tratamiento de la obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares, hipertensión, protección hepática. Entonces, únicamente habría que dar el paso a un nivel de estudio farmacéutico enfocado al tratamiento del cáncer de pulmón (CP).

ABSTRACT:

Today, one of the main problems in health systems globally is the high incidence in patients with tumor processes. Cancer can have a great impact, not only should it be determined as a loss in physical health, but carcinogenic processes modify emotional health. This is a high cost at the social level since cancer, as a disease, is a process that you never know how it can turn out. But we cannot leave aside the economic cost, that is, the cost of the patient's own antineoplastic / surgical treatment, but the implications regarding their work and the loss that may entail.

In this TFG, we want to demonstrate as a natural substance, the carotenoid fucoxanthin, present in seaweed, specifically in *Laminaria japonica*, *Undaria pinnatifida*, *Costaria costata*, *Sargassum brinderi* has sufficient anticancer capacity to be used as an antitumoral treatment, as an adjuvant treatment or as a prophylaxis in people with high chance of getting cancer. With this, the side effects, both locally and systematically, that cytostatic treatments that currently exist could be reduced. In addition, the route of administration of fucoxanthin is oral, which implies ease of use by the patient.

The main benefit in the exploitation of this xanthophyll lies in the fact that it is a very abundant natural product in the marine world, easy to synthesize, extract, inexpensive and that it is already used in a wide range of bioactivities such as prevention and treatment of obesity, diabetes, cardiovascular diseases, hypertension, liver protection. Then, it would only be necessary to take the step to a level of pharmaceutical study focused on the treatment of lung cancer.

INTRODUCCION:

1. El cáncer de pulmón:

En 2020, se valoró la incidencia y mortalidad de 36 tipos de cáncer en 185 países del mundo. El CP se clasificó como segundo más comúnmente diagnosticado (2,2 millones de nuevos casos) y como la principal causa de mortalidad por cáncer a nivel mundial (1,8 millones de muertes) (**Anexo 1**) (Sung et al., 2021). En España, según el Registro de Tumores Torácicos (TTR) que aporta información epidemiológica sobre el CP, se repertorio un total de 17.109 procesos tumorales, 58.668 casos incidentes y 88.083 muertes inscritas en el intervalo desde el año 2017 hasta 2020 (Candal-Pedreira et al., 2022). El CP se organiza en dos clases histológicas, de células pequeñas (CPCP), y de células no pequeñas (CPCNP) que representan respectivamente el 15% y 85% de todos los tipos de este cáncer (Deshpande et al., 2022). El principal tipo de cáncer de pulmón (CPCNP) engloba a 3 subtipos, el adenocarcinoma, el carcinoma escamoso y el carcinoma de células grandes (dela Cruz et al., 2011). Las células epiteliales pulmonares, como todas las células somáticas de nuestro cuerpo se dividen a través del ciclo celular, que es un proceso organizado y regulado de forma precisa por mecanismos que controlan las señales de crecimiento extracelular, el tamaño celular y la integridad del ADN, favoreciendo la homeostasis de esas células eucariotas (Eymín & Gazzeri, 2010). El ciclo celular eucariótico se compone de 4 fases principales, G₁, S, G₂ y M. Durante la fase S, se genera una copia de material genético, es decir que se duplica el ADN y en la fase M o mitosis, la célula se divide en dos células hijas idénticas. Las dos otras fases, G₁, y G₂ sirven de interfase, es decir que permiten que las condiciones de la célula sean óptimas para entrar en fase de síntesis (fase S) y de mitosis (fase M), garantizando que todos los elementos estén listos, en fin, proporcionan el tiempo necesario para que el ciclo celular se realice de manera correcta (Alberts et al., 2002). El cáncer es una enfermedad provocada por el crecimiento descontrolado de un cierto tipo celular producido por alteraciones genéticas y epigenéticas a nivel de los elementos claves que regulan el ciclo celular (Langevin et al., 2014). Esos cambios conllevan a la activación de proto-oncogenes y/o la inactivación de genes supresores de tumores, produciendo una proliferación celular descontrolada e inhibición de los mecanismos de la apoptosis (Sarkar et al., 2013). Los mecanismos epigenéticos y genéticos modifican la expresión de genes, la diferencia entre estos dos procesos es que la epigenética, en su regulación, no implica cambios en la secuencia de ADN (Tume-Farfán, 2014). En el control normal

del ciclo celular, existe un equilibrio entre los proto-oncogenes que favorecen la proliferación celular y los genes supresores de tumores que suprimen la división celular (Feria Díaz et al., 2021; S. Martin & Mulrooney, n.d.). La mutación de un proto-oncogén en oncogén ocurre por cambios en la secuencia del ADN, a través de mecanismos genéticos como mutaciones puntuales, translocaciones cromosómicas, amplificaciones e integración de un genoma viral (Feria Díaz et al., 2021). Estas alteraciones se traducen como una ganancia de función, es decir, un aumento en la síntesis de proteínas esenciales de la división celular, como factores de crecimiento que resultan sobre expresados y receptores de crecimiento celular, sobre estimulados. (S. Martin & Mulrooney, n.d.). El receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un oncogén responsable del desarrollo de CP, que se expresa en un 60 % de CPCNP (da Cunha Santos et al., 2011). Las alteraciones genéticas de genes supresores de tumores suelen ocurrir a través de mutaciones puntuales y deleciones y se traducen por una pérdida de función del gen. Asimismo, este gen mutado no puede actuar de forma normal en las fases G₁ y G₂ del ciclo celular, es decir, que, en caso de daño en el ADN irreversible, no puede activar la apoptosis y detener la proliferación celular (S. Martin & Mulrooney, n.d.). Una mutación en el gen supresor TP53 (gen de la proteína tumoral p53) ocurre en 50% de los CPCNP (Mogi & Kuwano, 2011). La epigenética provoca cambios hereditarios en la expresión de genes que fomentan el inicio y progresión del CP, a través de los siguientes mecanismos, modificación de histonas, metilación del ADN y regulación de micro – ARN (Ansari et al., 2016). La metilación del ADN es un proceso mediante el cual se transfiere un grupo metilo en el carbono número 5 (C-5) del anillo citosina del ADN, esa reacción es catalizada por una enzima ADN-metiltransferasa (DNMT) (Jin et al., 2011). La metilación del ADN da lugar a una represión génica a través de dos mecanismos identificados: la hipermetilación (metilación de zonas de la secuencia de ADN normalmente desmetiladas) y la hipometilación (pérdida de metilación del ADN). En el CP, la hipermetilación suele ocurrir en los promotores de genes supresores de tumores, alteración epigenética que se puede observar en los diferentes estadios del proceso carcinogénico. Entre muchos genes supresores afectados por esta reacción, hay la hipermetilación de CDKN2A, un punto de control en las fases G₁ y S del ciclo celular, su inactivación conlleva a una división celular descontrolada de células pulmonares (Rojas Moreno et al., 2017).

2. La fucoxantina:

Debido a la continua búsqueda de nuevos medicamentos a cargo de las compañías farmacéuticas y de grupos de investigadores, se ha ido desarrollando la fitoterapia, que aprovecha la gran biodiversidad del ecosistema marino para producir compuestos con propiedades terapéuticas. Las plantas marinas proporcionan diferentes compuestos terapéuticos, como la FX, un pigmento xantófila extraído de algas pardas (*Laminaria japonica*, *Undaria pinnatifida*, *Costaria costata*, *Sargassum brinleri*). Numerosos estudios han demostrado que la FX posee propiedades biológicas relevantes para su aplicación en medicina, como la prevención y tratamiento del CP (Lourenço-Lopes et al., 2021). En Sudeste asiático, es corriente consumir FX mediante el uso cotidiano de algas comestibles como el conocido Wakame (familia *Undaria*) y Kombu (familia *Laminaria*) (Maeda et al., 2008). La FX, de fórmula molecular $C_{42}H_{58}O_6$ se organiza en una cadena de polieno central y dos anillos en su extremo (Figura 1). Como carotenoide, posee un gran número de insaturaciones, teniendo la posibilidad de formar isómeros, cuatro en concreto (**Anexo 2**) “*all-trans*, *13-cis*, *13'-cis* y *9'-cis*” (Pajot et al., 2022). La vía de administración preferente de la FX es la oral, por la seguridad que le confiere (Beppu et al., 2009). En nuestro organismo, se convierte en fucoxantínol (FXOL) y luego en amarouciaxantina A (AMA) (**Anexo 3**) en el intestino delgado e hígado, respectivamente (L. J. Martin, 2015).

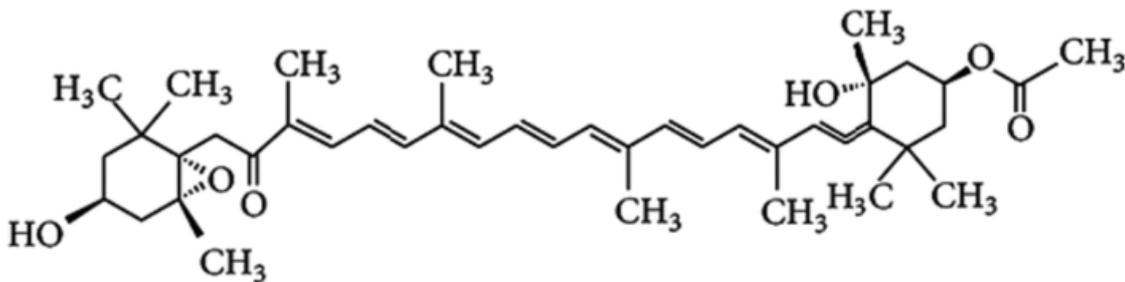


Figura 1 : estructura química de la FX (Zarekarizi et al., 2019).

OBJETIVOS:

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica de las publicaciones sobre propiedades terapéuticas de la FX para dar a entender a cualquier usuario los aspectos más relevantes de su uso en el tratamiento y prevención del CP y en base a esos resultados:

1. Explicar los principales efectos antitumorales de la FX en el CP y los mecanismos moleculares subyacentes: efectos sobre la viabilidad celular, proliferación celular, apoptosis y metástasis.
2. Discutir aspectos importantes de la FX, incluyendo su inestabilidad de procesamiento, almacenamiento e inestabilidad de digestión gastrointestinal que influyen en su biodisponibilidad, bioaccesibilidad y eficacia terapéutica.
3. Abordar la micro- y nano-encapsulación como tecnologías beneficiosas para la aplicación de la fucoxantina en procesos tumorales.

METODOLOGÍA:

Con el fin de cumplimentar con exactitud los objetivos planteados alrededor de las propiedades terapéuticas de la FX en el CP, se realizó una revisión bibliográfica. Los dispositivos electrónicos utilizados fueron un ordenador portátil, una tablet y un teléfono móvil. En primer lugar, he consultado los recursos digitales de la Biblioteca CRAI Dulce Chacón de la UEM que proporcionan una amplia gama de bases de datos para el ámbito de Ciencias Biomédicas y de la Salud, y he elegido a Pubmed, Medline Complete para mi búsqueda. Luego, independiente a esa herramienta, y para completar mi investigación científica, he utilizado Elsevier y Google Scholar. Para buscar información, he utilizado términos claves que tenían que aparecer en el título y resumen de cada referencia. En la parte de exploración de la FX, he introducido los siguientes términos: “Fucoxanthin”, “Therapeutic Effet”, “Bioavailability”, “Bioaccessibility”, “Stability”. “Micro encapsulation”, “Nano encapsulation”, “Nanoparticles”, “Microcapsules”. Para la investigación sobre el CP, las siguientes palabras: “Lung cancer”, “Lung carcinoma” “Epigenetic”, “Genetic”, “Mutation”, “Epidemiology”, “Cell cycle”, “Apoptosis”, “Migration”, “Metastasis”. Para encontrar resultados relevantes sobre la FX y el CP combinados, he mezclado las palabras anteriores, además, he utilizado los operadores lógicos “AND” y “OR” entre cada palabra en la búsqueda avanzada de cada base de datos con el fin de refinar los resultados. He seleccionado a 38 referencias bibliográficas, la mayoría publicadas en los 10 últimos años, también he incluido algunas fuentes anteriores al año 2012 por la importancia de su contenido e información para el desarrollo del presente trabajo.

DISCUSIÓN:

1. Efectos antitumorales de la FX en el CP:

Podemos usar la FX en el CP humano ya que interviene en distintos puntos claves de su desarrollo y, sobre todo, debido a su amplio espectro de acción que incluye distintas células de CP. En un estadio precoz de la enfermedad, por su efecto antiproliferativo mediante la inducción de apoptosis e inhibición del ciclo celular, la FX tiene una actividad tanto preventiva, como curativa. En una fase más avanzada, es capaz de impedir el proceso de metástasis por inhibición de la capacidad de migración e invasión de las células que ya entraron en un proceso neoplásico. Para demostrar este hecho, el TFG se basará en estudios clínicos donde se ensaya la FX extraída del alga parda *Laminaria Japónica* en experimentos *in vitro* e *in vivo* con el fin de entender los mecanismos involucrados en las distintas propiedades anticancerígenas de esa sustancia y demostrar su potencial terapéutico en el CP.

1.1.La FX inhibe la proliferación de células de CP *in vitro*:

En condiciones normales, existe un equilibrio entre proliferación celular y apoptosis, de manera que, en el CP, esa armonía se rompe, la balanza se desplaza hacia la proliferación y se descontrola el ciclo celular del tejido epitelial pulmonar. Una serie de científicos han confirmado que la FX tiene un potencial antiproliferativo en diferentes tipos de carcinomas, como de la próstata, de mama, de colon, de estómago, etc. (Rengarajan et al., 2013). Se investigó el efecto citotóxico de la FX aislada de *Laminaria Japónica* sobre las células no pequeñas de CP, siguiendo el protocolo del cell counting kit-8 (CCK-8) en el cual, las células se sembraron en una placa de 96 pocillos. Los cuatro tipos celulares (A549, SPC-A1, H460 y H1299) fueron sometidas a 6 dosis de FX (0, 12.5, 25, 50, 75 y 100 μ M) por un período de 24, 48 y 72 horas (Figura 2). En base a los resultados, se puede evidenciar que la FX inhibe de manera significativa la proliferación celular *in vitro*, además, ese efecto antiproliferativo es dosis y tiempo dependiente, es decir, que a mayor tiempo de incubación y dosis de FX, menor es el porcentaje de viabilidad celular (Mei et al., 2017).

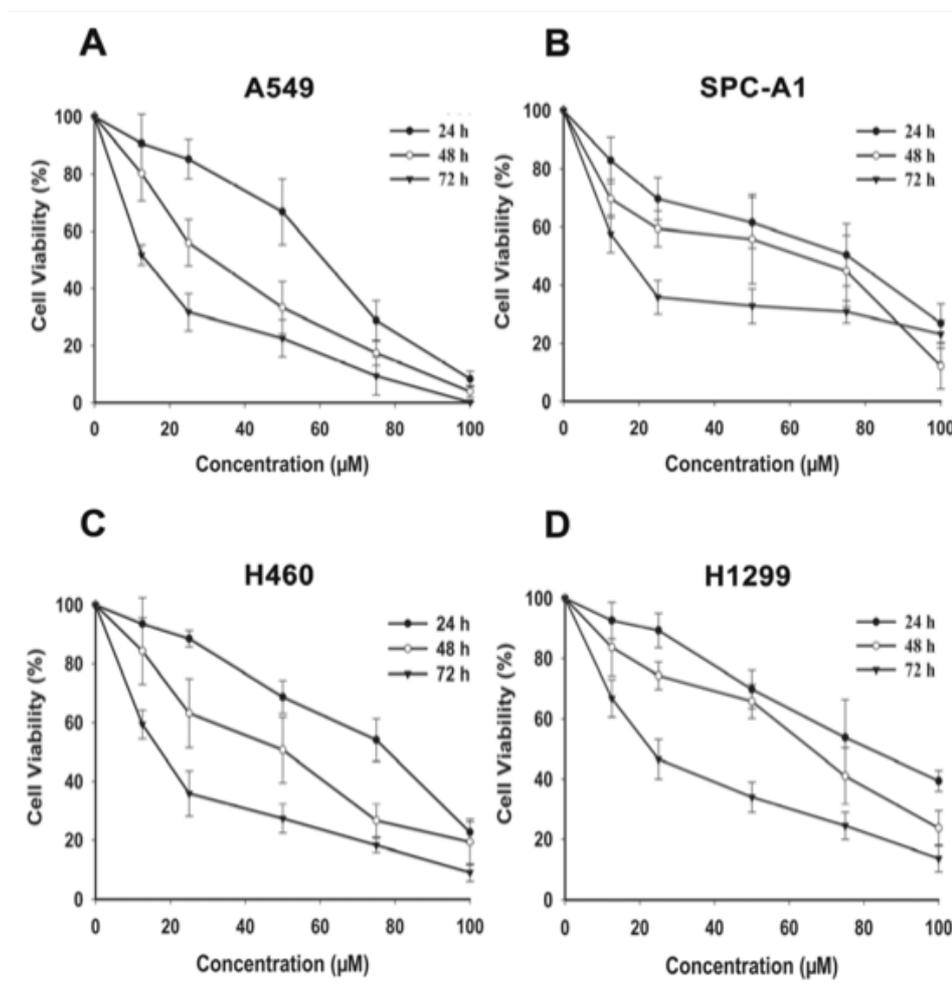


Figura 2 : Efectos de la FX en la proliferación de células humanas de CPCNP (Mei et al., 2017)

Para evaluar la viabilidad de las células de adenocarcinoma pulmonar humano PC9 y PC9 resistente a Gefinitif (PC9/G) frente a FX, se valoró de forma comparativa en combinación con la actividad de un fármaco antitumoral Gefinitib, que bloquea selectivamente la proteína EGFR (Figura 3). La actividad citotóxica de la FX frente a las dos líneas de células fue valorada de la misma forma que el ensayo CCK-8 del año 2017, es decir, sometiéndolas a diferentes concentraciones de FX, durante 24, 48 y 72 horas (Figura 3C y Figura 3D). En este ensayo, como en el anterior, se confirma que la FX inhibe de manera significativa las células PC9 y PC9/G y esta inhibición de proliferación celular es dependiente de dosis y tiempo (Ming et al., 2021). En la Figura 3A se puede observar que a bajas concentraciones de Gef, las células PC9 son más sensibles a su efecto antiproliferativo, mientras que las PC9/G son resistentes a altas concentraciones de Gef (Figura 3B). En la Figura 3E y Figura 3F, se puede ver que la combinación de FX con Gef aumenta claramente la inhibición del crecimiento celular tanto en PC9 como en PC9/G. Los datos obtenidos en los 2 ensayos han permitido demostrar que la FX es capaz de inhibir la proliferación de células no pequeñas de CP (A549, SPC-A1, H460 y H1299)

y de células de adenocarcinoma pulmonar humano (PC9 y PC9/G) *in vitro*. Además, la combinación de FX con Gef, aumenta la sensibilidad de las células PC9 Y PC9/G al tratamiento *in vitro* con Gef (Ming et al., 2021).

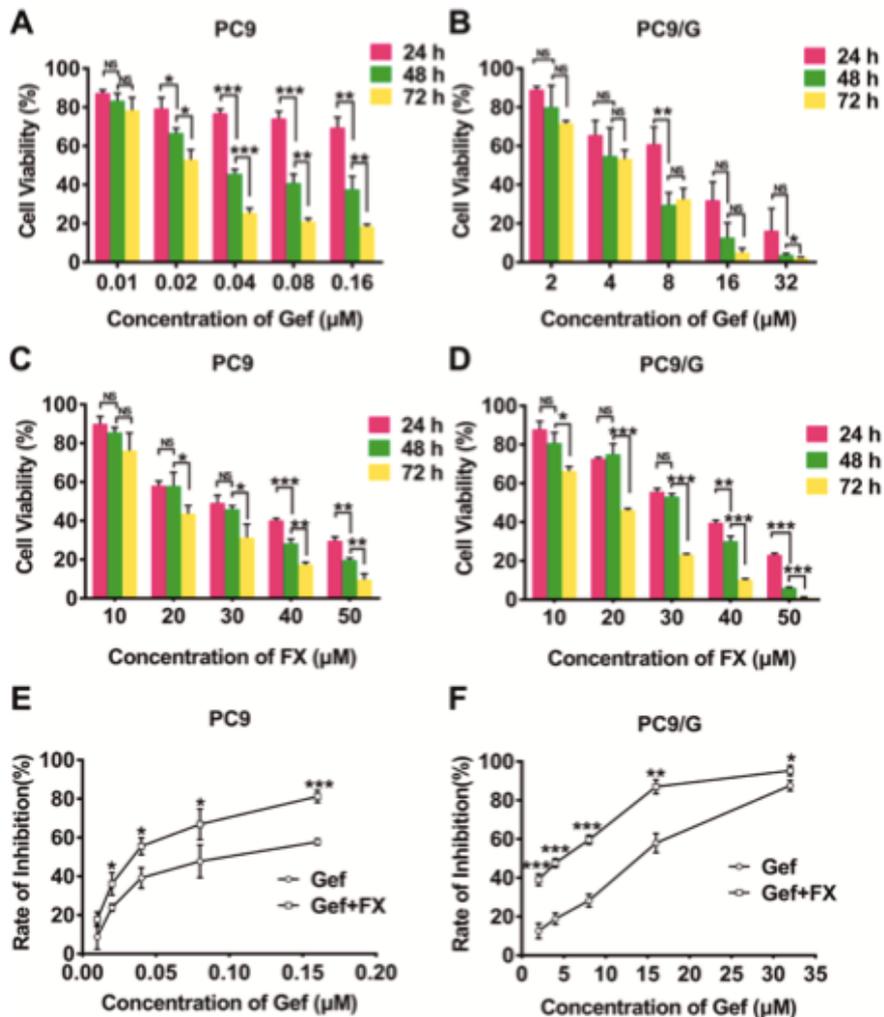


Figura 3: Efectos de la FX combinada con el fármaco Gefinitib sobre las células PC9 y PC9/G de CP humano (Ming et al., 2021).

1.2.La FX inhibe el ciclo celular *in vitro*:

El ciclo celular es imprescindible para la generación de nuevas células en el periodo embrionario, así como para la renovación de células adultas dañadas. Las fases S y M son claves en el ciclo celular, en la primera, se duplica el ADN y en la mitosis, la célula madre se divide en dos células. La fase G₁ y G₂ permiten que se desarrollen de manera adecuada las dos otras fases. La FX ha demostrado su efecto antiproliferativo mediante la inhibición del ciclo celular en varios tipos de células de CP (Rengarajan et al., 2013), como se confirmó *in vitro* en el estudio anterior. A través de un nuevo ensayo, se ilustró el efecto de la FX sobre del ciclo celular. Las células A549 y H1299 se trataron a una posología de

12.5, 25 y 50 μM de FX por 48h y se analizaron mediante una citometría de flujo. Transcurridos los 2 días de tratamiento, el porcentaje medio de células en la fase G_0/G_1 fue del 40 – 70 % (incluidas A549, H1299 y células del grupo control de cada una). A medida que el ciclo celular entraba en fases posteriores, (S y G_2/M), ese porcentaje disminuía. La actividad de la FX fue dependiente de dosis, es decir, que, a mayor concentración de carotenoide, menor porcentaje de células sobrevivieron a lo largo del ciclo celular. (Mei et al., 2017).

1.3.La FX induce la apoptosis *in vitro*:

La apoptosis es un mecanismo fisiológico de muerte celular programada que elimina las células infectadas, mutadas o dañadas. Las alteraciones a nivel de este mecanismo regulado favorecen el desarrollo de tumores (Rengarajan et al., 2013). El análisis del estudio anterior con citometría de flujo permitió medir el grado de apoptosis tras el tratamiento de las células A549 y H1299 con FX *in vitro*. En la primera célula, se pudo observar un 26 %, 38% y 40% de tasa apoptótica a las siguientes concentraciones de FX respectivamente 12.5, 25 y 50 μM . En las células H1299, la apoptosis fue presente en un 18%, 24, y 28% (12.5, 25 y 50 μM de FX). Comparando con el grupo control de cada una de ellas, donde solo se detectó un 1-2% de apoptosis, se puede observar que la inducción de apoptosis en células no pequeñas de CP por parte de la FX es dependiente de concentración, lo que proporciona resultados positivos *in vitro* (Figura 4) (Mei et al., 2017).

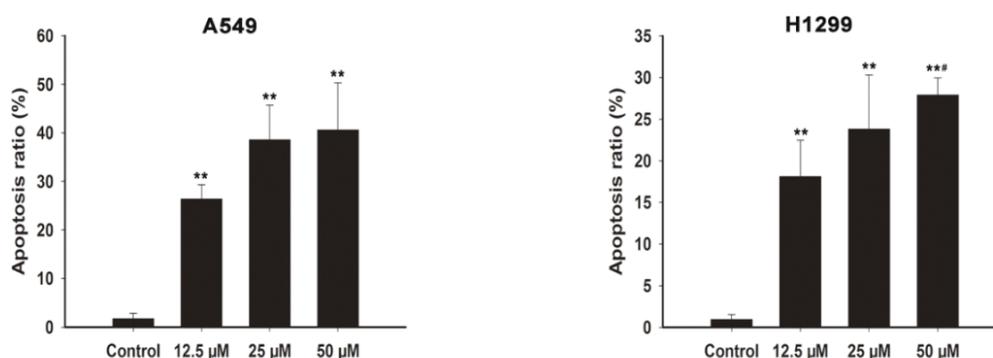


Figura 4 : Efectos de la FX en la apoptosis de células A549 y H1299 (Mei et al., 2017).

1.4.Efecto de la FX en la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular *in vitro*:

Un proceso tumoral se desencadena por alteraciones tanto genéticas como epigenéticas que modifican la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en el ciclo celular, activando a oncogenes o inactivando a genes supresores. La proteína $p21^{waf1/cip1}$ es

una CDKI (inhibidores kinasas ciclin-dependientes, en inglés cyclin-dependent kinases inhibitors) que inhibe a las CDK (kinasas dependientes de ciclina, en inglés cyclin-dependent kinases) evitando la progresión celular a fases G₁ y S. La proteína p53 es un gen supresor que activa a la p21^{waf1/cip1}, favoreciendo que se inhiba el ciclo celular y que se induzca la apoptosis. Recientemente, se confirmó que la FX es capaz de inhibir el crecimiento celular *in vivo* e *in vitro* de CPCNP, a través de la modificación en la expresión de proteínas reguladoras, eso se debe a un aumento en la expresión de p53, p21^{waf1/cip1} (Ming et al., 2021). Para conocer el mecanismo celular a través el cual la FX inhibe el ciclo celular y, por lo tanto, induce la apoptosis, las células A549 y H1299 se sometieron de nuevo a FX y se extrajo el ARN celular. Para cuantificar la expresión de proteínas reguladoras, se midieron los niveles de ARNm (que contiene toda la información genética para sintetizar proteínas y su nivel se correlaciona con el grado de expresión) de cada proteína por una RT-PCR cuantitativa. Se pudo valorar un aumento en la expresión de p21^{waf1/cip1} en A549 y H1299. La proteína p53 aumento su expresión en las células A549 mientras que en H1299 no se pudo detectar. Podemos ver que la FX activa la expresión de las proteínas p21^{waf1/cip1} y p53 (*in vitro*) de células no pequeñas de CP, por lo tanto, se puede asegurar que la FX inhibe el ciclo celular en fase G₀/G₁ (Figura 5) (Mei et al., 2017).

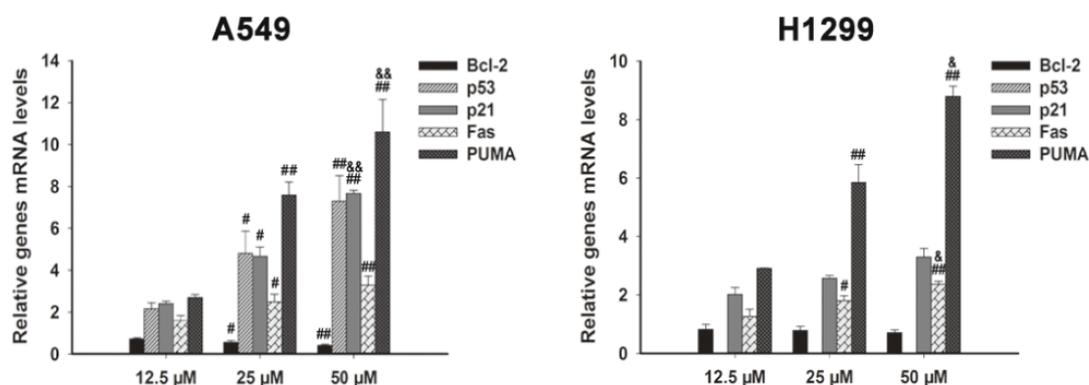


Figura 5 : La FX inhibe el ciclo celular y induce apoptosis regulando p21^{waf1/cip1}, p53, Bcl-2, PUMA y Fas (Mei et al., 2017).

1.5.Efecto de la FX en la expresión de proteínas reguladoras de la apoptosis *in vitro*:

Las caspasas son las principales proteínas de la apoptosis, que se activan al interactuar con proteínas extracelulares (Fas) o intracelulares (Bcl-2 y PUMA). Las caspasas-3, 6 y 7 son efectores de muerte celular y la caspasa-8 es quien las activa. Al estudiar el ARNm de las proteínas, se pudo ver que la expresión de PUMA y Fas fue regulada positivamente

mientras que Bcl-2 negativamente, otra vez de forma dosis-dependiente en las células A549 y H1299 (Figura 5). Además, utilizando las mismas células, se estudió el efecto de la FX sobre la caspasa-3 y 8 y se analizaron los resultados por colorimetría. Se puede ver en la Figura 6 que la FX aumenta la actividad de la caspasa-3 y caspasa-8 en las células A549 y H1299 con un comportamiento dosis dependiente. Asimismo, la FX es capaz de inducir la apoptosis mediante la vía de señalización intracelular y extracelular, modificando la expresión de genes que codifican proteínas reguladoras (Mei et al., 2017).

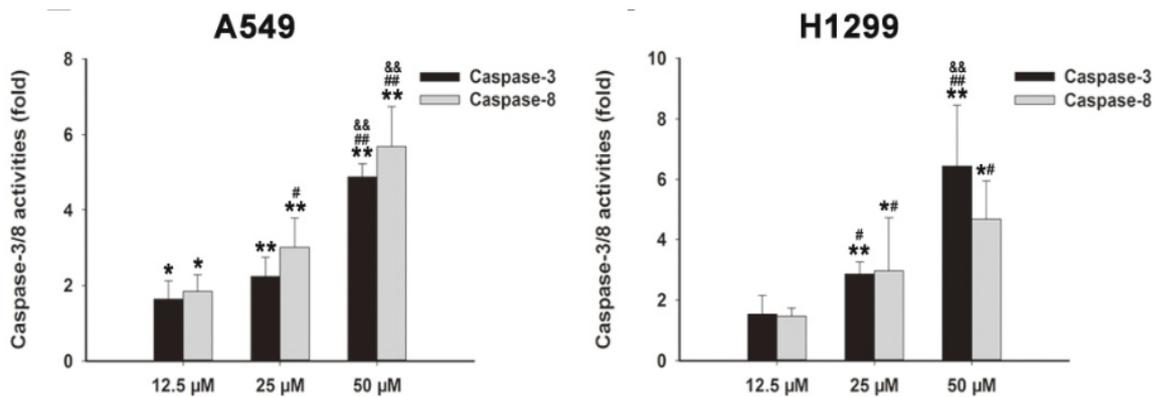


Figura 6 : Efectos de la FX sobre la actividad de la caspasa-3 y caspasa-8 (Mei et al., 2017).

1.6.Efecto de la FX sobre metástasis *in vitro*:

En un ensayo, se examinó que la FX inhibe la metástasis de células de CP. Se eligieron tres tipos celulares, A549, H1299 y H446 sometidas a una concentración de 10 μM de FX. Tras 48 horas de incubación, se realizaron pruebas de invasión y migración de Transwell, obteniendo los siguientes resultados (Figura 7). Con respecto al grupo control, se pudo apreciar el efecto inhibitorio de la FX en la capacidad de migración e invasión de los tres tipos de células, asimismo, la FX inhibió la metástasis de las células A549, H1299 y H446 en el CP (Ming et al., 2021).

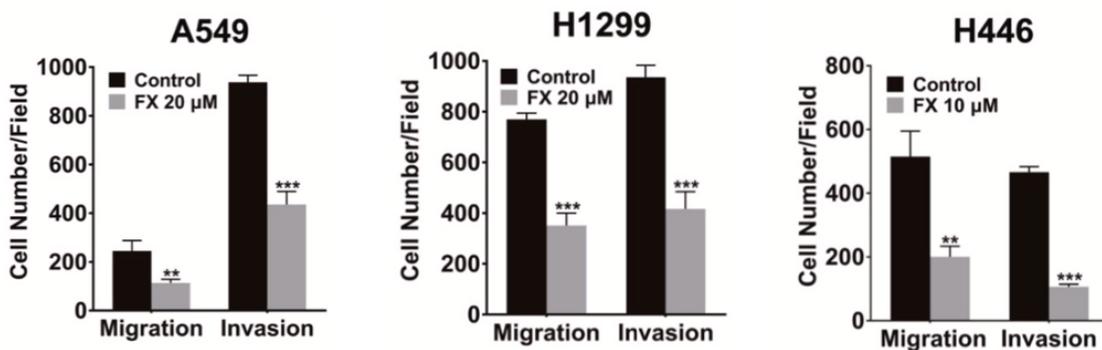


Figura 7 : Efectos de la FX sobre la migración e invasión en células de CP (Ming et al., 2021).

1.7. La FX inhibe la metástasis de las células de CP *in vivo*:

En el estudio anterior, se señaló la capacidad *in vitro* de atenuación de la metástasis de células de CP por la acción de la FX. En el presente estudio, se quiso demostrar lo mismo, pero *in vivo*. Para ello, se inyectaron 2 millones células A549 en las venas de la cola de ratones BALB/c de laboratorio y se dividieron en 4 grupos, según el tratamiento recibido. Se trató al grupo control con una solución salina, el segundo, con Diamminedichloroplatinum (DPP, un fármaco antitumoral a base de platino) y los dos últimos recibieron FX (50 y 150 mg/kg de peso corporal) (Figura 8). Los triángulos, representados en negro, corresponden al número de nódulos de los pulmones en cada grupo. Con respecto al grupo control, que contiene 5 nódulos metastásicos, los pulmones de ratones sometidos respectivamente a 50 y 150 mg/kg de FX solo presentaban 3 y 1 nódulo (Figura 8A). El análisis histológico posterior con tinción de hematoxilina y eosina (H&E) (Figura 8B) demostró una menor densidad de nódulos cancerosos en los dos grupos de ratones tratados con FX. Con los datos obtenidos, podemos asegurar que un tratamiento con FX reduce de manera significativa la cantidad de nódulos metastásicos de ratones portadores de células A549 de CP *in vitro* (Ming et al., 2021).

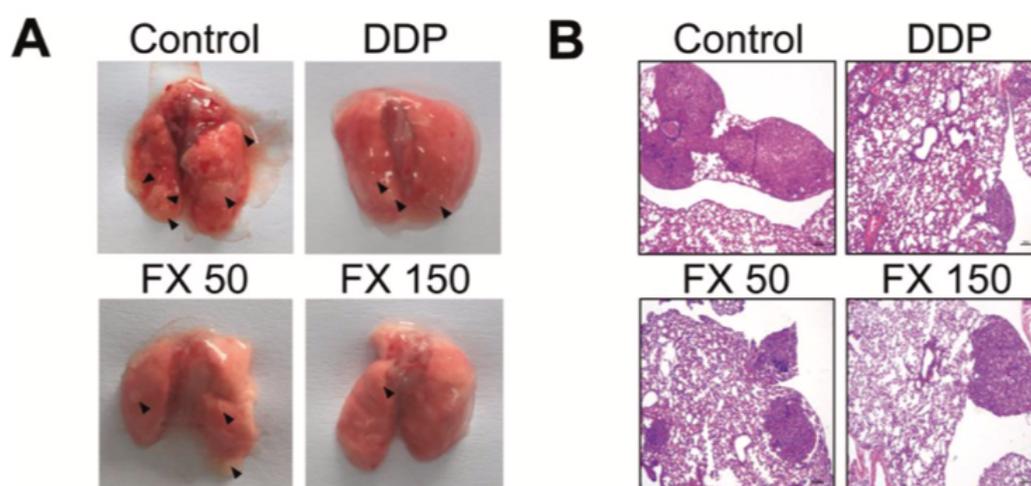


Figura 8 : Efecto terapéutico de la FX en un experimento de metástasis de pulmón (Ming et al., 2021).

De forma similar al estudio anterior, se manifestó el potencial terapéutico *in vitro* de la FX frente a células A549 de CP humano, inoculadas en ratones de laboratorio. Primero, se inyectaron por vía subcutánea las células y pasados cinco días, los ratones recibieron un tratamiento por vía oral durante cinco semanas. El grupo control recibió aceite de soja virgen mientras que los tres grupos restantes recibieron FX en dosis de 5, 15 y 50 mg/kg de peso corporal. Se puede observar que la FX disminuyó de manera significativa el peso de tumores sólidos en los 3 grupos de ratones tratados con FX respecto al grupo control.

Además, a mayor dosis de tratamiento con FX, mayor fue la pérdida de peso de los tumores (Figura 9C). Además, se pueden observar unas tasas de inhibición del 62%, 70% y 78% a 5, 15 y 50 mg/kg de FX (Figura 9A), como resultado de disminución de volumen de tumor con un comportamiento dependiente de dosis. El tratamiento con FX no cambio de manera significativa el peso corporal de los ratones de laboratorio (Figura 9D) (Mei et al., 2017).

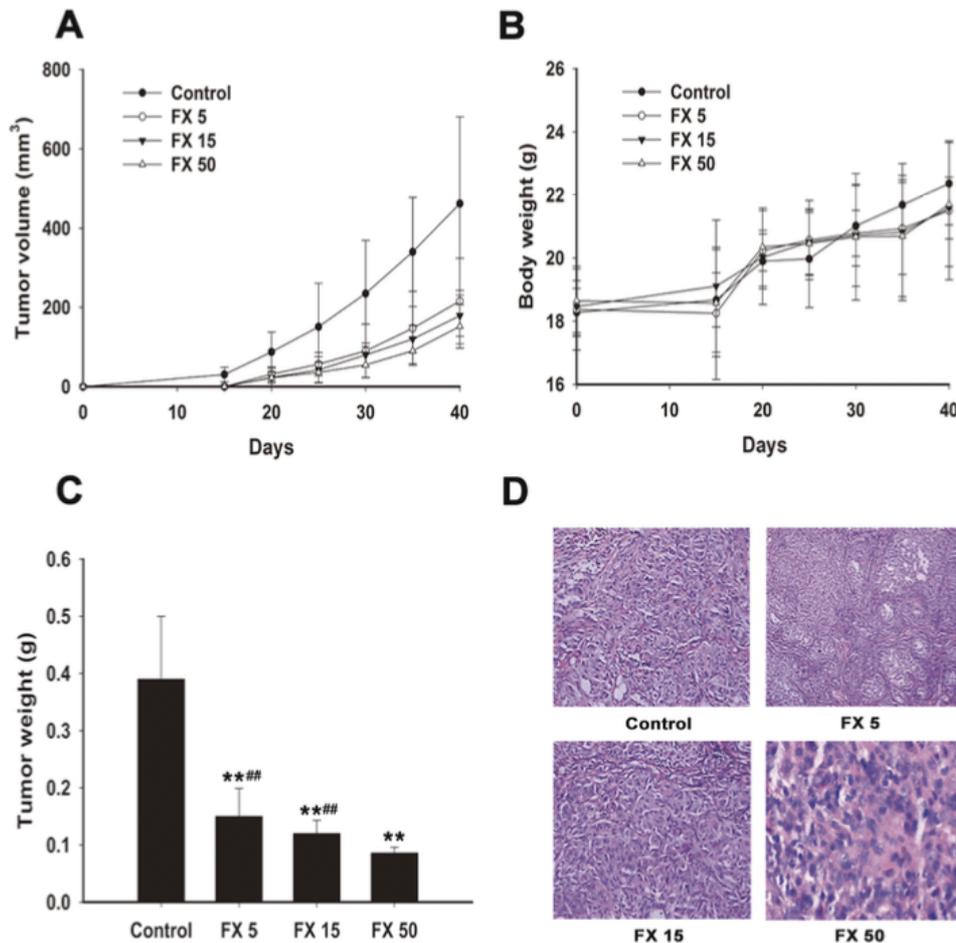


Figura 9 : La FX inhibe el crecimiento del xenoinjerto tumoral A549 *in vivo* (Mei et al., 2017)

1.8. La FX induce la apoptosis *in vivo*:

La apoptosis es favorecida mediante la regulación positiva en la expresión de caspasas y regulación negativa de proteínas con potente poder supresor de apoptosis como las proteínas Bcl-2 y Bcl-x. Se demostró que la FX induce la apoptosis mediante la disminución de expresión de proteínas anti-apoptóticas y por la activación de caspasas (Rengarajan et al., 2013). Para estudiar el mecanismo mediante el cual la FX es capaz de inducir la apoptosis, se realizó un ensayo TUNEL, para detectar el porcentaje de células

apoptóticas en el tumor después del tratamiento con FX. Además, mediante el análisis por tinción inmunohistoquímica, se evaluó el efecto de la FX sobre la expresión de proteínas implicadas en la apoptosis, Bcl-2 y caspasa-3. En la Figura 10, la FX favorece la apoptosis en células A549 de los ratones de laboratorio, con un comportamiento dependiente de dosis. En el grupo de ratones sometidos a 50 mg/kg de FX, se detectaron un 50% de células apoptóticas positivas en el tumor, mientras que en el grupo control, solo se detectó un 5%. En el tejido tumoral, de acuerdo con los resultados anteriores obtenidos *in vitro*, en tratamiento con FX, la expresión de Bcl-2 disminuyó y de caspasa-3 aumento, de forma dosis dependiente. En base a esos datos, se puede confirmar que la FX induce la apoptosis *in vivo*, regulando positivamente la expresión de Bcl-2 y negativamente a caspasa-3 (Mei et al., 2017).

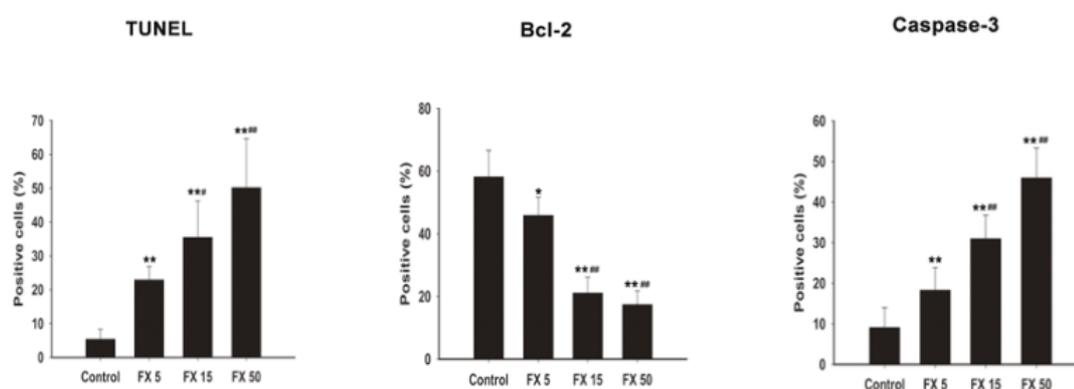


Figura 10 : Efectos de la FX en la expresión de las proteínas Bcl-2 y Caspasa-3 y tasas de apoptosis en tumores de xenoinjerto A549 (Mei et al., 2017)

2. Inestabilidad de la FX:

La eficacia terapéutica de la FX se ve alterada por su inestabilidad a nivel de procesamiento, almacenamiento y digestión gastrointestinal (Wang et al., 2020).

2.1. Inestabilidad de procesamiento y almacenamiento de la FX :

De acuerdo con la estructura general de la FX, al igual que los carotenoides, la FX es sensible a condiciones externas desfavorables (Sun et al., 2018) y se puede degradar por reacciones de oxidación e isomerización como consecuencia de su exposición al calor, luz, oxígeno, enzimas... (Zhao et al., 2014). Esa inestabilidad en etapas de procesamiento y almacenamiento influye en su uso como nutraceutico (Wang et al., 2020). En un estudio, se investigó la inestabilidad de la FX al someterla a diferente pH, temperatura y condiciones de almacenamiento. En el primer ensayo, se evaluó la estabilidad de la FX a diferentes valores de pH (2.0, 4.0, 6.0, 7.0, 8.0 y 10.0). Para ajustar su pH a valores deseados, se utilizaron 3 soluciones amortiguadoras (o tampón): citrato de sodio (pH 2.0-

4.0), fosfato de sodio (pH 6.0-8.0) y glicina-NaOH (pH 10.0), se incubó la FX en esos buffers durante 60 minutos a una temperatura de 37°C. Se puede observar (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.A**) que a pH ácido (2.0-4.0) se detectaron bajas concentraciones de FX (< 0.6 mg/L), mientras que a pH neutro y alcalino (6.0-10.0) se detectaron concentraciones mayores de FX (> 1.0 mg/L). En base a eso, y de acuerdo con el hecho que la FX puede ser fácilmente degradada por su exposición a un medio ácido (Wang et al., 2020), la estabilidad de la FX es muy baja en condiciones ácidas y aumenta mientras a medida que el pH se alcaliniza (Kawee-ai et al., 2013). La estabilidad térmica se valoró utilizando FX a una densidad de 1.35 mg/L en una solución tampón de fosfato con un pH neutro (igual a 7) e incubando la mezcla durante 60 minutos en un baño maría para alcanzar temperaturas entre 25 y 100°C. Los resultados obtenidos (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.B**) confirman que la FX es sensible a altas temperaturas, en la cual se puede ver que, a una temperatura igual a 100°C, disminuye su concentración, por el efecto del calor que la degrada, mientras que a temperaturas comprendidas entre 25 y 50 °C, no se aprecian cambios significativos de cantidad de FX (Kawee-ai et al., 2013). Por último, se valoró la estabilidad de la FX en el proceso de almacenamiento a dos temperaturas (4 y 25°C) en un ambiente oscuro durante 6 meses (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.C**). Se puede percibir que, a una temperatura ambiental de 4 o 25°C por un periodo de almacenamiento de 2 meses, no se ve alterada la FX, mientras que, transcurrido ese tiempo, se degrada siendo más significativo a mayor temperatura de almacenamiento (25°C). Cabe añadir que, en condiciones oscuras de almacenamiento, la degradación de FX también ocurre. Para poder ser almacenada de forma óptima, la FX tendría que conservarse a una temperatura inferior a 4°C a un pH alcalino (Kawee-ai et al., 2013).

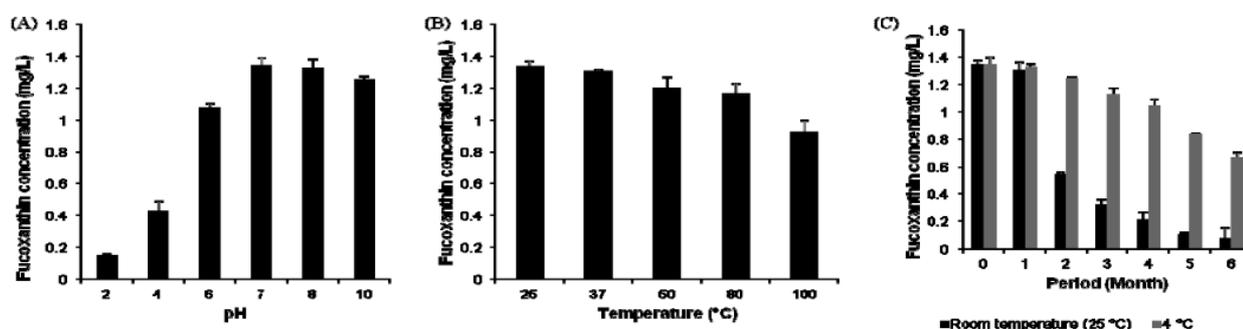


Figura 11 : Estabilidad de la FX a diferente pH (A), temperatura (B) y periodos de almacenamiento (C)(Kawee-ai et al., 2013).

En otro estudio, se quiso valorar la estabilidad de la FX extraída de *Sargassum brinnderi* en diferentes condiciones de almacenamiento. En un primer experimento, se evaluó el impacto de la suplementación de un agente antioxidante (ácido ascórbico) sobre la estabilidad de almacenamiento de la FX en condiciones de luz y oscuridad, por un periodo de 4 semanas. Se prepararon 3 muestras de FX y se añadió el ácido ascórbico hasta obtener unas concentraciones en porcentaje peso volumen (% p/v) del 0.1, 0.5 y 1.0 % de ácido ascórbico, la muestra control solo contenía FX. Cada muestra se dividió en dos, un grupo sometido a luz, el otro a oscuridad, la estabilidad de la FX se valoró durante un mes. Se puede observar (Figura 12) que, pasada una semana, todas las muestras de FX (incluido el grupo control) expuestas a la luz se degradaron de modo importante, aunque se le añadió un agente antioxidante a distinta concentración (Hii et al., 2010).

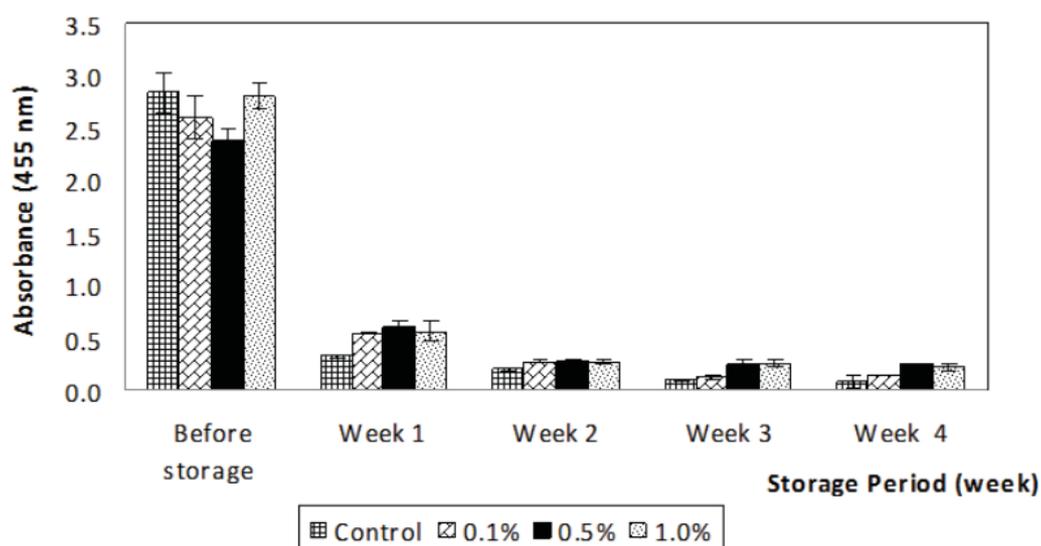


Figura 12: Estabilidad de la FX tratada con ácido ascórbico y expuesta a la luz (Hii et al., 2010).

Sin embargo, se pudo observar que la suplementación de ácido ascórbico almacenado en condiciones de oscuridad permite retener la pigmentación de la FX, aproximadamente en un 56, 66 y 71% en muestras de FX y ácido ascórbico (respectivamente en un %p/v del 0.1, 0.5 y 1.0). La muestra control demostró una retención de pigmento inferior al 50%, esos datos surgieron que, a mayor suplementación de agente antioxidante, más estable es la FX en condiciones oscuras de almacenamiento. De acuerdo con los resultados anteriores, aunque la FX se mezcle con ácido ascórbico, si se almacena en presencia de luz, se degrada, reteniendo la pigmentación del carotenoide en una proporción < 10%, sin importar que sea la muestra control o con agente antioxidante (Hii et al., 2010).

En el segundo ensayo, se valoró la estabilidad de la FX a diferentes pH (3.0, 5.0, 7 y 9) durante el mismo periodo de almacenamiento, también en condiciones oscuras y claras

de almacenamiento. Se pudo ver, que, en condiciones oscuras, la FX demostró una mayor estabilidad a un pH igual a 9, mientras que a un pH igual a 3, fue mínima, lo que confirma que el carotenoide se degrada en condiciones ácidas y es más estable a un pH alcalino (Hii et al., 2010).

En un estudio, se realizaron varios ensayos para conocer las reacciones químicas involucradas en la degradación de la FX por su exposición al calor, aire y luz. La FX fue extraída y purificada del alga parda *Costaria costata* y mezclada en un disolvente, aceite de canola, para su posterior análisis. Primero, se realizó una cromatografía líquida (HPLC) para identificar a los diferentes isómeros de la FX. El cromatograma a una longitud de onda de 450 nm (Figura 13) resultante reveló 4 picos, correspondientes a los 4 isómeros de la FX que existen, el “all-trans”, 13-cis, 13' cis y 9'-cis. Eso nos permite asegurar que bajo ciertas condiciones (calor, luz, aire,) la FX puede sufrir isomerización, dando lugar a diferentes estructuras derivadas de ella misma, es decir, isómeros.

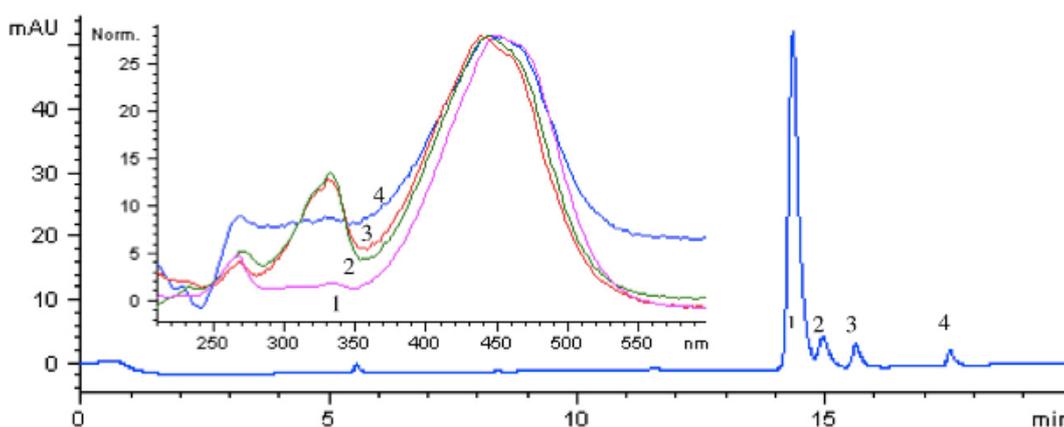


Figura 13 : Cromatograma HPLC a 450 nm y espectros UV-VIS correspondientes obtenidos de aceite de canola que contiene fucoxantina purificada. Picos: 1, all trans; 2, 13-cis; 3, 13' -cis; 4, 9'-cis (Zhao et al., 2014).

En un segundo ensayo, se estudió el efecto del calor sobre esos isómeros, en ausencia de aire y luz. El aceite de canola recibió un tratamiento térmico a distintas temperaturas: 25, 37, 60 y 80 °C. La concentración del isómero all-trans y total de FX disminuyó gradualmente a lo largo del aumento de temperatura entre 25 y 100°C. Por otro lado, a una temperatura comprendida entre 37 y 100°C, los isómeros 13-cis y 13' cis aumentaron su concentración, mientras que el isómero 9' cis se degradó. Esos resultados sugieren que el isómero all-trans se degradó por isomerización en 13-cis y 13' cis y que el isómero 9' cis se degradó por oxidación. De forma global, se puede ver que, al someterse al calor, los perfiles de concentración de la FX evolucionan mediante dos procesos, la degradación de compuesto (por oxidación e isomerización) y formación de compuesto (por isomerización). Ese estudio junto a los resultados de los 2 anteriores sugieren que la FX,

por exposición a agentes externos, por su estructura, se degrada fácilmente, por procesos químicos (Zhao et al., 2014).

2.2. Inestabilidad de digestión gastrointestinal de la FX:

En general, para ser absorbidos por las células intestinales epiteliales, los carotenoides se deben solubilizar en el líquido digestivo (Kotake-Nara & Nagao, 2011). Asimismo, como carotenoide liposoluble, la FX debe liberarse de la matriz alimenticia para incorporarse a las micelas lipídicas mixtas (Wang et al., 2020), donde se solubilizan y se vuelven aptas para el proceso de absorción. La biodisponibilidad depende de la proporción de carotenoide solubilizada en las micelas mixtas (Kotake-Nara & Nagao, 2011). Como compuesto marino apolar e hidrofóbico, la FX no es soluble en agua (Wang et al., 2020) y tampoco en el líquido digestivo, lo que explica su baja biodisponibilidad (Kotake-Nara & Nagao, 2011). En un primer estudio, se buscó información sobre el metabolismo y absorción de las epoxixantofilas (un amplio grupo de carotenoides que incluye a la FX) para evaluar su biodisponibilidad, en 5 voluntarios sanos (3 mujeres y 2 varones). Para ello, fueron sometidos a una semana de dieta con espinacas (*Spiracia oleracea*), con una cantidad 3.0 mg de neoxantina cada día y una semana de dieta con wakame (*Undaria pinnatifida*), con dosis diaria de 6.1 mg de FX. Después, se evaluó la concentración plasmática, del conjunto de epoxixantofilas y sus metabolitos por HPLC, para evaluar en particular, la biodisponibilidad de FX y neoxantina. Los resultados en los 5 voluntarios demostraron primero que después de una semana de dieta con espinacas, las concentraciones plasmáticas de la neoxantina y sus metabolitos se encontraban alrededor de 1nmol/L mientras que las de betacaroteno y luteína aumentaron significativamente. En cuanto al fucoxantínol (FXOL), el metabolito activo de la FX, su concentración plasmática después de 1 semana de ingesta de wakame era de 0.8 nmol/L, cerca del límite de cuantificación (1nmol/L) en todos los voluntarios (Asai et al., 2008). En un segundo estudio, se investigó la farmacocinética de la FX y su metabolito, el FXOL, administrando de forma oral un extracto de alga kombu que contenía 31 mg de FX a 18 personas voluntarias. La sangre periférica fue recogida a distintos momentos, 5 minutos antes de recibir el tratamiento y 0.5, 1, 2, 4, 8 y 24 horas después y se analizaron las concentraciones de FXOL por HPLC. Se puede ver (Figura 14) que la concentración de FXOL en el plasma aumentó significativamente hasta 4 horas después de la administración del extracto de kombu, disminuyendo progresivamente alcanzando una concentración de 7.6 nmol/L a un tiempo igual a 24 horas. Los parámetros farmacocinéticos se calcularon mediante un programa de análisis farmacocinético no

compartimental, en base a esas concentraciones del metabolito obtenidas a lo largo del tiempo, obteniendo los siguientes resultados: concentración plasmática máxima (C_{max}) igual a 44.2 nmol/L, tiempo a máxima concentración (T_{max}) igual a 4 horas y área bajo la curva (AUC) igual a 578.7 nmol/L (Hashimoto et al., 2012).

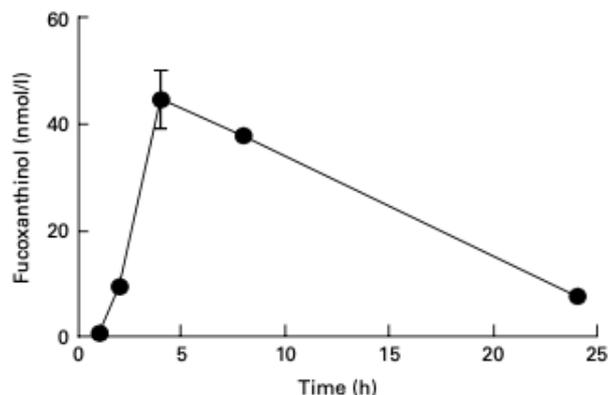


Figura 14 : Perfil del FXOL a lo largo del tiempo después de una dosis de FX (Hashimoto et al., 2012).

En base a los resultados de los 2 estudios anteriores, se puede afirmar que la FX y su metabolito, el FXOL tienen una biodisponibilidad más baja que otros como carotenoides como el betacaroteno y la luteína y que eso se debe principalmente a su carácter hidrofóbico como carotenoide liposoluble.

La estructura química de la FX liberada de la matriz se puede ver afectada por reacciones de biotransformación y metabolismo que ocurren principalmente a nivel del tracto gastrointestinal e hígado, por reacciones de hidrólisis, deshidrogenación e isomerización. El FXOL y AMA son los elementos bioactivos de la FX responsables de sus funciones fisiológicas en el organismo, siendo su biodisponibilidad muy importante. La FX se absorbe en forma de FXOL, por hidrólisis en el intestino delgado, que se convierte luego a AMA en el hígado (Hashimoto et al., 2012) por una reacción de deshidrogenación/isomerización, catalizada por una deshidrogenasa dependiente de $NAD(P)^+$ (Lourenço-Lopes et al., 2021)(**Anexo 4**). En el entorno gastrointestinal, el pH ácido y las lipasas pancreáticas juegan un papel en la degradación y biotransformación de la FX. Por lo tanto, en el tracto gastrointestinal, la FX puede ser hidrolizada en metabolito activo en el intestino delgado, ser absorbida y desempeñar su función biológica o ser degradada en el estómago y como resultado, perder su eficacia terapéutica. El estudio de la biodisponibilidad de la FX permite entender la relación que existe entre los efectos del pH y enzimas sobre su tasa de absorción (Wang et al., 2020). En otro estudio, se investigó el efecto del pH gástrico sobre la FX, utilizando FX pura (pure fucoxanthin, PF) (**Error! No se encuentra el origen de la referencia.**A), una emulsión que contiene FX, obtenida

por mezcla de FX pura y aceite de oliva (5% p/p) con una solución acuosa que contiene Tween 80 (1%, p/p) (fucoxanthin containing emulsión, FCE) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**B) y un extracto de la microalga *Nitzschia laevis* (NLE) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**C) con un porcentaje de 5.1 de FX, las muestras fueron sometidas a distintos pH gástricos (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) se puede observar la biodisponibilidad de los 3 tipos de muestras de FX, tras su digestión a distintos pH gástricos. Al ser digeridos a un pH entre 4 y 5, PF y FCE no demostraron diferencia significativa de biodisponibilidad comparando con su digestión a un pH igual a 3. En cambio, si miramos los datos de biodisponibilidad de NLE, se puede ver que fue bastante menor a pH 3 en comparación con la biodisponibilidad a pH 4 y 5. Eso significa que la estabilidad de la FX es más baja a un pH inferior a 3, intermedia entre a pH comprendido entre 3 y 5 y mayor a un pH 5-7. Desde otro enfoque, al mirar las cifras de biodisponibilidad, una proporción entre 40 – 70% de FX llegó a circulación periférica, siendo el 30% no biodisponible (Sun et al., 2018).

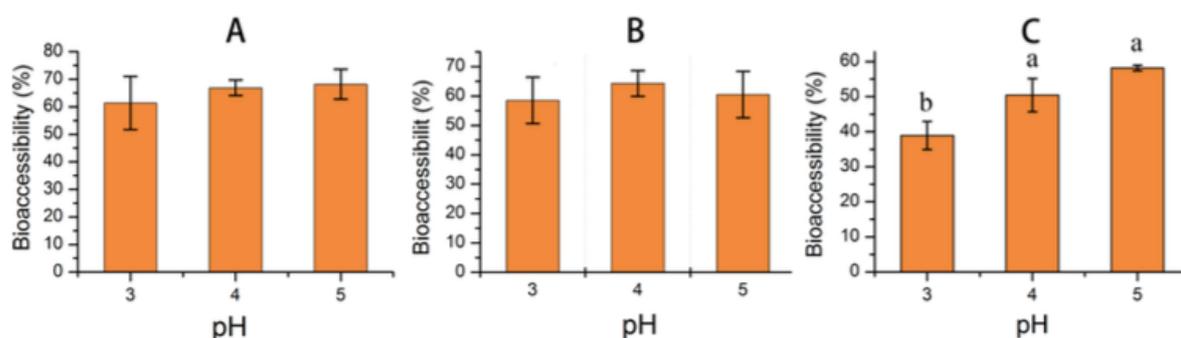


Figura 15: Efecto del pH gástrico en la recuperación de FX : PF (A), FCE (B) Y NLE (C) (Sun et al., 2018).

La FX se convierte a FXOL durante la digestión a través de un proceso de desacetilación. Se supone que, entre muchas enzimas, la lipasa pancreática tiene un papel principal en la desacetilación de FX a FXOL por su actividad esterasa. La lipasa pancreática es esencial en la digestión de lípidos y la bioaccesibilidad de los carotenoides al mantener la formación de micelas mixtas donde se incorporan los carotenoides. En un estudio, se quiso valorar la acción de las lipasas pancreáticas en la desacetilación de la FX. Se realizó una simulación de digestión intestinal *in vitro* de FX en primer lugar, con pancreatina (P), luego, con pancreatina y orlistat (inhibidor de las lipasas) (P+O) y, por último, sin pancreatina (P -) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Los resultados demostraron que después de 2 horas de digestión con pancreatina (P) el 53% de FX se

detectó como FXOL mientras que en el modelo de digestión con pancreatina y orlistat (P+O) y sin pancreatina, (P-), solo se detectó un 3% de FXOL. En base a esos resultados, se puede ver que la lipasa pancreática contribuye a la desacetilación de la FX en la digestión gastrointestinal simulada. También se puede observar (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) que el 50 -70% de la FX se recuperó en las micelas mixtas después de la digestión intestinal, lo que sugiere que parte de la FX no se metabolizó en FXOL y que esa parte perdida de FX puede atribuirse a su degradación mediante oxidación.

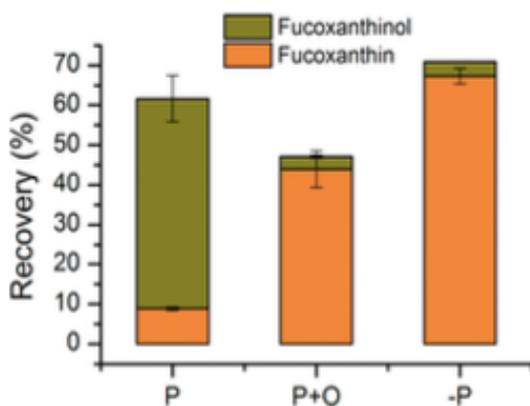


Figura 16 : Efecto de la lipasa pancreática sobre la desacetilación de la FX durante una simulación de digestión intestinal *in vitro* (Sun et al., 2018).

Para evaluar la degradación de FX por proceso oxidativo, se realizó una simulación de digestión en fase gástrica e intestinal para evaluar la bioaccessibilidad de la PF (FX pura) en presencia de 0.02 y 0.04% de BHT (butilhidroxitolueno), un agente antioxidante. Se puede observar (Figura 17) que la adición de BHT resultó en un aumento de la biodisponibilidad de FX a distinta concentración, de forma dosis dependiente, con una biodisponibilidad del 30% de FX a BHT 0.04%. Eso puede confirmar que la pérdida de la FX durante la digestión *in vivo* se puede atribuir a la oxidación.

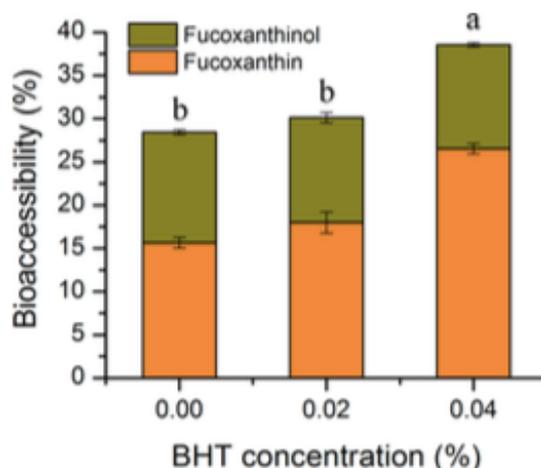


Figura 17 : Efecto de diferentes concentraciones de BHT sobre la bioaccessibilidad de la FX durante una simulación de digestión intestinal *in vitro* (Sun et al., 2018).

3. Nano- y micro-encapsulación de la FX:

Debido a la amplia gama de bioactividades que la FX demostró, se considera como un fármaco de origen marino muy prometedor. Sin embargo, su inestabilidad y baja biodisponibilidad cuando se administra por vía oral limita su aplicación en industria farmacéutica (Chen et al., 2022). A través de las investigaciones descritas hasta ahora, se ha podido valorar que, al ser inestable, la FX se degrada fácilmente en presencia de luz, calor y oxígeno adicionalmente, en el ambiente gástrico, por su sensibilidad al pH ácido. Además, se solubiliza y, por lo tanto, absorbe de forma difícil en el medio acuoso del intestino por su carácter liposoluble, llevando a una baja bioaccessibilidad. Recientemente, la técnica de encapsulación de compuestos bioactivos con el fin de mejorar su estabilidad, solubilidad y bioaccessibilidad fue impulsada por la aparición de la micro y nanotecnología (Wang et al., 2020). La encapsulación se refiere al empaquetamiento de partículas sólidas, líquidas o gaseosas, en un núcleo, envuelto por un material secundario, la matriz, de manera que ese núcleo permanece aislado del entorno próximo. Las nanocápsulas tienen un tamaño inferior a 100 nanómetros (nm) mientras que las microcápsulas son del orden del micrómetro (Augustin & Hemar, 2009). Últimamente, se revisaron los avances tecnológicos de la micro- y nano-encapsulación, con el fin de lograr su eficacia en procesos tumorales. Se pudo ver que distintos compuestos naturales como la proteína de suero, el almidón, la caseína, la zeína y gelatina en un sistema de administración (o vehículo de entrega) en forma de emulsión se podrían emplear como matriz para encapsular a la FX, permitiendo el aumento de su solubilidad, estabilidad y biodisponibilidad. También se identificaron a diferentes técnicas para la

encapsulación de la FX con el fin de aumentar su bioaccesibilidad, entre muchas, la liofilización, homogeneización a alta presión, sonicación, etc. (Wang et al., 2020) La selección del material constituyente de la envoltura de la capsula de FX es muy importante, siendo el elemento que forma una protección frente a su entorno circundante. En un estudio, se quiso investigar el efecto de diferentes matrices que envuelven a la FX, sobre su estabilidad y bioaccesibilidad. Por liofilización, se prepararon microcápsulas de FX extraída de *Undaria pinnatifida* en forma de emulsión. Primero, se estudió el efecto preventivo de cada biopolímero encapsulante de la FX frente al calor, en comparación con FX libre, es decir, sin encapsular. Las microcápsulas y FX libre fueron sometidas a una temperatura de 90°C durante 25 horas. Se puede apreciar, (Figura 18) que después de 24 horas de tratamiento térmico a 90°C, la FX sin encapsular se degradó hasta alcanzar casi una tasa residual nula. Sin embargo, se puede observar que las microcápsulas de FX compuestas por maltodextrina (MD), gelatina (GEL), proteína de suero (WPI) y goma arábica (GA) de forma global, alcanzaron una tasa residual entre un 50-65%, evitando la degradación de la FX. Podemos concluir que la MD, WPI, GA y GEL, son matrices que permiten disminuir la termolabilidad de la FX (Sun et al., 2018)

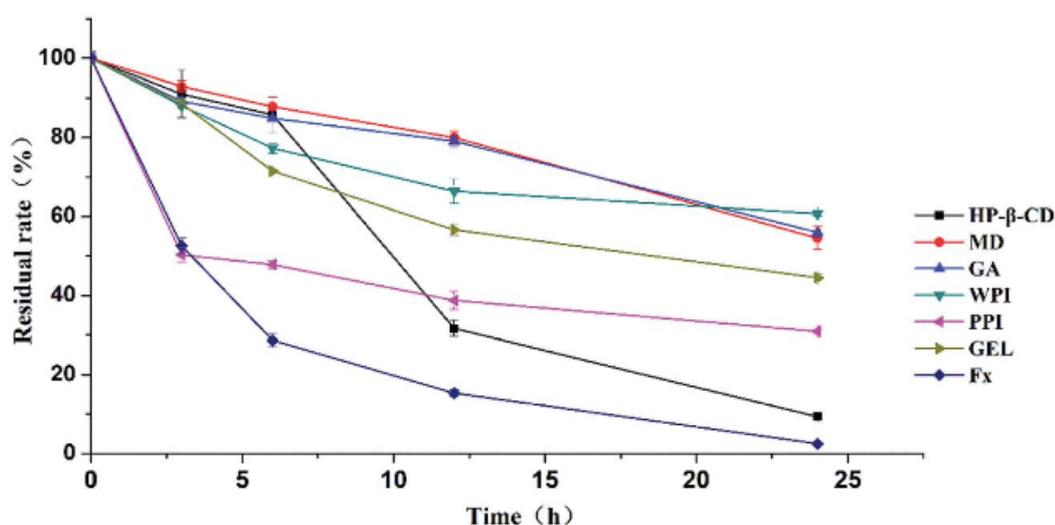


Figura 18 : La estabilidad térmica de las microcápsulas de fucoxantina encapsuladas con diferentes materiales de pared a 90 °C (Sun et al., 2018).

Como lo hemos podido comprobar varias veces a lo largo de este trabajo, la FX es inestable a pH ácido, por eso, en un proceso de digestión gástrica, debido a sus numerosos dobles enlaces en la cadena hidrocarbonada, puede sufrir unas reacciones de adición electrofílica en el medio ácido que degradan su estructura. Para comprobar la estabilidad y bioaccesibilidad de las microcápsulas de FX elaboradas con diferentes compuestos naturales, se llevó a cabo una simulación de digestión *in vitro*. La estabilidad se evaluó

mediante el análisis una solución en etapa gástrica de digestión. La bioaccessibilidad se valoró por centrifugación de la solución en fase de digestión a nivel de intestino delgado, obteniendo las micelas lipídicas para su posterior análisis. Los resultados demostraron que, de forma general, la FX es más estable envuelta en las microcápsulas. La FX libre encapsulada demostró una estabilidad alrededor del 60% mientras que la FX encapsulada en proteína de suero, goma arábiga y maltodextrina la supero, alcanzando 80% - 90% de estabilidad gástrica. En el segundo ensayo de digestión a nivel de intestino delgado, lugar donde se absorbe la FX en forma de FXOL, se calculó la cantidad de FX contenida en las micelas, lo que corresponde a la cantidad de FX liberada de la matriz alimenticia y disponible para la absorción y condiciona la bioaccessibilidad. La FX libre registro una bioaccessibilidad alrededor del 20% mientras que las microcápsulas de maltodextrina, proteína de suero y goma arábiga demostraron los mejores resultados de bioaccessibilidad de la FX frente a otros materiales encapsulantes, como la gelatina, por ejemplo, que al igual que la FX libre, no supero un 20%. Considerando los dos ensayos anteriores, podemos afirmar que la microencapsulación permite aumentar la estabilidad gástrica, tanto en medio ácido que en contacto con altas temperaturas y bioaccessibilidad de la FX y que el WPI, MD y GA son buenas matrices para su formulación en forma de capsula (Sun et al., 2018). En base a esos datos, se puede asegurar que existe una tecnología que permite superar los factores limitantes del uso de la FX y, asimismo, en forma de nano o microcápsula, puede ser aplicada en la prevención y tratamiento del cáncer de pulmón.

3. Sostenibilidad:

El cáncer es una de las principales preocupaciones de los sistemas sanitarios a nivel mundial, en especial, el CP, el primero causante de muerte. Hoy en día, existen diferentes posibilidades terapéuticas para enfrentarnos a ese tipo de cáncer, incluyendo principalmente a la cirugía, radioterapia, quimioterapia para el tratamiento del CPCNP (José Miguel, 2013). Esas terapias conllevan a numerosos efectos secundarios, cuando alcanzan tejidos u órganos sanos, como pueden ser la alopecia, anemia, diarrea, náuseas, vómitos, fatiga, cambios en la piel y unas, etc... Estudios previos tanto *in vitro* que *in vivo* en modelos animales de experimentación han demostrado que su exposición a FX y FXOL no supone efectos adversos (Zarekarizi et al., 2019), lo que permitió además descubrir que el uso de FX en animales y humanos resulta ser segura (Wang et al., 2020). La FDA (Food and Drug Administration) autorizó el consumo de 3mg diarios de FX

extraída de *Phaeodactylum tricornutum* sin límite de duración de uso (Bae et al., 2020). Lo siguiente sugiere que el desarrollo de la fitoterapia sería una alternativa para mejorar ese problema de salud global. La suplementación con FX permite prevenir y tratar el CP, reduciendo los efectos adversos existentes de las terapias antineoplásicas actuales además de mejorar la salud tanto física, mental y emocional del paciente.

Otro aspecto relevante de esa sustancia es su amplio catálogo de bioactividades, que hace que su uso no se restrinja a una sola patología, sino que engloba a una serie de procesos patológicos. Asimismo, su explotación como compuesto natural es justificada, además de que su coste económico no superara nunca las terapias anticancerígenas actuales, lo que también permite reducir el coste global encaminado al tratamiento de CP.

Debido al alto potencial terapéutico de la FX y de los carotenoides xantófilos en general, la comercialización de compuestos derivados de algas marinas ha crecido rápidamente en los últimos años y seguirá creciendo. La vía de obtención preferida de la FX es por extracción a partir de algas, debido al coste elevado de su producción por síntesis química. Sin embargo, su cultivo y recolección se ven afectados por factores ambientales (contaminación y cambio climático) además de suponer impactos negativos sobre el ecosistema natural, en el momento en que su demanda supera las fuentes naturales existentes del producto. Para ello, se han desarrollado nuevas áreas de investigación para su obtención sostenible, como la biotecnología marina o cultivo in vitro, que permitiría enfrentarse a ese crecimiento del mercado de productos de origen marino, sin tener impactos ecológicos (Bae et al., 2020).

CONCLUSIONES:

La FX, un pigmento xantófila de origen marino se aplica en la prevención y tratamiento del CP. La revisión bibliográfica realizada al respecto puede concluirse de la siguiente manera:

1. La FX, por su efecto citotóxico es capaz de reducir la viabilidad de células tumorales de CP inhibiendo la proliferación celular (vía el ciclo celular) e induciendo la muerte celular (vía la apoptosis). Esos efectos antitumorales son posibles por un mecanismo de modificación en la expresión de proteínas reguladoras o de su actividad. Además, la FX inhibe la metástasis y, por lo tanto, la diseminación a otros órganos del CP por impedimento de la migración e invasión de células tumorales. En nódulos metastásicos implantados, también reduce su número, densidad, peso y volumen.
2. La estructura química de la FX y sus metabolitos (FX y AMA), los responsables de sus funciones biológicas, biodisponibilidad y bioaccesibilidad se puede ver alterada en etapas de procesamiento, almacenamiento y digestión gastrointestinal, lo que disminuye su eficacia terapéutica.
3. Los últimos avances tecnológicos han dado la luz a la nano- y micro-encapsulación, que permiten lograr la eficacia esperada de la FX en procesos tumorales. En especial, le ofrece ser administrada por vía oral en forma de capsula, como núcleo envuelto en un material secundario, una matriz. Esa tecnología permite proteger a la FX de su entorno, bien gastrointestinal o circundante, permitiendo asimismo aumentar su estabilidad, biodisponibilidad y bioaccesibilidad, y, por lo tanto, su eficacia terapéutica.

BIBLIOGRAFÍA:

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *An Overview of the Cell Cycle*.
- Ansari, J., Shackelford, R. E., & El-Osta, H. (2016). Epigenetics in non-small cell lung cancer: From basics to therapeutics. *Translational Lung Cancer Research*, 5(2), 155–171.
- Asai, A., Yonekura, L., & Nagao, A. (2008). Low bioavailability of dietary epoxyxanthophylls in humans. *British Journal of Nutrition*, 100(2), 273–277.
- Augustin, M. A., & Hemar, Y. (2009). Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, 38(4), 902–912.
- Bae, M., Kim, M. B., Park, Y. K., & Lee, J. Y. (2020). Health benefits of fucoxanthin in the prevention of chronic diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(11).
- Beppu, F., Niwano, Y., Tsukui, T., Hosokawa, M., & Miyashita, K. (2009). Single and repeated oral dose toxicity study of fucoxanthin (FX), a marine carotenoid, in mice. *The Journal of Toxicological Sciences*, 34(5), 501–510.
- Candal-Pedreira, C., Ruano-Ravina, A., Carcereny, E., Rodríguez-Abreu, D., Guirado-Risueño, M., López-Castro, R., Massutí, B., Blasco, A., Ortega, A. L., & Provencio, M. (2022). [Representativeness of the Spanish Thoracic Tumour Registry. Comparison of sociodemographic data with other national registries]. *Gaceta Sanitaria*.
- Chen, Y., He, N., Yang, T., Cai, S., Zhang, Y., Lin, J., Huang, M., Chen, W., Zhang, Y., & Hong, Z. (2022). Fucoxanthin Loaded in Palm Stearin- and Cholesterol-Based Solid Lipid Nanoparticle-Microcapsules, with Improved Stability and Bioavailability In Vivo. *Marine Drugs*, 20(4), 237.
- Cordenonsi, L. M., Santer, A., Martins Sponchiado, R., Steppe, M., Raffin, R. P., Eva, E., & Schapoval, S. (2017). Characterization and Analysis of Fucoxanthin and its Isomers. *J Pharm Sci Bioscientific Res*. 2017, 7(5), 322–334.
- da Cunha Santos, G., Shepherd, F. A., & Tsao, M. S. (2011). EGFR Mutations and Lung Cancer. [Http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev-Pathol-011110-130206](http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev-Pathol-011110-130206), 6, 49–69.
- dela Cruz, C. S., Tanoue, L. T., & Matthay, R. A. (2011). Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med*, 32(4).
- Deshpande, R., Chandra, M., & Rauthan, A. (2022). *Evolving trends in lung cancer: Epidemiology, diagnosis, and management*.
- Eymin, B., & Gazeri, S. (2010). *Cell Adhesion & Migration Role of cell cycle regulators in lung carcinogenesis*.
- Feria Díaz, G. E., González Benítez, S. N., & Miguel Cruz, M. A. (2021). Genes involucrados en el cáncer pulmonar. *Rev. Cuba. Invest. Bioméd*, e1189–e1189.
- Hashimoto, T., Ozaki, Y., Mizuno, M., Yoshida, M., Nishitani, Y., Azuma, T., Komoto, A., Maoka, T., Tanino, Y., & Kanazawa, K. (2012). Pharmacokinetics of fucoxanthinol in human plasma after the oral administration of kombu extract. *British Journal of Nutrition*, 107(11), 1566–1569.
- Hii, S.-L., Choong, P.-Y., Woo, K.-K., & Wong, C.-L. (2010). Stability Studies of Fucoxanthin From Sargassum Binderi. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(10), 4580–4584.
- Jin, B., Li, Y., & Robertson, K. D. (2011). DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy? *Genes & Cancer*, 2(6), 607.
- José Miguel, C. R. (2013). Estado actual del tratamiento del cáncer pulmonar. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(4), 611–625.

- Kawee-ai, A., Kuntiya, A., & Kim, S. M. (2013). Anticholinesterase and antioxidant activities of fucoxanthin purified from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Natural Product Communications*, 8(10), 1381–1386.
- Kotake-Nara, E., & Nagao, A. (2011). Absorption and metabolism of xanthophylls. *Marine Drugs*, 9(6), 1024–1037.
- Langevin, S. M., Kratzke, R. A., & Kelsey, K. T. (2014). *Epigenetics of Lung Cancer*.
- Lourenço-Lopes, C., Fraga-Corral, M., Jimenez-Lopez, C., Carpena, M., Pereira, A. G., Garcia-Oliveira, P., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2021). Biological action mechanisms of fucoxanthin extracted from algae for application in food and cosmetic industries. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 117, pp. 163–181).
- Maeda, H., Tsukui, T., Sashima Phd, T., Hosokawa, M., & Miyashita, K. (2008). Seaweed carotenoid, fucoxanthin, as a multi-functional nutrient. *Asia Pac J Clin Nutr*, 17(S1), 196–199.
- Martin, L. J. (2015). Fucoxanthin and Its Metabolite Fucoxanthinol in Cancer Prevention and Treatment. *Marine Drugs*, 13(8), 4784.
- Martin, S., & Mulrooney, T. J. (n.d.). *Biology of Lung Cancer*.
- Mei, C. H., Zhou, S. C., Zhu, L., Ming, J. X., Zeng, F. D., & Xu, R. (2017). Antitumor Effects of Laminaria Extract Fucoxanthin on Lung Cancer. *Marine Drugs 2017, Vol. 15, Page 39, 15(2)*, 39.
- Ming, J. X., Wang, Z. C., Huang, Y., Ohishi, H., Wu, R. J., Shao, Y., Wang, H., Qin, M. Y., Wu, Z. L., Li, Y. Y., Chang Zhou, S., Chen, H., Liu, H., & Xu, R. (2021). Fucoxanthin extracted from Laminaria Japonica inhibits metastasis and enhances the sensitivity of lung cancer to Gefitinib. *Journal of Ethnopharmacology*, 265.
- Mogi, A., & Kuwano, H. (2011). TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011.
- Pajot, A., Hao Huynh, G., Picot, L., Marchal, L., & Nicolau, E. (2022). Fucoxanthin from Algae to Human, an Extraordinary Bioresource: Insights and Advances in up and Downstream Processes. *Marine Drugs*, 20(4), 222.
- Rengarajan, T., Rajendran, P., Nandakumar, N., Balasubramanian, M. P., & Nishigaki, I. (2013). Cancer Preventive Efficacy of Marine Carotenoid Fucoxanthin: Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Nutrients*, 5(12), 4978.
- Rojas Moreno, A. P., Bruges, R. E., Cañas Arboleda, A., & Jaramillo García, L. F. (2017). Regulación epigenética en cáncer de pulmón: implicaciones para el clínico. *Universitas Médica*, 57(3), 332–347.
- Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S., & Longacre, M. (2013). Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview. *OPEN ACCESS Int. J. Mol. Sci*, 14, 14.
- Sun, X., Xu, Y., Zhao, L., Yan, H., Wang, S., & Wang, D. (2018). The stability and bioaccessibility of fucoxanthin in spray-dried microcapsules based on various biopolymers. *RSC Advances*, 8(61), 35139–35149.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249.
- Tume-Farfán, L. F. (2014). Las alteraciones epigenéticas en la progresión del cáncer. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 13(4), 236–243.
- Wang, C., Chen, X., Nakamura, Y., Yu, C., & Qi, H. (2020). Fucoxanthin activities motivate its nano/micro-encapsulation for food or nutraceutical application: A

- review. In *Food and Function* (Vol. 11, Issue 11, pp. 9338–9358). Royal Society of Chemistry.
- Zarekarizi, A., Hoffmann, L., & Burritt, D. (2019). Approaches for the sustainable production of fucoxanthin, a xanthophyll with potential health benefits. *Journal of Applied Phycology*, *31*(1), 281–299.
- Zhao, D., Kim, S. M., Pan, C. H., & Chung, D. (2014). Effects of heating, aerial exposure and illumination on stability of fucoxanthin in canola oil. *Food Chemistry*, *145*, 505–513.

ANEXOS:

Índice de figuras:

Figura 1 : estructura química de la FX (Zarekarizi et al., 2019).	7
Figura 2 : Efectos de la FX en la proliferación de células humanas de CPCNP (Mei et al., 2017).....	11
Figura 3: Efectos de la FX combinada con el fármaco Gefinitib sobre las células PC9 y PC9/G de CP humano (Ming et al., 2021).....	12
Figura 4 : Efectos de la FX en la apoptosis de células A549 y H1299 (Mei et al., 2017).	13
Figura 5 : La FX inhibe el ciclo celular y induce apoptosis regulando p21 ^{waf1/cip1} , p53, Bcl-2, PUMA y Fas (Mei et al., 2017).	14
Figura 6 : Efectos de la FX sobre la actividad de la caspasa-3 y caspasa-8 (Mei et al., 2017).....	15
Figura 7 : Efectos de la FX sobre la migración e invasión en células de CP (Ming et al., 2021).....	15
Figura 8 : Efecto terapéutico de la FX en un experimento de metástasis de pulmón (Ming et al., 2021).	16
Figura 9 : La FX inhibe el crecimiento del xenoinjerto tumoral A549 in vivo (Mei et al., 2017).....	17
Figura 10 : Efectos de la FX en la expresión de las proteínas Bcl-2 y Caspasa-3 y tasas de apoptosis en tumores de xenoinjerto A549 (Mei et al., 2017).....	18
Figura 11 : Estabilidad de la FX a diferente pH (A), temperatura (B) y periodos de almacenamiento (C)(Kawee-ai et al., 2013).....	19
Figura 12: Estabilidad de la FX tratada con acido ascórbico y expuesta a la luz (Hii et al., 2010).....	20
Figura 13 : Cromatograma HPLC a 450 nm y espectros UV-VIS correspondientes obtenidos de aceite de canola que contiene fucoxantina purificada. Picos: 1, all trans; 2, 13-cis; 3, 13' -cis; 4, 9' -cis (Zhao et al., 2014).	21
Figura 14 : Perfil del FXOL a lo largo del tiempo después de una dosis de FX (Hashimoto et al., 2012).	23
Figura 15 : Efecto del pH gástrico en la recuperación de FX : PF (A), FCE (B) Y NLE (C) (Sun et al., 2018).	¡Error! Marcador no definido.

Figura 16 : Efecto de la lipasa pancreática sobre la desacetilación de la FX durante una simulación de digestión intestinal in vitro (Sun et al., 2018). **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 17 : Efecto de diferentes concentraciones de BHT sobre la bioaccessibilidad de la FX durante una simulación de digestión intestinal in vitro (Sun et al., 2018)..... 26

Figura 18 : La estabilidad térmica de las microcápsulas de fucoxantina encapsuladas con diferentes materiales de pared a 90 °C (Sun et al., 2018)..... 27

Tabla de abreviaturas:

AMA: amarouciaxantina A

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

CDK (quinasas dependientes de ciclina, en inglés cyclin-dependent kinases)

CDKI (inhibidores kinasas ciclín-dependientes, en inglés cyclin-dependent kinases inhibitors)

CP: cáncer de pulmón

CPCNP: cáncer de pulmón de células no pequeñas

CPCP: cáncer de pulmón de células pequeñas

DNMT: ADN-metiltransferasa

EGFR: receptor de crecimiento epidérmico

FX: fucoxantina

FXOL: fucoxantínol

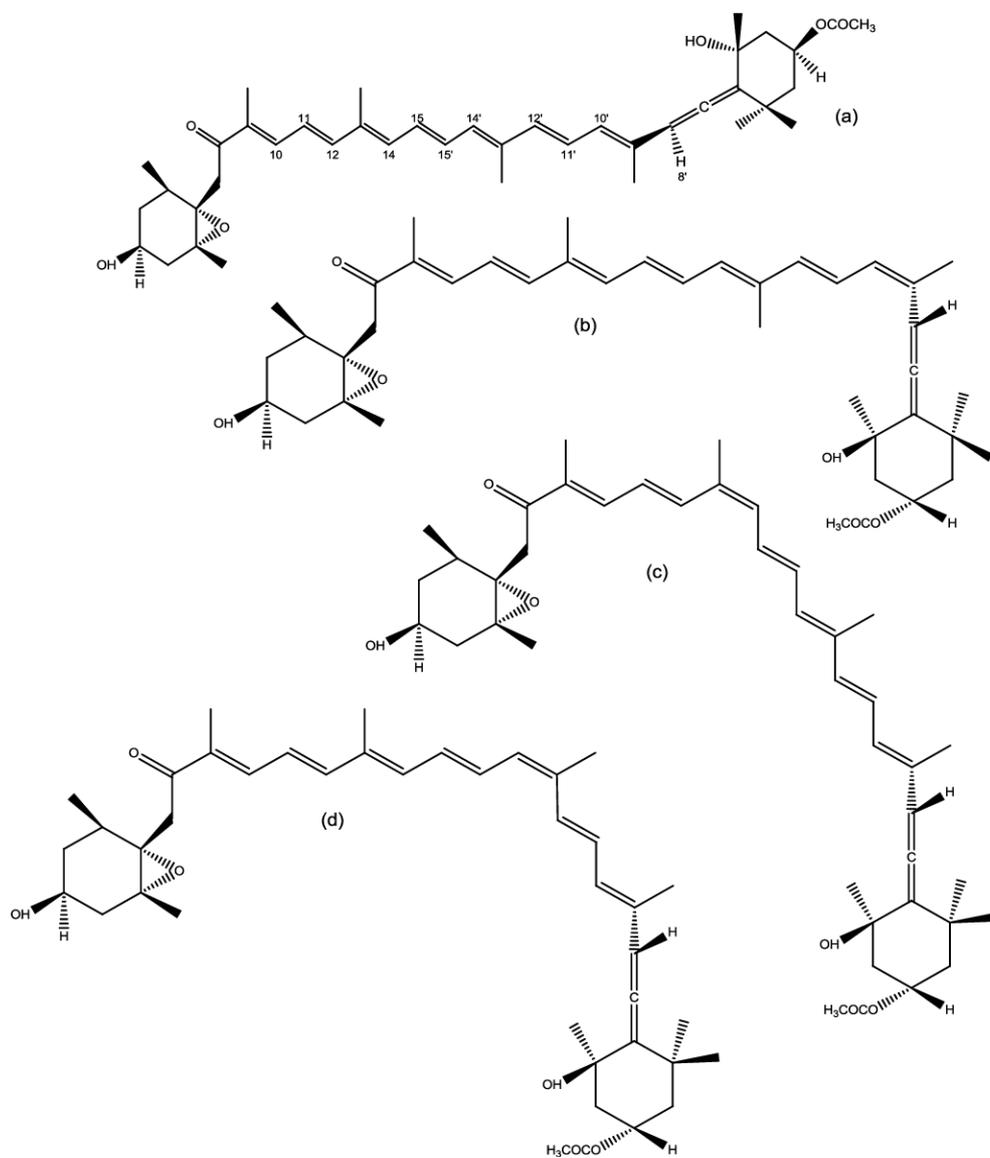
TTR: Registro de Tumores Torácicos

TP53: gen de la proteína tumoral p53

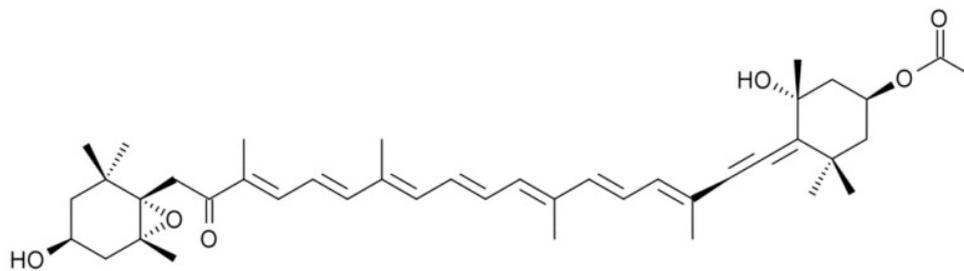
Anexo 1: Nuevos casos y muertes por 36 cánceres y todos los cánceres combinados en 2020 (Sung et al., 2021).

CANCER SITE	NO. OF NEW CASES (% OF ALL SITES)		NO. OF NEW DEATHS (% OF ALL SITES)	
Female breast	2,261,419	(11.7)	684,996	(6.9)
Lung	2,206,771	(11.4)	1,796,144	(18.0)
Prostate	1,414,259	(7.3)	375,304	(3.8)
Nonmelanoma of skin ^a	1,198,073	(6.2)	63,731	(0.6)
Colon	1,148,515	(6.0)	576,858	(5.8)
Stomach	1,089,103	(5.6)	768,793	(7.7)
Liver	905,677	(4.7)	830,180	(8.3)
Rectum	732,210	(3.8)	339,022	(3.4)
Cervix uteri	604,127	(3.1)	341,831	(3.4)
Esophagus	604,100	(3.1)	544,076	(5.5)
Thyroid	586,202	(3.0)	43,646	(0.4)
Bladder	573,278	(3.0)	212,536	(2.1)
Non-Hodgkin lymphoma	544,352	(2.8)	259,793	(2.6)
Pancreas	495,773	(2.6)	466,003	(4.7)
Leukemia	474,519	(2.5)	311,594	(3.1)
Kidney	431,288	(2.2)	179,368	(1.8)
Corpus uteri	417,367	(2.2)	97,370	(1.0)
Lip, oral cavity	377,713	(2.0)	177,757	(1.8)
Melanoma of skin	324,635	(1.7)	57,043	(0.6)
Ovary	313,959	(1.6)	207,252	(2.1)
Brain, nervous system	308,102	(1.6)	251,329	(2.5)
Larynx	184,615	(1.0)	99,840	(1.0)
Multiple myeloma	176,404	(0.9)	117,077	(1.2)
Nasopharynx	133,354	(0.7)	80,008	(0.8)
Gallbladder	115,949	(0.6)	84,695	(0.9)
Oropharynx	98,412	(0.5)	48,143	(0.5)
Hypopharynx	84,254	(0.4)	38,599	(0.4)
Hodgkin lymphoma	83,087	(0.4)	23,376	(0.2)
Testis	74,458	(0.4)	9334	(0.1)
Salivary glands	53,583	(0.3)	22,778	(0.2)
Anus	50,865	(0.3)	19,293	(0.2)
Vulva	45,240	(0.2)	17,427	(0.2)
Penis	36,068	(0.2)	13,211	(0.1)
Kaposi sarcoma	34,270	(0.2)	15,086	(0.2)
Mesothelioma	30,870	(0.2)	26,278	(0.3)
Vagina	17,908	(0.1)	7995	(0.1)
All sites excluding nonmelanoma skin	18,094,716		9,894,402	
All sites	19,292,789		9,958,133	

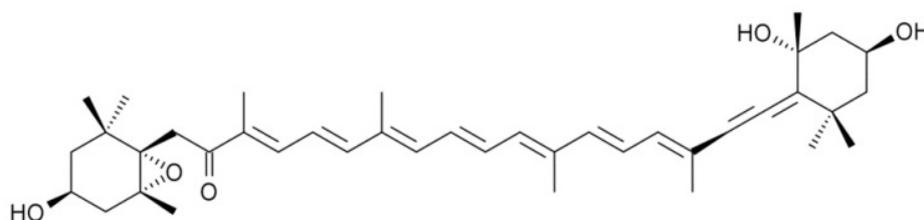
Anexo 2: Estructura química de de (a) fucoxantina all-trans (a), 9'-cis fucoxantina (b), 13-cis fucoxantina (c) y 13'-cis fucoxantina (d) (Cordenonsi et al., 2017).



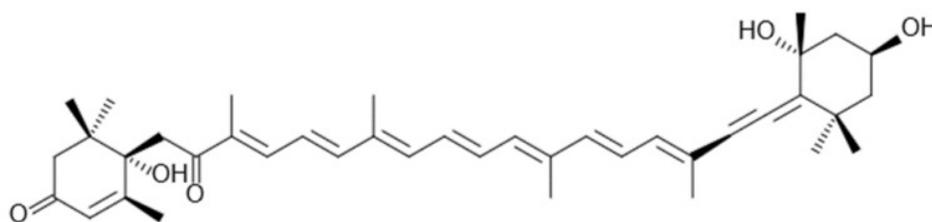
Anexo 3: Estructuras químicas de la Fucoxantina (FX) y de sus metabolitos Fucoxantanol (FXOL) y Amarouciaxantina A (AMA) (L. J. Martin, 2015).



Fucoxanthin



Fucoxantanol



Amarouciaxanthin A

Anexo 4: Biotransformación de fucoxantina. La Fucoxantina (FX) se hidroliza a Fucoxantanol en el tracto gastrointestinal y luego se convierte en Amarouciaxantina A (AMA) en el hígado (Bae et al., 2020).

