



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos

Programa de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Especialidad en Conservación y Procesamiento de Productos Marinos

"Purificación y Caracterización Parcial de Compuestos con Actividad Antimutagénica y Antiproliferativa de Extractos Lipídicos de Camarón (*Litopenaeus vannamei*) y Pulpo (*Paraoctopus limaculatus*)".

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Carolina Moreno Félix

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

DEL AUTOR

Este trabajo se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del Grado de Maestro en Ciencias y Tecnología de Alimentos con especialidad en conservación y Procesamiento de productos Marinos, de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca del departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, para ponerlo a disposición de los interesados; se puede obtener permiso para reproducir y/o referirse a este manuscrito, en forma parcial o total a través del jefe del Departamento, cuando se considere que dicho trabajo apoye al avance académico.

En cualquier situación, se debe tener permiso directamente del autor.

ATENTAMENTE

Carolina Moreno Félix

I.Q. Carolina Moreno Félix

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

Este trabajo se aprobó en la fecha que se señala abajo



Dr. Armando Burgos Hernández

18 de Diciembre del 2008.

Fecha

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora y al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, por las facilidades otorgadas para la realización de mis estudios de posgrado y tesis de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios.

A mi director de tesis, Dr. Armando Burgos Hernández, por permitirme estar en este proyecto de tesis, así como todo su apoyo brindado y depositar su confianza en mí.

A mi comité de tesis, Dra. Maribel Plascencia Jatomea, a la Dra. María Lourdes Aldana Madrid y al Dr. Carlos Velázquez Contreras por el tiempo y su valiosa colaboración para el mejoramiento de este trabajo.

Al Dr. Mario Onofre Cortez Rocha, al Dr. Francisco Javier Cinco, a la M. C. Carina Rosas Burgos, a la Dra. Josafat Marina Ezquerra Brauer, a la Dra. Ofelia Rouzaud Sáñez, al M.C. Guillermo Rodríguez Olibarría, al Dr. José Luis Cárdenas López y a la M.C. Norma Violeta Parra Vergara por el apoyo brindado en este trabajo.

Al Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, especialmente a la Dra. Lorena Machi Lara por su colaboración en este trabajo.

DEDICATORIAS

A Dios por permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi vida y lograr otra meta más en mi carrera.

A los seres que más amo en este mundo: mi hijo y mi esposo, por ser la fuente de inspiración y motivación para superarme cada día más y así poder luchar para que la vida nos depara un futuro mejor. **LOS AMO.**

A mis padres a quienes agradezco su amor y comprensión. En todo momento los llevo conmigo.

A mis hermanos por la compañía y el apoyo que me brindaron. Sé que cuento con ellos siempre.

A mis maestros y compañeros por su tiempo y conocimiento compartido.

A mis amigos por darme los mejores momentos de mi vida y apoyarme siempre.

A todas las personas que se cruzaron en este camino y que me dieron palabras de aliento y apoyo.

Al final, lo que importa no son los años de vida, sino la vida de los años.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO	v
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xiii
OBJETIVOS	xv
HIPÓTESIS	xvi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
Producción pesquera en México	4
La pesca en Sonora	5
Relación entre dieta y cáncer	6
Compuestos quimioprotectores en alimentos	8
Generalidades	8
Tipos de compuestos quimioprotectores	9
Fitoquímicos	9
Antioxidantes	11
Compuestos de origen marino	12
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Reactivos y materia prima	23

Obtención y manejo de la materia prima	23
Obtención de extractos para la determinación del potencial antimutagénico	24
Características específicas de las cepas utilizadas en la prueba de antimutagenicidad en <i>Salmonella</i>	25
Confirmación de los genotipos de las cepas utilizadas para la prueba de antimutagenicidad	25
Prueba de antimutagenicidad en <i>Salmonella</i>	27
Determinación del potencial antimutagénico en camarón y pulpo fresco	27
Aislamiento de los factores antimutagénicos	29
Líneas celulares	30
Evaluación de la proliferación celular por el método del MTT	30
Evaluación de la actividad antiproliferativa de extractos lipídicos aislados de organismos marinos	32
Técnicas de caracterización	32
Análisis estadístico	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
Potencial antimutagénico de camarón y pulpo	35
Aislamiento de factores antimutagénicos	35
Actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares M12.A ^k y L-929 de origen murino	57
Aislamiento de factores antiproliferativos	62

Caracterización química de compuestos antimutagénicos y antiproliferativos utilizando espectroscopía de ultravioleta, infrarrojo y resonancia magnética nuclear	80
CONCLUSIONES	91
RECOMENDACIONES	93
ANEXOS	94
BIBLIOGRAFÍA	106

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Compuestos antitumorales obtenidos a partir de productos de origen marino	22
2	Fraccionamiento del extracto de camarón (<i>Litopenaeus vannamei</i>), utilizando tres procesos seriados de cromatografía en capa fina (CCF)	37
3	Fraccionamiento del extracto de pulpo (<i>Paraoctopus limaculatus</i>), utilizando tres procesos seriados de cromatografía en capa fina (CCF)	38
4	Fraccionamiento de los extractos lipídicos de camarón y pulpo, utilizando cuatro procesos seriados de cromatografía en capa fina (CCF)	39
5	Fraccionamiento del extracto de camarón, utilizando tres procesos seriados de cromatografía de capa fina (CCF), para el análisis de la actividad antiproliferativa	60
6	Fraccionamiento del extracto de pulpo, utilizando tres procesos seriados de cromatografía de capa fina (CCF), para el análisis de la actividad antiproliferativa	61
7	Fraccionamiento de los extractos lipídicos de camarón y pulpo, utilizando cuatro procesos seriados de cromatografías en capa fina (CCF), para el análisis de la actividad antiproliferativa	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Prueba de mutagenicidad en <i>Salmonella</i>	28
2	Biotransformación del MTT a formazán	31
3	Potencial antimutagénico de camarón contaminado con 500 ng de aflatoxina B ₁ (AFB ₁) utilizando <i>Salmonella</i> TA98 con activación metabólica S9	41
4	Potencial antimutagénico de camarón contaminado con 500 ng de aflatoxina B ₁ (AFB ₁) utilizando <i>Salmonella</i> TA100 con activación metabólica S9	42
5	Potencial antimutagénico de camarón contaminado con 500 ng de aflatoxina B ₁ (AFB ₁) utilizando <i>Salmonella</i> TA98 con activación metabólica S9	43
6	Potencial antimutagénico de camarón contaminado con 500 ng de aflatoxina B ₁ (AFB ₁) utilizando <i>Salmonella</i> TA100 con activación metabólica S9	44
7	Potencial antimutagénico de camarón contaminado con 500 ng de aflatoxina B ₁ (AFB ₁) utilizando <i>Salmonella</i> TA98 con activación metabólica S9	46
8	Potencial antimutagénico de camarón contaminado con 500 ng de aflatoxina B ₁ (AFB ₁) utilizando <i>Salmonella</i> TA100 con activación metabólica S9	47
9	Potencial antimutagénico de pulpo contaminado con 500 ng de aflatoxina B ₁ (AFB ₁) utilizando <i>Salmonella</i> TA98 con activación metabólica S9	49
10	Potencial antimutagénico de pulpo contaminado con 500 ng de aflatoxina B ₁ (AFB ₁) utilizando <i>Salmonella</i> TA100 con activación metabólica S9	50

11	Potencial antimutagénico de pulpo contaminado con 500 ng de aflatoxina B ₁ (AFB ₁) utilizando <i>Salmonella</i> TA98 con activación metabólica S9	53
12	Potencial antimutagénico de pulpo contaminado con 500 ng de aflatoxina B ₁ (AFB ₁) utilizando <i>Salmonella</i> TA100 con activación metabólica S9	54
13	Potencial antimutagénico de pulpo contaminado con 500 ng de aflatoxina B ₁ (AFB ₁) utilizando <i>Salmonella</i> TA98 con activación metabólica S9	55
14	Potencial antimutagénico de pulpo contaminado con 500 ng de aflatoxina B ₁ (AFB ₁) utilizando <i>Salmonella</i> TA100 con activación metabólica S9	56
15	Actividad antiproliferativa de la región obtenida de la cromatografía en capa fina tres (CCF3) de camarón sobre la línea celular M12.A ^K	59
16	Actividad antiproliferativa de la región obtenida de la cromatografía en capa fina tres (CCF3) de pulpo sobre la línea celular M12.A ^K	60
17	Actividad antiproliferativa de las regiones obtenidas de la cromatografía en capa fina cuatro (CCF4) de camarón sobre la línea celular M12.A ^K	66
18	Actividad antiproliferativa de la región obtenida de la cromatografía en capa fina cuatro (CCF4) de camarón sobre la línea celular L-929	67
19	Actividad antiproliferativa de las regiones obtenidas de la cromatografía en capa fina cuatro (CCF4) de pulpo sobre la línea celular M12.A ^K	68
20	Actividad antiproliferativa de la región obtenida de la cromatografía en capa fina cuatro (CCF4) de pulpo sobre la línea celular L-929	70
21	Actividad antiproliferativa de las regiones obtenidas de la	71

	cromatografía en capa fina cinco (CCF5) de camarón sobre la línea celular M12.A ^k	
22	Actividad antiproliferativa de las regiones obtenidas de la cromatografía en capa fina cinco (CCF5) de pulpo sobre la línea celular M12.A ^k	71
23	Actividad antiproliferativa de la región obtenida de la cromatografía en capa fina cinco (CCF5) de camarón sobre la línea celular L-929	73
24	Actividad antiproliferativa de la región obtenida de la cromatografía en capa fina cinco (CCF5) de pulpo sobre la línea celular L-929	74
25	Actividad antiproliferativa de las regiones obtenidas de la cromatografía en capa fina seis (CCF6) de camarón sobre la línea celular M12.A ^k	75
26	Actividad antiproliferativa de las regiones obtenidas de la cromatografía en capa fina seis (CCF6) de pulpo sobre la línea celular M12.A ^k	76
27	Actividad antiproliferativa de la región obtenida de la cromatografía en capa fina seis (CCF6) de camarón sobre la línea celular L-929	78
28	Actividad antiproliferativa de la región obtenida de la cromatografía en capa fina seis (CCF6) de pulpo sobre la línea celular L-929	79
29	Espectro de RMN ¹ H de la muestra 1 (Extracto Lipídico de Camarón antimutagénico), utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia.	82
30	Espectro de RMN ¹ H de la muestra 2 (Extracto Lipídico de Pulpo antimutagénico), utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia.	83
31	Espectro de RMN ¹ H de la muestra 3 (Extracto Lipídico de Camarón antiproliferativo), utilizando tetrametilsilano (TMS)	84

	como referencia.	
32	Espectro de RMN ¹ H de la muestra 4 (Extracto Lipídico de Pulpo antiproliferativo), utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia.	85
33	Espectro de Infrarrojo de la muestra 1 (Extracto Lipídico de Camarón antimutagénico).	86
34	Espectro de Infrarrojo de la muestra 2 (Extracto Lipídico de Pulpo antimutagénico).	87
35	Espectro de Infrarrojo de la muestra 3 (Extracto Lipídico de Camarón antiproliferativo).	88
36	Espectro de Infrarrojo de la muestra 4 (Extracto Lipídico de Pulpo antiproliferativo).	89
37	Espectro de Ultravioleta-Visible de las cuatro muestras	90

RESUMEN

El cáncer constituye un verdadero problema de salud a nivel mundial (OMS, 2003). En México, esta enfermedad sigue situada como la segunda causa de muerte (OPS, 2000). Por otro lado, un importante número de estudios indican que algunos componentes alimentarios parecen ayudar a prevenir el cáncer y, a veces facilitan que el cuerpo lo combata si ya se padece la enfermedad. Estos elementos son los conocidos como quimioprotectores, encontrados en una gran variedad de alimentos, entre ellos los ácidos grasos omega-3 obtenidos de organismos marinos. Por lo anterior, se consideró purificar los extractos obtenidos a partir de camarón y pulpo con actividad antimutagénica y antiproliferativa, utilizando cromatografía en capa fina y caracterizar parcialmente los compuestos con dicha actividad por medio de espectroscopía de UV-VIS, FT-IR y RMN. En la determinación de la actividad antimutagénica por medio de la prueba de Ames se incluyeron los extractos lipídicos de camarón y pulpo, controles positivos y las revertantes espontáneas, utilizando cepas de *Salmonella* TA98 y TA100. Así mismo, en la determinación de la actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares cancerígenas de ratón: M12.A^k (linfoma de células B) y la L-929 (tejido conectivo) de extractos obtenidos a partir de camarón y pulpo, se utilizó el método colorimétrico de reducción de la sal de tetrazolium MTT para evaluar la proliferación de las líneas celulares. Con relación a los resultados del potencial antimutagénico, se identificaron dos compuestos o grupo de ellos, capaces de proteger a *Salmonella thiphymiurium* TA98 y TA 100 cuando son expuestas a aflatoxina B1, tanto en los extractos lipídicos de camarón como en pulpo y con

respecto al potencial antiproliferativo se identificaron dos compuestos o grupo de ellos, que son potencialmente selectivos para la línea celular cancerígena M12. A^k y no afectan la línea normal murina L-929 en dichos extractos. Con base a los resultados obtenidos de los espectros se concluye que los compuestos responsables de la actividad biológica pudieran tener una estructura similar a la de los ácidos grasos omega 3, lo cual es de importancia estudiar los mecanismos de acción de estos compuestos con actividad biológica.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Purificación y caracterización parcial de compuestos con actividad antimutagénica y antiproliferativa, de extractos lipídicos de camarón y pulpo.

Objetivos Específicos

- Purificar los extractos con actividad antimutagénica y antiproliferativa, utilizando cromatografía en capa fina.
- Caracterizar parcialmente los compuestos con actividad antimutagénica y antiproliferativa por medio de espectrometría de ultravioleta, infrarrojo y resonancia magnética nuclear.

HIPÓTESIS

Los compuestos antimutagénicos y antiproliferativos presentes en los extractos de camarón y pulpo poseen estructuras similares a compuestos tales como los ácidos grasos ω -3.

INTRODUCCION

El cáncer constituye uno de los mayores problemas que enfrenta el sector de salud pública en países desarrollados, particularmente en Estados Unidos de América (EUA), donde actualmente cada cuatro muertes se debe a esta enfermedad (OMS, 2003). En México también constituye un verdadero problema; en 1999, el cáncer constituyó la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares (OPS, 2000). A pesar de los avances en su prevención, protección y diagnóstico temprano, su incidencia continúa en ascenso. En la actualidad hay millones de personas que viven con cáncer o que han padecido la enfermedad. El cáncer surge cuando las células de alguna parte del cuerpo comienzan a crecer sin control. Aunque existen muchos tipos de cáncer, todos comienzan debido al crecimiento sin control de las células anormales. El riesgo de contraer algún tipo de cáncer se puede reducir mediante cambios en el estilo de vida de una persona, como por ejemplo, consumiendo alimentos más saludables en la dieta. La principal función de la dieta es aportar los nutrientes necesarios para satisfacer las necesidades nutricionales de las personas. Existen cada vez más pruebas científicas que demuestran que ciertos alimentos, así como algunos de sus componentes tienen efectos físicos y psicológicos beneficiosos. Las investigaciones realizadas se han centrado en la identificación de componentes biológicamente activos en los alimentos, que ofrezcan la posibilidad de reducir el riesgo a contraer enfermedades. Estos

componentes se conocen como quimioprotectores, entre los cuales se encuentran los antimutagénicos y anticancerígenos (NCI, 1999). En los alimentos como frutas, verduras y carnes se ha encontrado que tienen estas propiedades que proporcionan cierta protección hacia el riesgo de padecer algún tipo de cáncer. Los antioxidantes son un grupo muy estudiado en donde se sabe que protegen al cuerpo de los efectos de los elementos carcinógenos. En los vegetales, estas propiedades han sido ampliamente estudiadas, ya que poseen sustancias como flavonoides, vitaminas, carotenoides, donde se sabe, que protegen al cuerpo de estos efectos y además ya se han logrado aislar llegando a identificar a los compuestos responsable de dicha actividad. En el caso de las carnes, también se ha encontrado que especies marinas como peces, tienen ciertas propiedades antimutagénicas, por lo cual el consumo de estas especies está relacionado con una baja incidencia de padecer algún tipo de cáncer. Esto se debe a que en los animales marinos hay un alto contenido de ácidos grasos omega-3 o ácidos grasos poliinsaturados (AGP), que inhiben la carcinogénesis en determinados niveles o etapas del cáncer (Chen e Istfan, 2001; Colombo, 1997). Otros de los compuestos quimioprotectores de origen marino incluyen a los carotenoides, igual que en los vegetales. En peces como macarela, salmón y sardinas existe un compuesto tipo vitamina liposoluble, la ubiquinona, que favorece la generación de energía de las células (Pettit y col., 1982). El estudio de productos naturales derivados de organismos marinos es relativamente reciente, de ahí la importancia del estudio de estos organismos,

los cuales pueden ser una fuente importante de sustancias biológicamente activas que ayuden en el tratamiento de muchas enfermedades. En Sonora, Burgos-Hernández y col. (2001), encontraron cuatro fracciones con actividad antimutagénica en un extracto lipídico de jurel (*Seriola lalandi*). Wilson Sánchez y col. (2006), demostraron la existencia de actividad antimutagénica y antiproliferativa en extractos lipídicos de camarón y pulpo, encontrando al menos cuatro compuestos o grupo de ellos poseedores de dicha actividad biológica.

A la fecha se ha podido detectar la presencia de compuestos con potenciales antimutagénicos y antiproliferativos en algunas especies marinas, los cuales se han localizado preferentemente en la base lipídica del músculo de dichos organismos marinos; sin embargo, no se han purificado y caracterizado, por lo que el presente trabajo tiene la finalidad de purificar y caracterizar los compuestos con actividad antimutagénica y antiproliferativa de extractos lipídicos de camarón y pulpo.

ANTECEDENTES

Producción Pesquera en México

México es un país con una amplia variedad de recursos naturales, el cual posee 11 mil 593 kilómetros de costas, de los cuales 73% corresponden al océano Pacífico y el 27% restante al Golfo de México y Mar Caribe, incluyendo sus respectivas islas. La gran extensión de los mares mexicanos es el hábitat de especies marinas de climas templado, cálido y frío.

La pesca en México comprende dos grandes segmentos, la captura, que es una actividad esencialmente extractiva de los recursos marinos y la acuicultura que se refiere a la producción pesquera en ambientes controlados. Las aguas de México albergan mil 200 especies con posibilidades de ser capturadas, 305 están plenamente identificadas y 60 de éstas tienen importancia económica. México ocupa el lugar 16 entre los 20 países pesqueros más importantes del mundo (SEMARNAP, 1999).

En cuanto a producción las especies marinas, el abulón, atún, ostión, tiburón, sardina y langosta muestran los índices más altos. En 1997 se alcanzó la producción pesquera más alta de la historia de nuestro país, con un millón 570 mil ton, mientras que para el 2005 la producción total cerró en un millón 522 mil 930 ton.

El crecimiento en la producción pesquera en el período comprendido de 1994 a 2005, obedece a la evolución de la acuicultura y en grado menor a la

captura. Por ello, de 262 mil 911 toneladas de producción, el 38.9% corresponde al crecimiento en la acuicultura y el 18% a la captura.

La producción nacional durante el período de enero a julio del 2006 registró un volumen de 843 mil 499 toneladas, de las cuales el 74.7% se destinó al consumo humano directo y el restante a uso industrial. La baja producción pesquera de captura se debe a la disminución que han presentado pesquerías como el atún debido a factores climáticos. En compensación a esta situación, la acuicultura, principalmente cultivo de camarón, creció 6.4%, impulsada por la producción reportada en los estados de Sinaloa y Sonora (SEMARNAP, 2005).

La Pesca en Sonora

El sector pesquero y acuícola es una de las actividades con mayor importancia dentro del Estado, ubicándolo en un primer plano nacional a nivel productivo; la actividad pesquera en la actualidad depende y se concentra en seis puertos pesqueros.

La pesca es muy significativa dentro del desarrollo económico estatal, ya que participa con el 2.3% en el Producto Interno Bruto, aporta más del 4.0% a la población económicamente activa y contribuye en la aportación de divisas con más de 240 millones de dólares anuales. Además abastece alimentos ricos en proteínas, abundantes y accesibles a la población y contribuye al desarrollo de otras actividades económicas de la entidad.

El Estado continúa encabezando la producción nacional con una aportación del 25% en promedio anual de los últimos 5 años. En el año 2002, la producción alcanzada fue de 549, 030 ton, un 6.8% más que el volumen estatal del 2001, y con un valor de 2,092.6 millones de pesos. Operan en la pesca estatal 556 embarcaciones mayores, de las cuales 524 son camarónicas y 32 sardineras, además de 4,000 embarcaciones menores. Existen más de 100 empresas en el estado que procesan sardina, jaiba, camarón, calamar, caracol y otros moluscos.

Se comercializan en promedio más de 120 mil toneladas al año de distintos productos y de los cuales un 20% se exportan (camarón, calamar, sardina y jaiba). La producción acuícola pasó de 3,646 toneladas obtenidas en 1992 a 20,271 en 2002, es decir un incremento del 456%. Destaca la producción cultivada de camarón (SEMARNAP, 2005).

Relación entre Dieta y Cáncer

Cada vez se realizan más investigaciones acerca de la relación que existe entre el cáncer y la dieta. El cáncer es una enfermedad muy compleja y existen muy pocas respuestas definitivas sobre sus causas. Hoy en día, la alimentación es un tema que suscita polémicas y que se encuentra en boca de todos. Los espectaculares avances que han experimentado las ciencias de la alimentación y de la nutrición en las últimas décadas revelan la importancia que

tiene llevar a cabo una alimentación adecuada como una de las mejores vías de promoción de la salud y del bienestar físico y emocional (López y Sánchez, 2003).

En los últimos años, los investigadores han intensificado sus estudios acerca del papel que juega la dieta, tanto en la prevención como en el tratamiento del cáncer. Cada año se producen en el mundo más de 10 millones de casos nuevos de cáncer: por órganos, y considerando ambos sexos, el cáncer de pulmón es el de mayor incidencia, seguido del de mama, colon-recto y de estómago (Yang, 2000).

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo. El incremento estimado de las muertes por cáncer en los últimos 10 años, ha sido de un 15% en países desarrollados y de un 30% en países en vías de desarrollo. Se estima también que entre un 30 a 40% de casos de cáncer pueden prevenirse a través de cambios en la dieta (OPS, 2000).

En la actualidad las investigaciones más interesantes se han centrado en la identificación de compuestos biológicamente activos en los alimentos, que ofrezcan la posibilidad de reducir el riesgo a contraer enfermedades. Estos compuestos son los que los investigadores llaman quimioprotectores (NCI, 1999).

Compuestos Quimioprotectores en Alimentos

Los compuestos quimioprotectores pueden definirse como medicamentos o compuestos químicos, que se utilizan para prevenir la ocurrencia de lesiones precancerosas, o bien para retardar o prevenir la progresión de padecimientos clínicamente establecidos (NCI, 1999).

Generalidades

Todos sabemos que lo que comemos influye poderosamente en nuestro organismo. Hasta el punto de que hacerlo incorrectamente puede llevarnos al padecimiento de numerosas patologías, incluyendo el cáncer. Lo que no es tan conocido es que hasta el cáncer puede no ya prevenirse sino combatirse con una alimentación adecuada (Sánchez, 2003).

Cada vez son más los estudios que vinculan el cáncer con la dieta. Se calcula que entre el 30 y 40% de los cánceres se deben a graves trastornos en nuestra alimentación. Sin embargo, teniendo en cuenta que la nutrición es la base de nuestro sistema de defensa biológica y, por tanto, que cualquiera que sea el origen que se le atribuya al cáncer éste debe desarrollarse en nuestro organismo venciendo la resistencia del sistema inmune.

La principal función de la dieta es aportar nutrientes necesarios para satisfacer las necesidades nutricionales de las personas. Existen cada vez más evidencias científicas que demuestran que ciertos alimentos contienen algunos compuestos biológicamente activos que tienen la posibilidad de reducir el riesgo

de contraer enfermedades. Dentro de estos componentes conocidos como quimioprotectores se encuentran los antimutagénicos y anticancerígenos (NCI, 1999). Entre los componentes con función quimiopreventiva para el cáncer, podemos distinguir a los antioxidantes como la vitamina C y E, los fitoquímicos como los bioflavonoides, fitoesteroles y los carotenoides, así mismo, compuestos de origen marino como ácidos grasos y terpenos, etc. que hoy en día están siendo usados en el tratamiento contra el cáncer, o bien están siendo estudiados para ser utilizados para contrarrestar algún tipo de cáncer específicamente (Mayer, 2002).

Tipos de Compuestos Quimioprotectores

Fitoquímicos. Entre las clases de dietas conservadoras cada vez se reconoce más que el bienestar requiere otro tipo de componentes denominados fitoquímicos, que se encuentran en las plantas. Aunque no se consideran nutrientes esenciales, proporcionan una importante protección contra las toxinas, el cáncer y otros trastornos comunes del cuerpo. Los fitoquímicos son componentes químicos naturales, biológicamente activos que se encuentran en los alimentos derivados de plantas, los cuales tienen efectos positivos en la salud. De hecho, cada año las investigaciones descubren más beneficios terapéuticos de estos. Está bien comprobado que tienen una fuerte protección contra el cáncer, ya que estos actúan en la detoxificación de drogas, toxinas, carcinógenos y mutágenos (como bloqueadores y supresores), neutralizan

radicales libres, inhiben enzimas que activan carcinógenos e inducen a enzimas detoxificadoras de los mismos (Margulis, 1982).

Otros de los beneficios que son atribuidos a los fitoquímicos es que evitan la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), reducen la síntesis y utilización de colesterol y afectan la presión sanguínea y coagulabilidad, así como también, retardan el proceso de envejecimiento y sus enfermedades asociadas (Pryor, 1974).

Los fitoquímicos se agrupan en clases con base en funciones protectoras similares, así como por sus características físicas y químicas individuales. Algunas de las principales clases de fitoquímicos son los terpenos, los fenoles, los tioles y los lignanos. Entre los terpenos encontramos a los carotenoides y limonoides. Existen más de 600 carotenoides naturales que constituyen pigmentos de plantas amarillos, naranja y rojos. El licopeno es un carotenoide presente en el tomate que ayuda a prevenir el cáncer de próstata. Se ha encontrado que los hombres que consumen 10 o más porciones de tomate por semana presentan una reducción de 45% en el riesgo de desarrollar este cáncer (Aheme, 2002). En la clase de los fenoles encontramos los flavonoides e isoflavonas. Se han identificado más de 800 flavonoides, los cuales son pigmentos de plantas azules, azul rojizo y violeta. Los flavonoides fenólicos presentes en el jugo de toronja y el vino rojo disminuyen el riesgo de cardiopatías. Las isoflavonas se encuentran en granos y leguminosas,

especialmente en la soya, también disminuyen el riesgo de cardiopatías y previenen cánceres relacionados con hormonas (próstata y mama). Por otro lado, la clase de los tioles se encuentran en los vegetales de la familia de las crucíferas (brócoli, coliflor, repollo, berros, col de Bruselas, berza) y disminuyen el riesgo de cánceres de pulmón, estómago, colon y recto (Jang y col., 1997). En la última clase de los fitoquímicos se encuentran los lignanos, los cuales podemos encontrarlos en las semillas de lino, salvado de trigo, cebada y avena.

Antioxidantes. En los últimos años se ha investigado el papel que juegan los antioxidantes en ciertas patologías, entre ellas el cáncer. Los estudios se centran principalmente en la vitamina C, vitamina E, beta-carotenos, flavonoides, selenio y zinc. Los antioxidantes tienen muchas propiedades o funciones pero, aunque hay de muchas clases, todos contrarrestan el efecto de los radicales libres, que son moléculas inestables capaces de alterar la vida celular. El problema de los radicales libres se produce cuando existe un exceso de ellos durante un período prolongado, al no ser neutralizados, atacan las células sanas de nuestro organismo, acelerando el proceso de envejecimiento de los tejidos. El exceso de radicales libres proviene principalmente de agentes contaminantes externos, tales como: contaminación atmosférica, humo del tabaco, drogas, grasas de origen animal, grasas, rayos ultravioleta, radiación, medicamentos, etc. (Bergendi y col., 2000).

Para reducir el exceso de radicales libres en nuestro organismo debemos evitar los agentes contaminantes que los causan. También podemos potenciar nuestro sistema de defensa mediante alimentos ricos en antioxidantes. Los antioxidantes pueden anular los efectos perjudiciales de los radicales libres en las células (Pryor, 1974).

Entre los antioxidantes principales tenemos a los β -carotenos (precursor de la vitamina A), que podemos encontrarlos en frutas y verduras como las zanahorias, mango, tomates, melón, melocotón, espinacas, arándanos, cítricos, ciruelas, fresas, kiwis, limones, manzanas, papaya, entre otros. Otros antioxidantes muy conocidos son la vitamina C (ácido ascórbico) y E (Tocoferol), la enzima glutatión peroxidasa, las antocianinas, enzima superóxido dismutasa, así como las vitaminas B3, B6, B8 y B12, coenzima Q10, cromo, zinc, selenio, calcio y magnesio (Kristal y col., 2005).

Compuestos de Origen Marino. El planeta Tierra posee una superficie de unos 510 millones de Km^2 , de los cuales 379 millones de Km^2 pertenecen a nuestros océanos, estos tienen una profundidad promedio de 3800 m. Todo este volumen de agua está poblado por un elevado número de especies de seres vivos, número que se ve incrementado a medida que nuestros conocimientos sobre el medio marino aumentan. Su gran biodiversidad y proceso evolutivo prolongado convierte al medio marino en el ambiente ideal para la búsqueda de nuevas entidades químicas (Albericio, 2007).

La ciencia ha confirmado que la vida empezó en los océanos, por consiguiente los organismos marinos evolucionaron millones de años antes que los seres vivos terrestres. Esto les ha llevado a desarrollar moléculas con actividad biológica con el fin de sobrevivir en ambientes altamente hostiles y competitivos. Esta adaptación evolutiva ha forzado a la fauna marina a convertirse en entidades químicamente únicas y candidatos ideales en la búsqueda de nuevos compuestos terapéuticos.

La utilización de los recursos marinos como generadores potenciales de sustancias terapéuticas es un tema bastante inexplorado. Literalmente existe un mar de posibilidades por descubrir y desarrollar. Estamos ante una rama de la ciencia aplicada que nos ofrece muchas posibilidades nuevas. Aproximadamente unos diez millones de especies pueblan al medio marino y de ellos se han estudiado un número reducido de especies. Entre estas especies tenemos una serie de organismos que no pueden desplazarse, los cuales están provistos de un primitivo sistema inmunológico y que en su proceso de evolución han desarrollado una serie de metabolitos secundarios que son capaces de utilizar, para defenderse de sus depredadores o bien para atraer o repeler a otros organismos, es decir, estos organismos, debido a su incapacidad para poder desplazarse, han elaborado todo un sistema químico de defensa (Faulkner, 2000).

El estudio del medio marino presenta, de hecho, una serie de inconvenientes que son los responsables de que no se haya podido llevar a

cabo un proceso similar al que ha tenido lugar en el medio terrestre, entre los cuales podemos resaltar los problemas que se plantean a la hora de acceder a muchos de los organismos y la limitada cantidad de producto que se puede aislar de un organismo.

Según estudios realizados por el Instituto Nacional del Cáncer, alrededor del 1.8% de los extractos de especies marinas (la mayoría de ellos proceden de esponjas, briozoos y tunicados) presentan algún tipo de actividad antitumoral, mientras que en organismos terrestres solo un 0.4% de los extractos (microorganismos y plantas terrestres) presentan actividad (Garson, 1994). En el medio marino son precisamente los organismos sésiles como las esponjas o briozoos los que presentan resultados más prometedores así como el grupo de los tunicados.

La investigación de estos organismos marinos para la obtención de compuestos bioactivos de interés, podemos decir que ha sido el motor de la investigación de los productos naturales marinos, cuyo resultado se refleja en la gran cantidad de compuestos anticancerígenos y contra otros tipos de tumores que se han aislado, algunos ya en fase de aplicación y muchos más en las distintas fases de ensayos preclínicos, de tal manera que cada vez son más el número de este tipo de compuestos que se añaden a una lista cada vez más numerosa de potenciales fármacos (Faulkner, 2000).

Ejemplos de estos compuestos potencialmente anticancerígenos tenemos a la Briostatina I aislada del organismo briozoo *Bugula neritina*, que

ha demostrado tener una gran actividad antitumoral. Dolastina 10 y 15, las cuales son pequeños péptidos aislados de un molusco marino (*Dolabella auricularia*) han demostrado tener actividad antimitótica además de inhibir el crecimiento de las células progenitoras hematopoyéticas. Halicondrina B, la cual se aisló de la esponja *Halichondra Okadai*, demostrando inhibición en el crecimiento de bacterias y hongos (Osinga, 2003).

A finales de la década de los 50 se empezaron a recolectar algunos compuestos extraídos de esponjas marinas, que son los organismos pluricelulares más sencillos, puesto que no poseen órganos ni tejidos, tan sólo tienen células con funciones diferenciadas, pero que, sorprendentemente, son capaces de producir más tipos de metabolitos secundarios en comparación con otros organismos marinos: doce veces más que cnidarios y algas, siete más que tunicados y cinco más que moluscos y equinodermos. Se conocen cerca de cuatro mil productos descritos de esponjas, tal es el caso de una esponja llamada *Crytotheca crypta*; extractos de este organismo mostraron actividad antitumoral *in vitro* y un proceso de síntesis resultó en la identificación del principio activo. Así mismo, un análogo de un ácido nucleico, el arabinósido de citosina (ARA-C), demostró ser eficaz en el tratamiento de la leucemia aguda mieloide (Bergmann y Feeney 1951). Recientemente, un análogo fluorado del ARA-C llamado Gemcitabina ha sido una herramienta importante en el tratamiento paliativo del cáncer de páncreas, pulmón y mama (Bergmann y Burke 1955). En estado más avanzado se encuentra *Discodermia dissoluta*

(Discodermólido), este compuesto procedente de las esponjas de aguas profundas, es un macrólido que presenta actividad inmunosupresora, inhibe la polimerización de tubulina mediante un mecanismo de acción similar al taxol, inhibiendo además el crecimiento de células tumorales resistentes a este último, además de que no posee efectos tóxicos (Murray y col., 1999).

Otro tipo de compuestos con actividad biológica son los compuestos extraídos de tunicados, que son animales de aspecto sencillo que presentan estructuras muy complejas como estómago o ganglio cerebroide. Este grupo comprende a las ascidias (de vida sésil o incrustante) y a los taliáceos (animales coloniales). El cuerpo está rodeado por una cubierta resistente denominada "túnica" de aquí el nombre de este grupo. En el campo de los compuestos de origen marino que están bajo ensayos clínicos como agentes antitumorales el alcaloide ecteinascidina ET-743 es de lejos el que se encuentra en estado más adelantado, ya que está siendo desarrollado para el tratamiento del sarcoma de tejidos blando (STB) (Pérez, 2000). Otro compuesto aislado de un tunicado es la aplidina (Aplidin) un dihidroderivado de la didemnina B. Esta última es un depsipéptido aislado de *Trididemnum solidum* que ha sido retirado recientemente de los estudios clínicos como anticancerígeno debido a su toxicidad. Aplidina se aísla de otro tunicado del mar Mediterráneo *Aplidium albicans*, aunque el suministro del compuesto para los ensayos clínicos proviene de la síntesis total del mismo. Los resultados obtenidos han demostrado la actividad de Aplidin en pacientes adultos en cánceres renales,

linfomas, colorectales que son resistentes a otro tipo de agentes convencionales. Con un mecanismo de acción diferente, isogranulatimida, un alcaloide aislado de otro tunicado (ascidia) está siendo estudiado para posteriores análisis clínicos como anticancerígeno, pues recientemente se ha sintetizado de una forma muy sencilla y con muy buenos rendimientos (Piers y col., 2000).

Mientras existe un gran número de compuestos de origen marino con resultados prometedores en el campo de los anticancerígenos, los océanos también es fuente de otro tipo de compuestos con aplicaciones en otras áreas de las enfermedades humanas, tal es el caso de los Moluscos, en donde podemos mencionar al péptido ω -conotoxina MVIIA (SNX-111) aislado del molusco *Conus magus* encontrando ser un potente tranquilizante del dolor en enfermos con cánceres o SIDA. Este compuesto ya está en el mercado desde el año 2000 con el nombre de Zictonide, se trata de un péptido linear compuesto por 25 aminoácidos y que se encuentra junto con otros muy similares (llamados conotoxinas) en el veneno del molusco *Conus magus*. Las conotoxinas son segregadas en las picaduras de este molusco con concha, siendo estas incluso mortales para el hombre, pero afortunadamente en cantidades adecuadas presentan una propiedad analgésica 1000 veces más potente que la morfina. Otro compuesto aislado de un molusco en estados muy avanzados desde el punto de vista clínico, es el Kahalalido F, un ciclodepsipéptido aislado de *Elysia rufescens*, un molusco marino sin

caparazón, y del alga *Bryopsis pennata*, que forma parte de la dieta del molusco. Para sintetizarlo, el molusco captura cloroplastos del alga y los incorpora a su metabolismo secundario. Este compuesto (Kahalalido F) antitumoral es el más activo de una familia formada por once péptidos (Kahalalidos A-H, J, M y O), el cual se encuentra en ensayos clínicos para carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón no microcítico y melanoma (López-Macia y col., 2001). Por último cabe destacar que entre los moluscos también hay estructuras muy sencillas, como el ES-285 (*Mactromeris polynyma*), que poseen interés como antitumorales.

Otro tipo de compuestos de interés farmacológico que se obtiene de los organismos marinos es de los agentes antiinflamatorios. El primero de este tipo de producto en ser aislado fue la manoalida, la cual se mostró como un fármaco que actúa bloqueando la liberación de las enzimas responsables del dolor y la inflamación por lo cual se estudia su posibilidad para el tratamiento de la artritis y distrofia muscular. Posteriormente se aislaron toda una serie de compuestos que actualmente se encuentran en fase de estudio y que presentan actividad en los procesos inflamatorios como lo son las pseudopterosinas y la escitonimina (Fusetani y col., 2000).

Desde principios de 1997 se estudia con especial interés la escualamina, otra sustancia que ha mostrado ser de especial importancia en la lucha contra el cáncer. La escualamina es un inhibidor de la angiogénesis, proceso por el cual los tumores inducen el crecimiento de vasos sanguíneos que les abastecen

de nutrientes. Este compuesto se aisló de la mielga (*Squalus acanthias*), un tiburón de pequeño tamaño y medianamente extendido. La escualamina se une a las células de los vasos sanguíneos que se están creando alrededor del tumor desequilibrando el pH de la célula, haciéndola más ácida de lo normal, por lo que pierde la capacidad de reproducirse, impidiéndose así la formación de vasos que pueden nutrir al tumor. Por el momento ha demostrado ser efectivo en tumores cerebrales de las ratas, reduciéndolos de tamaño considerablemente (Marshall y col., 2001). Otro antitumoral que está en ensayos clínicos contra cánceres de mama y ovario es la *Cryptoficina 52*, un derivado sintético de los ciclodepsipéptidos cryptoficinas. Estas se aíslan de la cianobacteria *Nostoc sp.* y se sabe que el mecanismo de acción está asociado a la desestabilización de microtúbulos y a la inducción a la fosforilación de una enzima involucrada en procesos de muerte celular (apoptosis). En los ensayos clínicos se viene utilizando en combinación con otros agentes antitumorales como el 5-fluorouracilo o el irinotecan (Mayer y Hamann, 2002).

Roca y col. (2002), realizaron un estudio para evaluar el papel del aceite de pescado, específicamente los omega-3 (EPA: ácido Eicosapentanóico, DHA: ácido docosahexapentanóico, por sus siglas en inglés) en carcinogénesis colorectal; obteniéndose que la suplementación con este tipo de nutrientes ocasionó una significativa disminución en la proliferación celular (antiproliferación) sobre las líneas celulares Caco-2 y HT-29 (cáncer colorectal humano). El interés en las ventajas potenciales de los aceites de pescado

emergió de la observación de que las enfermedades cardiovasculares e incidencia de cáncer son generalmente bajas en los esquimales de Alaska en Groenlandia (Neilsen y Hansen, 1976). Estas poblaciones comen una gran cantidad de pescado graso y bajo en carbohidratos, la cual es contrastante a la dieta de los norteamericanos y de las poblaciones occidentales que consumen una dieta alta en grasa sobre todo de aceites animal (grasas saturadas) y vegetal (omega-6). Un aspecto importante de aceite de pescado es su efecto inhibitorio significativo contra varios tipos de cáncer humano en modelos animales, en los que se incluyen el cáncer de próstata, de piel, pancreático, cáncer de pulmón y de laringe, entre otros (Neilsen y Hansen, 1976). En estudios con animales se ha observado que una dieta alta en ácidos grasos polinsaturados marinos baja perceptiblemente la incidencia de cáncer con respecto a los animales que se les alimento con una dieta con poca grasa o con altas cantidades de aceite de maíz. Por otro lado, cuando se implantan tumores en ratones inmunodeficientes se ha encontrado que darles una dieta alta en aceites de pescado puede retardar el crecimiento del tumor. Los resultados de este estudio sugieren que el aceite de pescado podría ser utilizado en la prevención y en el tratamiento del cáncer, como un buen agente antitumor (Welsch, 1992). Por su parte, Augustsson y col. (2003), realizaron un estudio prospectivo con 47,882 hombres en Estados Unidos y encontraron que la ingesta diaria de 0.5 g de ácidos grasos marinos (ácidos grasos poliinsaturados omega-3) está asociado con una disminución del 24% en el riesgo de cáncer de

próstata metastático. Así mismo, Kimura y col. (2000), reportan que 0.4 mL/ratón de aceite de carpa ó 0.2 ó 0.4 mL/ratón de aceite de atún previenen el crecimiento del tumor en ratones. Existe evidencia substancial de experimentos y estudios en animales que indican que los ácidos grasos de cadena larga (omega-3) de pescado y aceites de pescado inhiben la carcinogénesis (Gago y col., 2003).

Un campo no muy explorado son los microorganismos marinos y en los últimos diez años se ha ido actualizando el conocimiento de las técnicas de cultivo y su estudio. Según el NCI (Instituto Nacional del Cáncer), sólo el 1% de los microorganismos marinos han llegado a ser cultivados, lo que implica un desconocimiento actual del 99% restante (Jensen y Fenical, 1994).

Del análisis de la bibliografía podemos mencionar que son las esponjas marinas los organismos con un mayor número de estudios químicos, seguidas muy de cerca por los cnidarios, algas, moluscos, tunicados y equinodermos. De todos ellos se conocen más de 500 compuestos descritos con alguna actividad biológica, siendo el campo del cáncer el más estudiado y el que merece una mayor atención. En la tabla 1 se resume un listado de productos de origen marino que se pueden considerar más representativos y que han sido seleccionados para ensayos clínicos (Mayer y Gustafson, 2003).

Tabla 1.- Compuestos antitumorales obtenidos a partir de organismos de origen marino.

COMPUESTO	ESPECIE
Briostatina (Bryostatin 1)	Briozoo <i>Bugula neritina</i>
TZT-1027	Dolastatina sintética
Cematodina	Derivado sintético de la Dolastatina
ILX 651, Syntatodina	Derivado sintético de la Dolastatina
Ecteinascidina 743 (Yondelis)	Ascidia <i>Ecteinascidia turbinata</i>
Didemninas (Aplidin)	Ascidia <i>Aplidium albicans</i>
Halicondrina (E7389)	Esponja <i>Lissodendoryx sp.</i>
Discodermolides (Discodermolide)	Esponja <i>Discodermia dissoluta</i>
Kahalalide F	Molusco <i>Eylisia rufescens</i> y Alga <i>Bryopsis sp.</i>
Zalipsis	Derivado sintético de la Safracina B
ES-285	Molusco <i>Spisula polynyma</i>
KRN-7000	Esponja <i>Agelas mauritianus</i>
Esqualamina	Tiburón <i>Squalus acanthias</i>
AE-941 (Neovastat)	Tiburón
NVP-LAQ824	Sintética
E-7974 (Elsal)	Sintética
Salinosporamida A (NPI-0052)	Bacteria <i>Salinispara tropica</i>
GTS-21 (aka DMBX)	Gusano marino
IPL-576,092 (aka HMR-4011A)	Esponja <i>Petrosia contignata</i>
IPL-512,602	Derivado del IPL-576,092
IPL-550,260	Derivado del IPL-576,092
Zicotodina (Prialt)	Molusco <i>Conus magus</i>
CGX-1160	Molusco <i>Conus geographus</i>
ACV1	Molusco <i>Conus victoriae</i>
Dolastatinas (Dolastatin 10)	Liebre marina <i>Dolabella auriculata</i>

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y Materia Prima

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron: A) Cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 proporcionadas por el Dr. Bruce Ames de la Universidad de California en Berkeley. B) Moltox: Extracto enzimático S9 de hígado de rata. C) Laboratorio DIFCO: Caldo nutritivo. D) Sigma Chemical Co.: d-biotina (vitamina B), L-histidina (L- α - amino- β -ácido imidazolepropionico), ampicilina (D[-]- α -aminobencilpenicilina), fenobarbital, D-glucosa-6-fosfato ($C_6H_{11}OPNa_2$), β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ($C_{21}H_{27}N_7O_{17}P_3Na$), aflatoxina B₁, D-(+)-glucosa anhidro ($C_6H_{12}O_6$), fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4), fosfato de sodio amonio tetrahidratado ($NaNH_5PO_4 \cdot 4H_2O$), sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), cloruro de magnesio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), acetato de celulosa, dimetil sulfóxido (C_2H_6OS), n-hexadecano ($C_{16}H_{34}$), agar bacteriológico. E) Productos químicos Monterrey, S.A.: alcohol etílico (CH_3CH_2OH), cloroformo ($CHCl_3$) y ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$).

Obtención y Manejo de la Materia Prima

Para la realización de este proyecto se trabajó con dos especies marinas: camarón (*Litopenaeus vannamei*) de granja y pulpo (*Paraoctopus limaculatus*). Estas fueron obtenidas de una pescadería de la Ciudad de Hermosillo,

teniéndose como información que el pulpo fue capturado en Bahía de Kino y el camarón provenía de acuicultura. Para estas dos especies marinas se tomó solo la parte comestible, la cual fue picada en trozos para facilitar la homogenización de la muestra, y empacada en porciones de 100 g en bolsas de polietileno auto-adheribles para ser almacenadas a -20°C hasta posteriores análisis.

Obtención de Extractos para la Determinación del Potencial Antimutagénico.

Para la obtención de los extractos lipídicos se tomaron 100 g de músculo y fueron homogenizados con 500 mL de cloroformo; la mezcla resultante se agitó en un matraz Erlenmeyer por un tiempo de 30 min utilizando un agitador Wrist Action Burrell Shaker (Burrell Corporation Pittsburg, PA). El mezclado final se filtró con filtros de café marca Connaisseur para eliminar el material grueso y enseguida con papel Whatman No. 1 bajo vacío. El filtrado se evaporó en un rotavapor a una temperatura menor de 40°C hasta quedar un total de 5 mL de la muestra, la cual se evaporó a temperatura ambiente bajo campana hasta sequedad de la misma. Posteriormente el extracto se diluyó con dimetilsulfóxido (DMSO) para la determinación de su potencial antimutagénico.

Características Específicas de las Cepas Utilizadas en la Prueba de Antimutagenicidad en *Salmonella*

En este estudio se utilizaron cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, histidina-dependiente, las cuales fueron proporcionadas por el Dr. Bruce Ames de la Universidad de California en Berkeley. Estas cepas han sido diseñadas de manera tal que poseen una alta sensibilidad a mutar debido a: 1) una gran permeabilidad de la pared celular causada por la mutación, que ocasiona la pérdida parcial de la barrera lipopolisacárida que cubre la superficie de la bacteria resultando en un aumento en la permeabilidad de las moléculas grandes (mutación *rfa*); 2) una mutación en el sistema celular bacteriano para remover o reparar defectos en el ADN, resultando en la incapacidad de reparar secciones dañadas o mutadas (mutación *uvrB*); y 3) plásmidos del factor-R (algunas cepas) y plásmido multicopia (algunas cepas) que contienen sistemas de reparación susceptibles a error del ADN (Summers, 1999).

Confirmación de los Genotipos de las Cepas Utilizadas para la Prueba de Antimutagenicidad.

Las cepas fueron sometidas a la confirmación del genotipo. Primeramente se reprodujeron en caldo nutritivo y se incubaron a 37°C por 12 h en un baño con agitación (Precision Scientific, Reciprocal shaking bath. Mod. 66800) a una velocidad de 120 rpm en oscuridad. En este periodo, el cultivo

llega a una densidad aproximada de 1.2×10^9 células/mL. Para la confirmación de genotipos se efectuaron las pruebas siguientes:

Requerimiento de Histidina. El requerimiento de histidina se confirma con el crecimiento de la bacteria en placas de agar selectivo. Con un asa estéril se llevó a cabo la inoculación de las placas con biotina y las de histidina/biotina, se incubaron las placas a 37°C por 24 h. Los resultados fueron que en las placas sin histidina no hubo crecimiento.

Mutación. Esto se refiere a cualquier alteración de la secuencia de bases de un segmento de ADN correspondiente a un gen, aun cuando esta alteración no se manifieste en forma de cambio fenotípico observable o detectable.

Mutación *rfa*. Esta prueba consistió en la inoculación de placas de agar nutritivo con ambas cepas, colocándose en la superficie de la placa el disco de papel filtro (estéril), conteniendo cristal violeta. Se incubaron a 37°C por 12 h, observándose un halo claro de inhibición de crecimiento alrededor del disco, indicando la presencia de la mutación *rfa*, la cual permite el paso de las moléculas grandes como el cristal violeta, a través de una pared celular deficiente en lipopolisacáridos ocasionando así la muerte de la bacteria.

Mutación *uvrB*. Esta mutación hace que la bacteria posea una especial sensibilidad a la luz ultravioleta. Se cultivaron en agar nutritivo, cubriendo la mitad de la superficie de la placa con papel oscuro. La placa se expuso a luz ultravioleta por 8 segundos y se incubó a 37°C por 12 h. Solamente se observó crecimiento en el lado de la placa que se cubrió.

Prueba de Antimutagenicidad en *Salmonella*

Para llevar a cabo la determinación de antimutagenicidad en los extractos, se utilizó la prueba de mutagenicidad de Ames, la cual se describe brevemente. Los extractos de las muestras se diluyeron seriadamente con dimetil sulfóxido utilizando aflatoxina B₁ (AFB₁) como control positivo. Se incluyeron al mismo tiempo un control negativo que contiene la bacteria, la mezcla S9 (extracto enzimático metabólico de hígado de rata) y DMSO.

Siguiendo la metodología descrita por Maron y Ames (1983), se añadieron 2 mL de agar conteniendo histidina y biotina a tubos de ensaye, los cuales se mantuvieron a 45°C. Se agregaron 100 µL de cultivo fresco de la cepa, 100 µL del extracto y 500 µL de la mezcla enzimática S9. Se agitaron los tubos y la mezcla se vertió sobre las placas con agar mínimamente glucosado. Las placas se incubaron a 37°C por 48 h., y el número de revertantes por placa se contabilizó (Figura 1).

Determinación del Potencial Antimutagénico en Camarón y Pulpo Fresco

Para la determinación del potencial antimutagénico, los extractos se diluyeron seriadamente disminuyendo la concentración de los compuestos quimioprotectores. Cada una de la diluciones se mezcló con una cantidad constante de 500 ng de AFB₁, determinando así el potencial mutagénico residual de acuerdo a la técnica de Maron y Ames (1983). La antimutagenicidad fue observada en términos de una disminución del número de bacterias

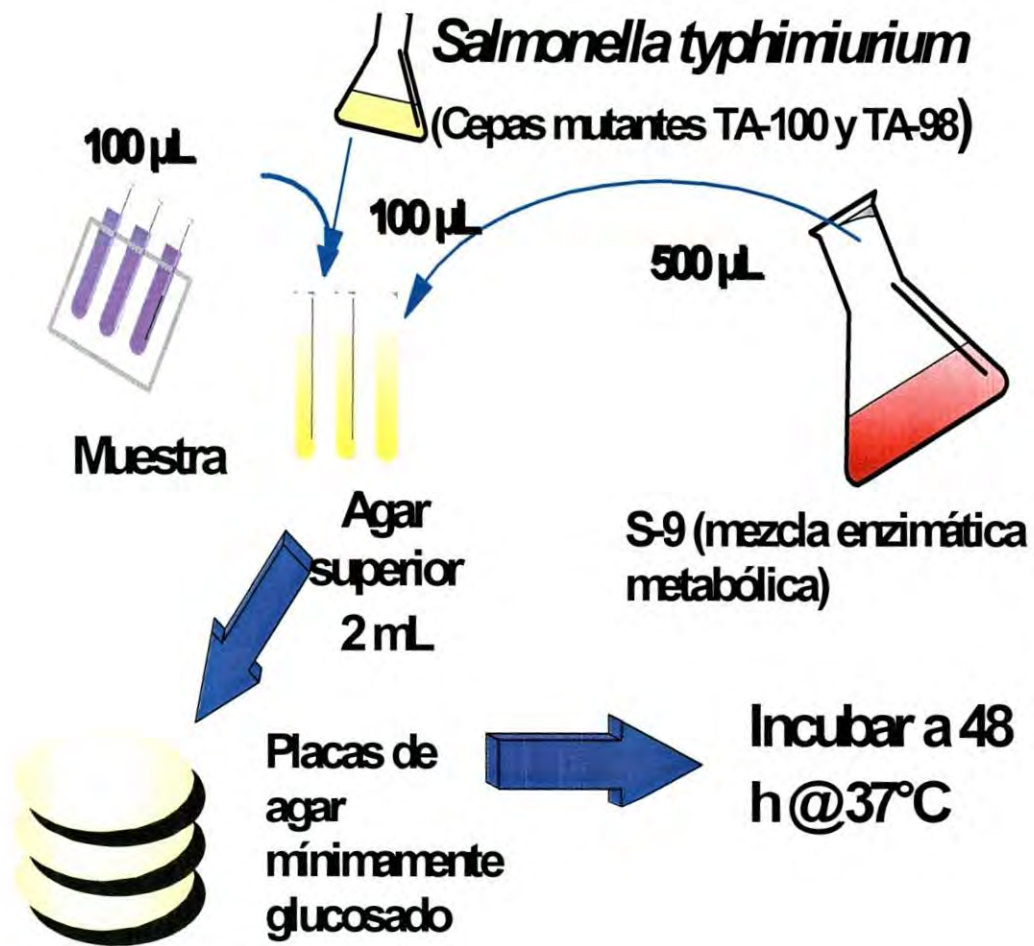


Figura 1. Prueba de mutagenicidad en *Salmonella*.

revertidas por placa, como consecuencia de la inhibición del potencial mutagénico del mutágeno control (AFB₁) por el (los) posible(s) antimutágeno(s) presente(s) en el extracto.

Aislamiento de los Factores Antimutagénicos

Los extractos con mayor actividad antimutagénica se aislaron por medio de cromatografía de capa fina (CCF), utilizando placas de sílica gel de 1 cm de grosor. Como fase móvil se utilizó cloroformo-acetona (9:1 v/v). La sílica de las diferentes regiones que mostraron fluorescencia bajo luz ultravioleta fueron separadas y el contenido de dicha sílica fue re-extraído con una mezcla de cloroformo-acetona (9:1 v/v). Posteriormente, estos extractos fueron llevados a sequedad y re-disueltos en DMSO para analizar su potencial antimutagénico. La determinación del potencial antimutagénico en los extractos se realizó haciendo diluciones seriadas de los extractos de las fracciones o regiones detectadas y cada una de las diluciones fue contaminada con una cantidad constante (500 ng/placa) del mutágeno control (AFB₁), examinando la muestra conforme a la técnica de Ames. La actividad antimutagénica se observó en términos de una disminución del número de bacterias revertidas por placa, como resultado de la posible inhibición del potencial mutagénico del mutágeno control por el (los) posible(s) antimutágeno (s) presente (s) en el extracto.

Líneas Celulares

En la elaboración del presente trabajo se utilizaron las líneas celulares de ratón: M12.A^k (linfoma de células B) y L-929 (tejido conectivo). Las líneas fueron proporcionadas por el Dr. Emil Unanue del Departamento de Inmunología y Patología de la Universidad de Washington. La línea celular L-929 fué obtenida en American Type Culture Collection (ATCC). Los cultivos se mantuvieron en medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado al 5% con suero fetal bovino (SIGMA St. Louis, MO), inactivado mediante calentamiento. Las líneas celulares fueron incubadas a una temperatura de 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y una humedad relativa del 80-90% en una incubadora Isotherm (Fisher Scientific, USA).

Evaluación de la Proliferación Celular por el Método del MTT

La ruptura de la sal de tetrazolium (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) en un producto coloreado púrpura (formazán) (Figura 2) es ocasionada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, lo cual es muy útil para ensayar la supervivencia y proliferación celular. La conversión solo se realiza en células vivas y la cantidad de formazán producido es proporcional al número de células presentes (Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival, 1983). Los cristales de formazán resultantes se solubilizan con isopropanol ácido y la absorbancia de la solución colorida generada se lee en un rango entre 570 a 655 nm en un lector de ELISA.

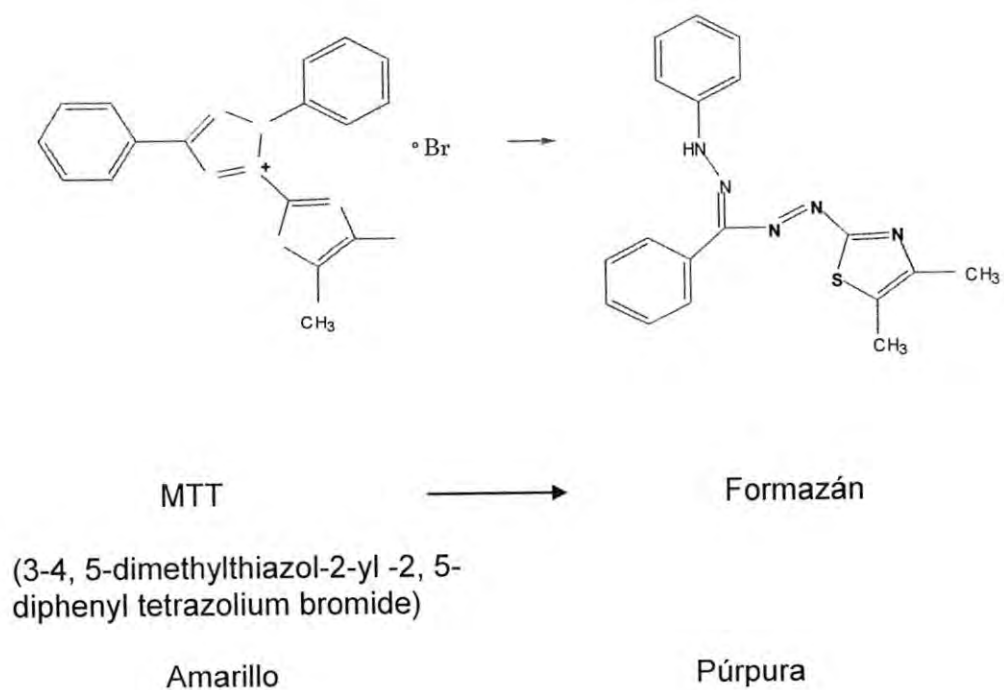


Figura 2.- Biotransformación del MTT a formazán. Células metabólicamente activas reducen la sal de MTT a cristales de formazán. El MTT vira de color amarillo a púrpura. El formazán producido es cuantificado mediante la lectura de la absorbancia a 570-655 nm.

Evaluación de la Actividad Antiproliferativa de Extractos Lipídicos Aislados de Organismos Marinos

Para evaluar el efecto antiproliferativo de los extractos marinos de origen lipídico en las líneas celulares M12.A^k y L-929, se realizaron ensayos de proliferación; partiendo de cultivos en fase de crecimiento logarítmico. Se obtuvo una suspensión de las líneas celulares ya mencionadas, con las siguientes concentraciones: M12.A^k:200,000 células/mL y L-929:400,000 células/mL, las cuales fueron incubadas en placas de 96 pozos de fondo plano (Costar, Corning, N.Y. USA) en presencia de diferentes concentraciones de los extractos a estudiar. Los cultivos celulares se incubaron a una temperatura de 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y una humedad relativa de 80-90% en una incubadora Isoterm (Fisher Scientific, USA) por periodo de 48 h. En las últimas 4 h de incubación se añadió MTT a una concentración de 0.5 mg/mL, para determinar la proliferación celular.

Técnicas de Caracterización

Los extractos antimutagénicos y antiproliferativos de camarón y pulpo se caracterizaron por medio de Espectroscopía de infrarrojo (FT-IR), Espectroscopía de ultravioleta-visible (Uv-Vis) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Espectroscopía de Infrarrojo. Para obtener los espectros de infrarrojo de los compuestos, las muestras se colocaron en forma de películas delgadas sobre

una celda de selenuro de zinc (ZnSe) y se midieron en un espectrómetro FT-IR Perkin-Elmer Modelo GX.

Espectroscopía de ultravioleta-visible. Los espectros de absorción electrónica se obtuvieron en un espectrofotómetro de ultravioleta-visible marca Perkin-Elmer, modelo Lambda 20. Esta técnica se basa en detectar y analizar la radiación electromagnética absorbida por las especies químicas. La absorción de radiación ultravioleta y visible por las moléculas se observa como una o más bandas en el espectro electrónico. Esta técnica es por tanto valiosa para la identificación de grupos funcionales en una molécula. En nuestro caso, las muestras se disolvieron en cloroformo para la obtención de los espectros.

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear. Los espectros de resonancia magnética nuclear se obtuvieron en un espectrómetro marca Bruker Advance 400 que opera a 400 MHz. Las muestras fueron disueltas en cloroformo deuterado, utilizando como referencia tetrametilsilano (TMS). Esta técnica espectroscópica se basa en las propiedades magnéticas del núcleo y ofrece información detallada acerca de la estructura molecular.

Análisis Estadístico

Cada experimento se realizó por lo menos dos veces, con tres réplicas por condición experimental como mínimo.

Para el caso de los resultados de antimutagenicidad, estos se evaluaron en términos de una disminución del número de bacterias revertidas (llámese así

a las colonias que se desarrollaron en el medio de cultivo) por placa como consecuencia de la inhibición del potencial mutagénico del mutágeno control por el (los) posible (s) antimutágeno (s) presentes en el extracto marino. Los resultados se presentaron en gráficas dosis-respuesta.

Con relación a los resultados de antiproliferación, se graficaron en porcentajes de proliferación celular contra concentración.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Potencial Antimutagénico de Camarón y Pulpo

Algunos estudios demuestran progreso en las investigaciones del campo de la quimioprevención del cáncer; así mismo, el interés ha dado vuelta a la investigación de productos naturales, en los cuales se han encontrado muchos compuestos potencialmente activos derivados de plantas y animales marinos o terrestres (Zhang y col., 2004; Visioli y col., 2004; López, 2003; Mayer y Gustafson, 2003; Bueren, 2002; Burgos-Hernández, 2002; Hazra y col., 1999; Sakaguchi y col., 1994; Beckwith y col., 1993; Soeyland y col., 1993; Pettit y Sensenbrenner, 1993).

En este estudio se detectó la actividad antimutagénica de extractos marinos en términos de una disminución del número de bacterias revertidas por placa, como resultado de la inhibición del potencial mutagénico del mutágeno control (AFB₁) por el (los) posible (s) antimutágeno (s) presente (s) en el extracto en la prueba de Ames.

Aislamiento de Factores Antimutagénicos

Para el aislamiento de los factores antimutagénicos provenientes de camarón y pulpo, los extractos lipídicos se fraccionaron por medio de cromatografía en capa fina mediante placas de silica-gel y se utilizó como fase móvil cloroformo-acetona (9:1 v/v). Se aplicaron 1000 µL del extracto en la

placa, a partir de 2 cm de la base de la misma, en forma de línea, dejando 1 cm de espacio a cada lado de la placa. Ya realizada la cromatografía, la placa fue observada bajo una lámpara de luz ultravioleta a longitud de onda corta y onda larga. Las regiones que mostraron tener mayor actividad antimutagénica, se extrajeron con una mezcla cloroformo-acetona (9:1 v/v) y se disolvieron con DMSO para confirmar el potencial antimutagénico.

En este estudio se presentan los resultados a partir de la cromatografía 4, tanto para pulpo como para camarón, ya que en el estudio anterior (Wilson, 2006) detectó actividad antimutagénica en la cromatografía 3 en la región RB2.3 para el caso del camarón y RB2.1 para el pulpo, pero no se obtuvo una purificación total de estos compuestos. A partir de estas regiones reportadas y los valores de Rf (migración relativa de la fase móvil) en la cromatografía 3, se procedió a continuar con la purificación de estos compuestos antimutagénicos. Los valores de Rf y regiones reportadas por Wilson (2006), fueron reproducidos en este trabajo como se muestran en la tabla 2 y 3.

Para el aislamiento de los factores antimutagénicos de camarón a partir de la cromatografía 4, se siguió la misma metodología descrita anteriormente, en donde se observaron tres regiones con los siguientes Rfs: 0.00-0.23 (RB2.3.1), 0.23-0.74 (RB2.3.2), 0.74-1.00 (RB2.3.3) (Tabla 4). Las tres regiones se extrajeron con cloroformo-acetona (9:1) y se disolvieron con DMSO para determinar el potencial antimutagénico (Anexo 1 y 2).

Tabla 2. Fraccionamiento del extracto de camarón (*Litopenaeus vannamei*), utilizando tres procesos seriados de cromatografía en capa fina (CCF).

Cromatografía	Rf (Wilson, 2006)	Rf
CCF1	RA= 0 - 0.29 RB= 0.29 - 0.69 RC= 0.69 - 1	RA= 0 - 0.29 RB= 0.29 - 0.70 RC= 0.70 - 1
CCF2	RB1= 0 - 0.35 RB2= 0.35 - 0.60 RB3= 0.60 - 1	RB1= 0 - 0.18 RB2= 0.18 - 0.68 RB3= 0.68 - 1
CCF3	RB2.1= 0 - 0.06 RB2.2= 0.06 - 0.40 RB2.3= 0.40 - 0.63 RB2.4= 0.63 - 0.84 RB2.5= 0.84 - 1	RB2.1= 0 - 0.09 RB2.2= 0.09 - 0.44 RB2.3= 0.44 - 0.63 RB2.4= 0.63 - 0.80 RB2.5= 0.80 - 1

Rf: migración relativa de la fase móvil. CCF1, CCF2, CCF3: Cromatografía en capa fina 1, 2, y 3, respectivamente, R: región, B: banda, Letra: Distribución de regiones en la primera etapa de aislamiento; Primer número: Distribución de regiones en la segunda etapa de aislamiento; Segundo número: Distribución de regiones en la tercera etapa de aislamiento.

Tabla 3. Fraccionamiento del extracto de pulpo (*Paraoctopus limaculatus*), utilizando tres procesos seriados de cromatografía en capa fina (CCF).

Cromatografía	Rf (Wilson, 2006)	Rf
CCF1	RA= 0 - 0.32 RB= 0.32 - 0.63 RC= 0.63– 1	RA= 0 - 0.32 RB= 0.32 - 0.63 RC= 0.63 - 1
CCF2	RB1= 0 – 0.28 RB2= 0.28– 0.75 RB3= 0.75 – 0.84 RB4= 0.84 - 1	RB1= 0 – 0.12 RB2= 0.12 – 0.62 RB3= 0.62 – 0.82 RB4= 0.82 – 1
CCF3	RB2.1= 0 – 0.49 RB2.2= 0.49 – 0.80 RB2.3= 0.80 – 1	RB2.1= 0 – 0.47 RB2.2= 0.47 – 0.79 RB2.3= 0.79 – 1

Rf: migración relativa de la fase móvil. CCF1, CCF2, CCF3: Cromatografía en capa fina 1, 2, y 3, respectivamente, R: región, B: banda, Letra: Distribución de regiones en la primera etapa de aislamiento; Primer número: Distribución de regiones en la segunda etapa de aislamiento; Segundo número: Distribución de regiones en la tercera etapa de aislamiento.

Tabla 4. Fraccionamiento de los extractos lipídicos de camarón y pulpo, utilizando cuatro procesos seriados de cromatografía en capa fina (CCF).

Cromatografía	Rf (camarón)	Rf (pulpo)
CCF4	RB2.3.1 = 0 - 0.23 RB2.3.2 = 0.23 - 0.74 RB2.3.3 = 0.74 - 1	RB2.1.1 = 0 - 0.22 RB2.1.2 = 0.22 - 0.68 RB2.1.3 = 0.68 - 1
CCF5	RB2.3.2.1 = 0 - 0.48 RB2.3.2.2 = 0.48 - 0.78 RB2.3.2.3 = 0.78 - 1	RB 2.1.3.1 = 0 - 0.85 RB2.1.3.2 = 0.85 - 0.94 RB2.1.3.3 = 0.94 - 1
CCF6	RB2.3.2.3BA = 0.88 - 0.94 RB2.3.2.3BB = 0.94 - 1	RB2.1.3.2BA = 0.84 - 0.90 RB2.1.3.2BB = 0.90 - 1
CCF7	RB2.3.2.3BB2 = 0.94 - 1	RB2.1.3.2BA1 = 0.90 - 1

Rf: migración relativa de la fase móvil. CCF4, CCF5, CCF6, CCF7: Cromatografía en capa fina 4, 5, 6 y 7 respectivamente, R: región, B: banda, Letra: Distribución de regiones en la primera etapa de aislamiento; Primer número: Distribución de regiones en la segunda etapa de aislamiento; Segundo número: Distribución de regiones en la tercera etapa de aislamiento y así sucesivamente.

En la figura 3 podemos observar que las regiones RB2.3.2 y RB2.3.3 mostraron mejor potencial antimutagénico, donde se puede observar que conforme el extracto se va diluyendo el potencial antimutagénico es menor, al igual que, el número de revertantes por placa; esto puede atribuirse a que los compuestos que realizan la función de quimioprotectores presentes en el extracto de camarón disminuyen y por tal motivo, el mutágeno control (AFB₁) se encontraba desarrollando su potencial mutagénico.

En cuanto a *Salmonella* TA 100, las mismas regiones anteriores presentaron actividad antimutagénica (Figura 4). De estas tres regiones se seleccionó la fracción RB2.3.2 para una quinta cromatografía, debido a que fue la región que mostró mejor relación dosis-respuesta en ambas cepas. La región RB2.3.2 fue extraída y llevada a una quinta cromatografía, sometiéndola al mismo procedimiento que el anterior. Se obtuvieron tres regiones con los siguientes Rfs: 0.00-0.48 (RB2.3.2.1), 0.48-0.78 (RB2.3.2.2), 0.78-1.00 (RB2.3.2.3) (Tabla 4).

Las tres regiones fueron extraídas de igual manera que en las cromatografías anteriores y se les determinó el potencial antimutagénico (Anexo 5 y 6). Haciendo una comparación entre estas regiones, se puede ver en las figuras 5 y 6 que la fracción RB2.3.2.3 fue la que mostró mayor potencial antimutagénico, donde se observó que cuando el extracto estaba concentrado, el potencial antimutagénico fue mayor; y conforme este se disminuiría, de la

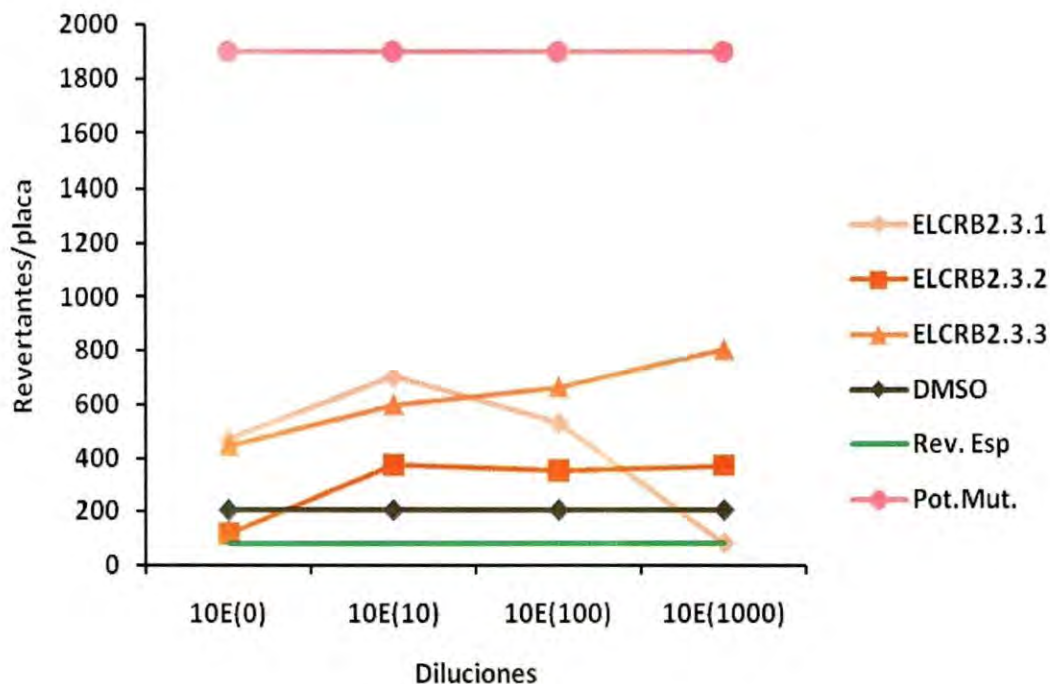


Figura 3. Potencial antimutagénico de camarón contaminado con 500 ng de aflatoxina B₁ (AFB₁), utilizando *Salmonella* TA98 con activación metabólica S9. Pot. Mut.: Potencial Mutagénico de 500 ng de aflatoxina B₁, Rev. Esp.: Revertantes Espontáneas, DMSO: Dimetil Sulfóxido, ELCRB2.3.1: Extracto Lipídico de Camarón Región B 2.3.1, ELCRB2.3.2: Extracto Lipídico de Camarón Región B 2.3.2, ELCRB2.3.3: Extracto Lipídico de Camarón Región B 2.3.3, Dilución: 10E(0): Muestra Concentrada, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E(10): Muestra diluida 10 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E(100): Muestra diluida 100 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E(1000): Muestra diluida 1000 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁.

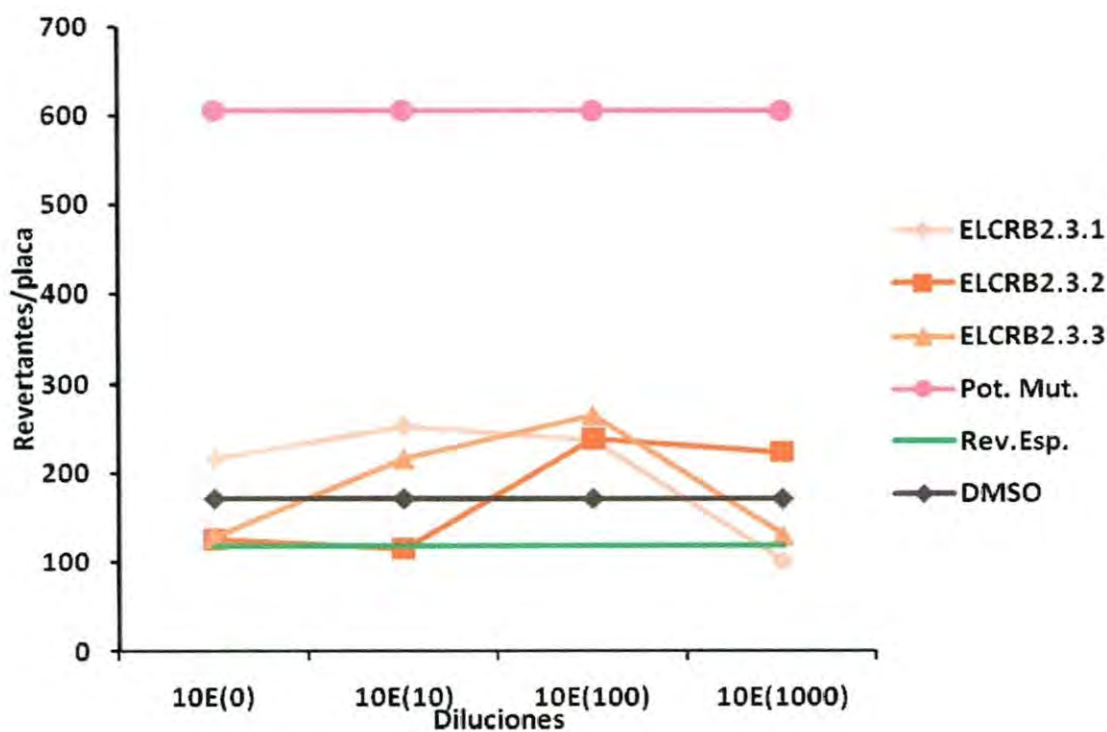


Figura 4. Potencial antimutagénico de camarón contaminado con 500 ng de aflatoxina B₁ (AFB₁), utilizando *Salmonella* TA100 con activación metabólica S9. Pot. Mut.: Potencial Mutagénico de 500 ng de aflatoxina B₁, Rev. Esp.: Revertantes Espontáneas, DMSO: Dimetil Sulfóxido, ELCRB2.3.1: Extracto Lipídico de Camarón Región B 2.3.1, ELCRB2.3.2: Extracto Lipídico de Camarón Región B 2.3.2, ELCRB2.3.3: Extracto Lipídico de Camarón Región B 2.3.3, Dilución: 10E(0): Muestra Concentrada, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E(10): Muestra diluida 10 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E(100): Muestra diluida 100 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E(1000): Muestra diluida 1000 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁.

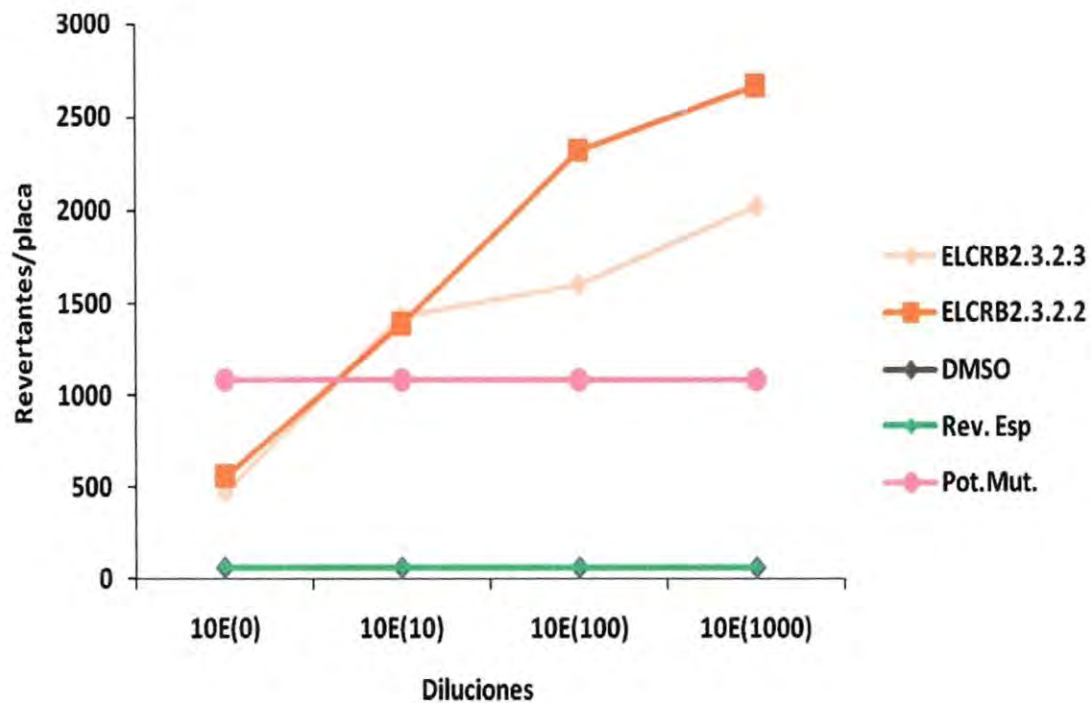


Figura 5. Potencial antimutagénico de camarón contaminado con 500 ng de aflatoxina B₁ (AFB₁), utilizando *Salmonella* TA98 con activación metabólica S9. Pot. Mut.: Potencial Mutagénico de 500 ng de aflatoxina B₁, Rev. Esp.: Revertantes Espontáneas, DMSO: Dimetil Sulfóxido, ELCRB2.3.2.3: Extracto Lipídico de Camarón Región B 2.3.2.3, ELCRB2.3.2.2: Extracto Lipídico de Camarón Región B 2.3.2.2, Dilución: 10E (0): Muestra Concentrada, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E (10): Muestra diluida 10 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E(100): Muestra diluida 100 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E(1000): Muestra diluida 1000 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁.

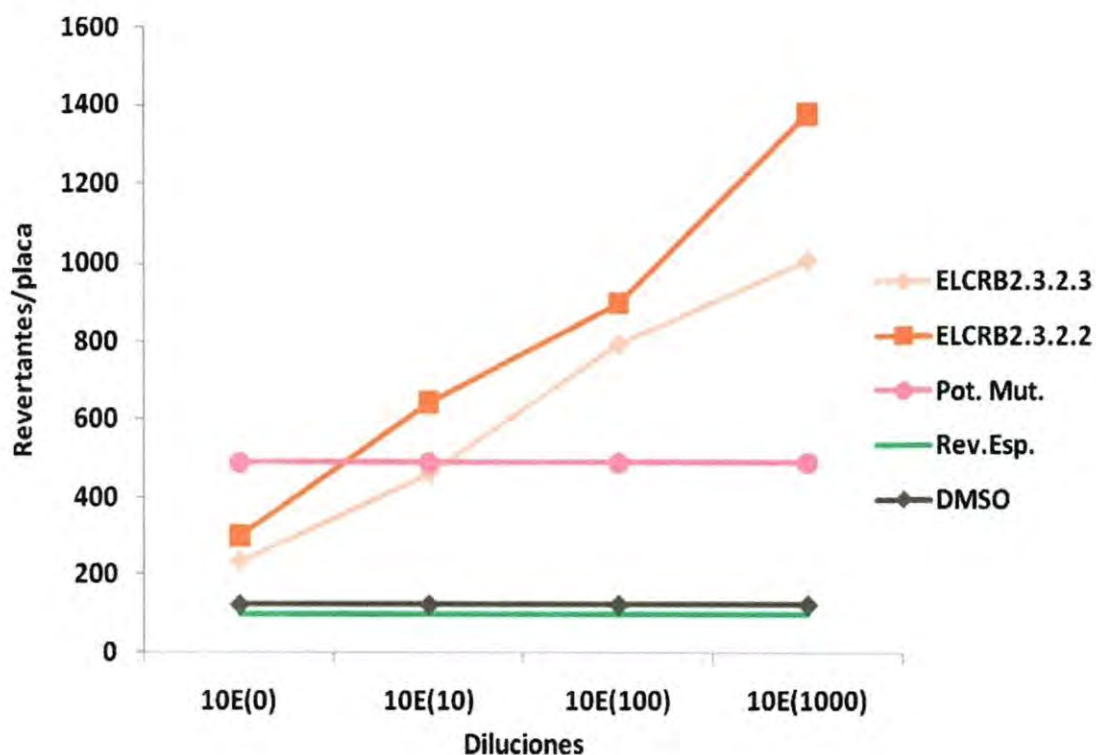


Figura 6. Potencial antimutagénico de camarón contaminado con 500 ng de aflatoxina B₁ (AFB₁), utilizando *Salmonella* TA100 con activación metabólica S9. Pot. Mut.: Potencial Mutagénico de 500 ng de aflatoxina B₁, Rev. Esp.: Revertantes Espontáneas, DMSO: Dimetil Sulfóxido, ELCRB2.3.2.3: Extracto Lipídico de Camarón Región B 2.3.2.3, ELCRB2.3.2.2: Extracto Lipídico de Camarón Región B 2.3.2.2, Dilución: 10E (0): Muestra Concentrada, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E (10): Muestra diluida 10 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E (100): Muestra diluida 100 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E (1000): Muestra diluida 1000 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁.

misma manera el potencial antimutagénico fue menor. Esto debido a que los compuestos quimioprotectores presentes en la muestra se diluían y por lo tanto el mutágeno control mostraba su potencial mutagénico. Esta región (RB2.3.2.3) se sometió a una sexta cromatografía, siguiendo el mismo procedimiento que las anteriores. De esta región se obtuvieron dos regiones con los siguientes Rfs: 0.88-0.94 (RB2.3.2.3BA), 0.94-1.00 (RB2.3.2.3BB) (Tabla 4). Las dos regiones fueron extraídas de la misma manera que las anteriores y de igual forma se les determinó el potencial antimutagénico (Anexo 9 y 10).

En las figuras 7 y 8 se puede observar que la fracción RB2.3.2.3BB presentó mayor potencial antimutagénico en ambas cepas, en donde se observó que cuando el extracto estaba concentrado, el potencial antimutagénico fue mayor, y conforme decrecía el potencial antimutagénico también fue menor. Esto debido a que los compuestos presentes en el extracto de camarón se diluían, y por lo tanto, el mutágeno control ejercía su potencial mutagénico. Esta región (RB2.3.2.3BB) se sometió a una séptima cromatografía, siguiendo el mismo procedimiento que los anteriores. De esta región se obtuvo una sola fracción con un Rf: 0.94-1.00 (RB2.3.2.3BB2), en la cual se observó que esta fracción llegó a su purificación total, encontrando así una fracción antimutagénica de camarón, lista para su caracterización.

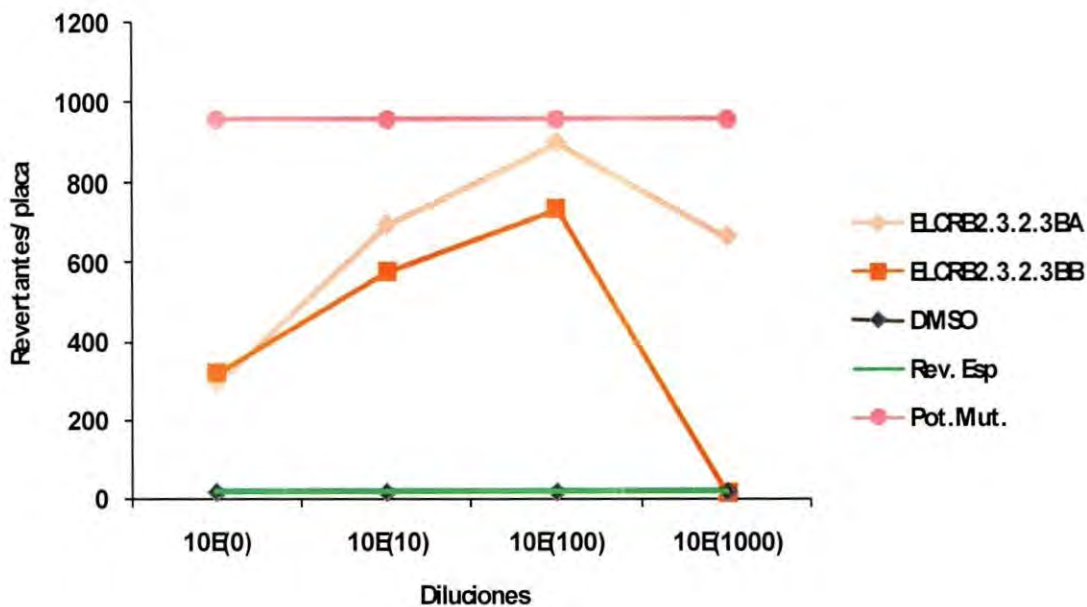


Figura 7. Potencial antimutagénico de camarón contaminado con 500 ng de aflatoxina B₁ (AFB₁), utilizando *Salmonella* TA98 con activación metabólica S9. Pot. Mut.: Potencial Mutagénico de 500 ng de aflatoxina B₁, Rev. Esp.: Revertantes Espontáneas, DMSO: Dimetil Sulfoxido, ELCRB2.3.2.3BA: Extracto Lipídico de Camarón Región B 2.3.2.3BA, ELCRB2.3.2.3BB: Extracto Lipídico de Camarón Región B 2.3.2.3BB, Dilución: 10E (0): Muestra Concentrada, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E (10): Muestra diluida 10 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E (100): Muestra diluida 100 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E (1000): Muestra diluida 1000 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁.

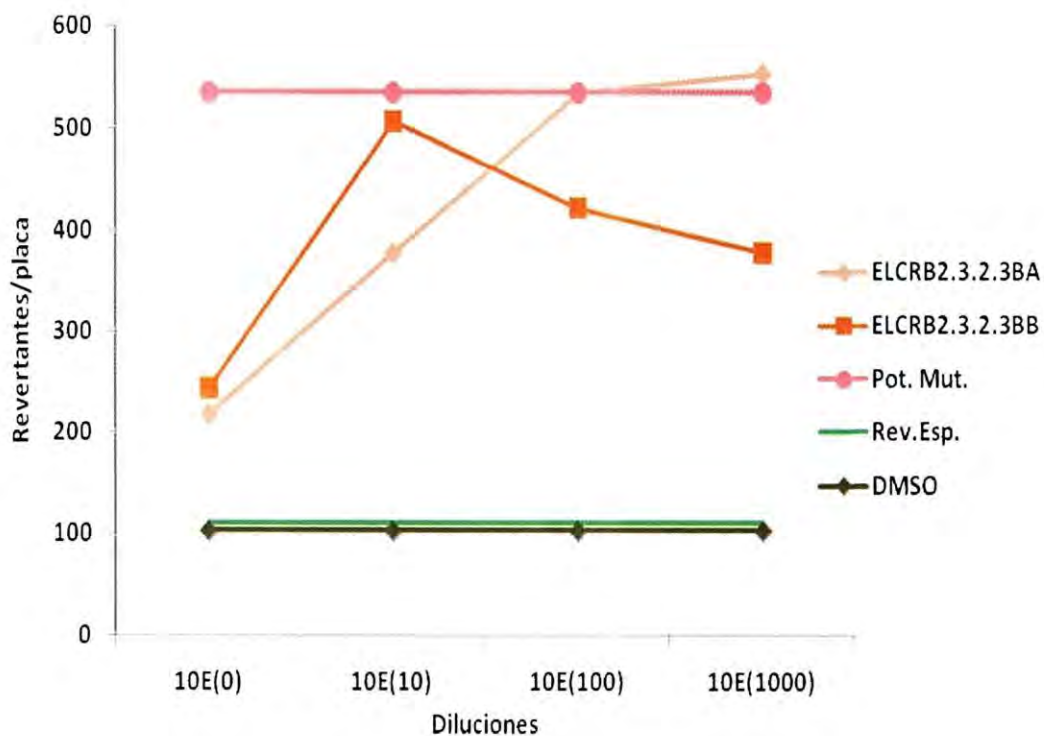


Figura 8. Potencial antimutagénico de camarón contaminado con 500 ng de aflatoxina B₁ (AFB₁), utilizando *Salmonella* TA100 con activación metabólica S9. Pot. Mut.: Potencial Mutagénico de 500 ng de aflatoxina B₁, Rev. Esp.: Revertantes Espontáneas, DMSO: Dimetil Sulfoxido, ELCRB2.3.2.3BA: Extracto Lipídico de Camarón Región B 2.3.2.3BA, ELCRB2.3.2.3BB: Extracto Lipídico de Camarón Región B 2.3.2.3BB, Dilución: 10E (0): Muestra Concentrada, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E (10): Muestra diluida 10 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E (100): Muestra diluida 100 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E (1000): Muestra diluida 1000 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁.

Para el aislamiento de los factores antimutagénicos de pulpo se siguió la misma metodología que en camarón. En la CCF4 se obtuvieron tres regiones con los siguientes Rfs: 0.00-0.22 (RB2.1.1), 0.22-0.68 (RB2.1.2), 0.68-1.00 (RB2.1.3) (Tabla 4). Las tres regiones se extrajeron con cloroformo-acetona (9:1 v/v) y se disolvieron con dimetilsulfóxido (DMSO) para determinar el potencial antimutagénico (Anexo 3 y 4).

En la figura 9 se puede observar que de las tres regiones obtenidas de la CCF4, la RB2.1.2 y RB2.1.3 fueron las que mostraron mejor potencial antimutagénico, y conforme el extracto se va diluyendo el potencial antimutagénico es menor. Esto puede atribuirse como en el caso del camarón, a los compuestos que realizan la función quimioprotectora disminuyen a medida que se diluyen en la muestra los compuestos activos, dejando actuar libremente al mutágeno control (AFB₁).

En cuanto a la cepa de *Salmonella* TA100, las mismas regiones anteriores presentaron actividad antimutagénica (Figura 10). De estas tres regiones se decidió trabajar con la fracción RB2.1.3 para una quinta cromatografía, ya que mostró una mejor relación dosis-respuesta. La región RB2.1.3 fue extraída y llevada a una quinta cromatografía, sometiéndola al mismo procedimiento que la anterior, obteniéndose tres regiones con los siguientes Rfs: 0.00-0.85 (RB2.1.3.1), 0.85-0.94 (RB2.1.3.2), 0.94-1.00 (RB2.1.3.3) (Tabla 4).

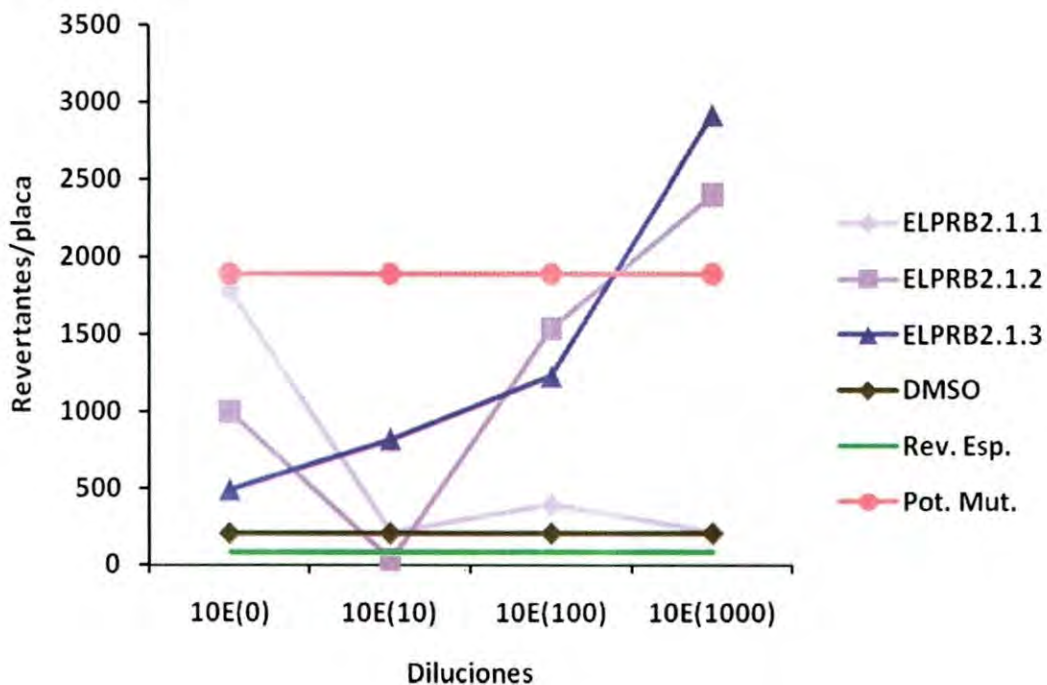


Figura 9. Potencial antimutagénico de pulpo contaminado con 500 ng de aflatoxina B₁ (AFB₁), utilizando *Salmonella* TA98 con activación metabólica S9. Pot. Mut.: Potencial Mutagénico de 500 ng de aflatoxina B₁, Rev. Esp.: Revertantes Espontáneas, DMSO: Dimetil Sulfóxido, ELPRB2.1.1: Extracto Lipídico de Pulpo Región B 2.1.1, ELPRB2.1.2: Extracto Lipídico de Pulpo Región B 2.1.2, ELPRB2.1.3: Extracto Lipídico de Pulpo Región B 2.1.3, Dilución: 10E(0): Muestra Concentrada, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E(10): Muestra diluida 10 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E(100): Muestra diluida 100 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E(1000): Muestra diluida 1000 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁

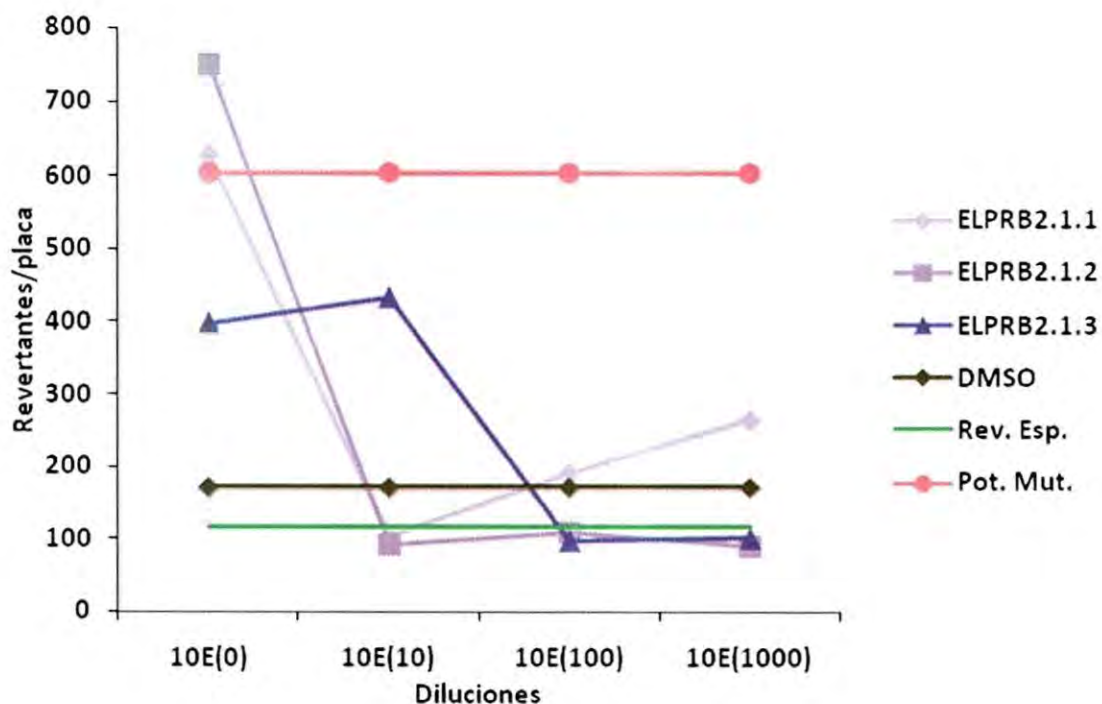


Figura 10. Potencial antimutagénico de pulpo contaminado con 500 ng de aflatoxina B₁ (AFB₁), utilizando *Salmonella* TA100 con activación metabólica S9. Pot. Mut.: Potencial Mutagénico de 500 ng de aflatoxina B₁, Rev. Esp.: Revertantes Espontáneas, DMSO: Dimetil Sulfóxido, ELPRB2.1.1: Extracto Lipídico de Pulpo Región B 2.1.1, ELPRB2.1.2: Extracto Lipídico de Pulpo Región B 2.1.2, ELPRB2.1.3: Extracto Lipídico de Pulpo Región B 2.1.3, Dilución: 10E(0): Muestra Concentrada, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E(10): Muestra diluida 10 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E(100): Muestra diluida 100 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E(1000): Muestra diluida 1000 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁.

Las regiones fueron extraídas de la misma manera que en cromatografías anteriores y se les determinó el potencial antimutagénico (Anexo 7 y 8). En las figuras 11 y 12 se puede observar que la fracción RB2.1.3.2 fue la que mostró la mejor relación dosis-respuesta, ya que cuando el extracto estaba concentrado, la actividad antimutagénica fue mayor. Al diluirse el extracto, dicha actividad se vió atenuada, dejando de esta manera que el mutágeno control (AFB₁) actuara libremente. La región RB2.1.3.2 fue llevada a una sexta cromatografía, siguiendo el mismo procedimiento que las anteriores. De esta región se obtuvieron dos regiones con los siguientes Rfs: 0.84-0.90 (RB2.1.3.2BA), 0.90-1.00 (RB2.1.3.2BB) (Tabla 4).

Las regiones fueron extraídas de la misma manera que en las cromatografías anteriores y se les determinó el potencial antimutagénico (Anexo 11 y 12). En las figuras 13 y 14 se puede observar que la fracción RB2.1.3.2BA fue la que mostró mejor relación dosis-respuesta, ya que cuando el extracto estaba concentrado la actividad antimutagénica fue mayor, y al diluirse el extracto, la actividad se debilitó, dejando de esta manera que el mutágeno control (AFB₁) actuara libremente. La región RB2.1.3.2BA fue llevada a una séptima cromatografía, siguiendo el mismo procedimiento que las anteriores. De esta región se obtuvo una sola fracción con el siguiente Rf: 0.90-1.00 (RB2.1.3.2BA), en la cual se observó que esta fracción llegó a su purificación total, encontrando así una fracción antimutagénica de pulpo, lista para su caracterización.

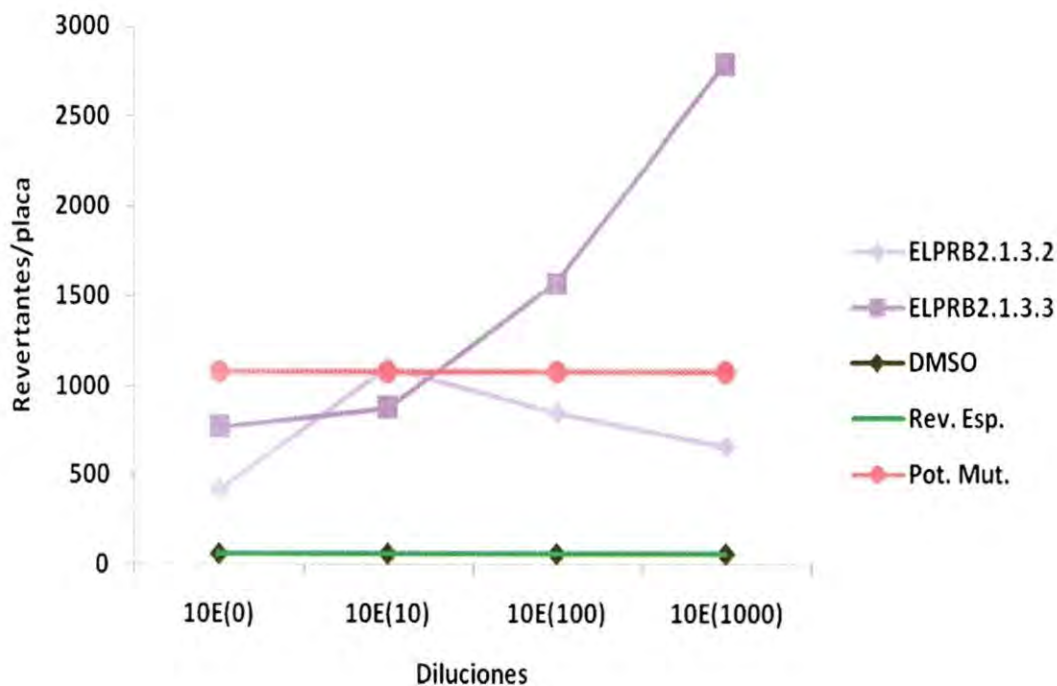


Figura 11. Potencial antimutagénico de pulpo contaminado con 500 ng de aflatoxina B₁ (AFB₁), utilizando *Salmonella* TA98 con activación metabólica S9. Pot. Mut.: Potencial Mutagénico de 500 ng de aflatoxina B₁, Rev. Esp.: Revertantes Espontáneas, DMSO: Dimetil Sulfóxido, ELPRB2.1.3.2: Extracto Lipídico de Pulpo Región B 2.1.3.2, ELPRB2.1.3.3: Extracto Lipídico de Pulpo Región B 2.1.3.3, Dilución: 10E (0): Muestra Concentrada, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E (10): Muestra diluida 10 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E (100): Muestra diluida 100 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E (1000): Muestra diluida 1000 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁.

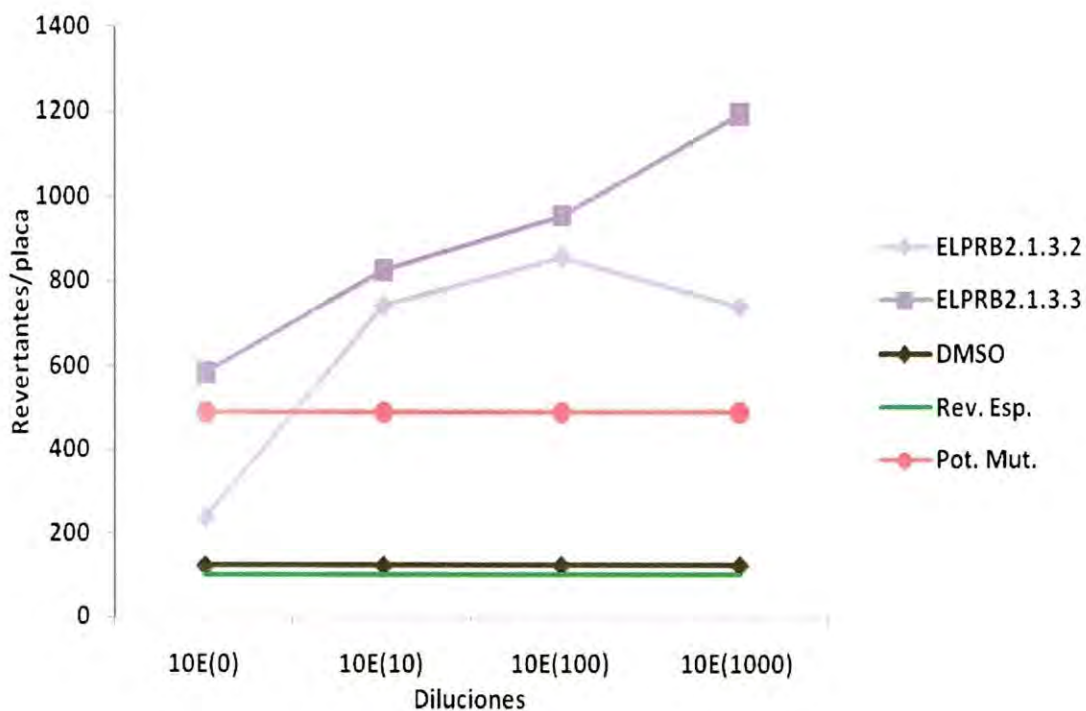


Figura 12. Potencial antimutagénico de pulpo contaminado con 500 ng de aflatoxina B₁ (AFB₁), utilizando *Salmonella* TA100 con activación metabólica S9. Pot. Mut.: Potencial Mutagénico de 500 ng de aflatoxina B₁, Rev. Esp.: Revertantes Espontáneas, DMSO: Dimetil Sulfóxido, ELPRB2.1.3.2: Extracto Lipídico de Pulpo Región B 2.1.3.2, ELPRB2.1.3.3: Extracto Lipídico de Pulpo Región B 2.1.3.3, Dilución: 10E (0): Muestra Concentrada, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E (10): Muestra diluida 10 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E (100): Muestra diluida 100 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E (1000): Muestra diluida 1000 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁.

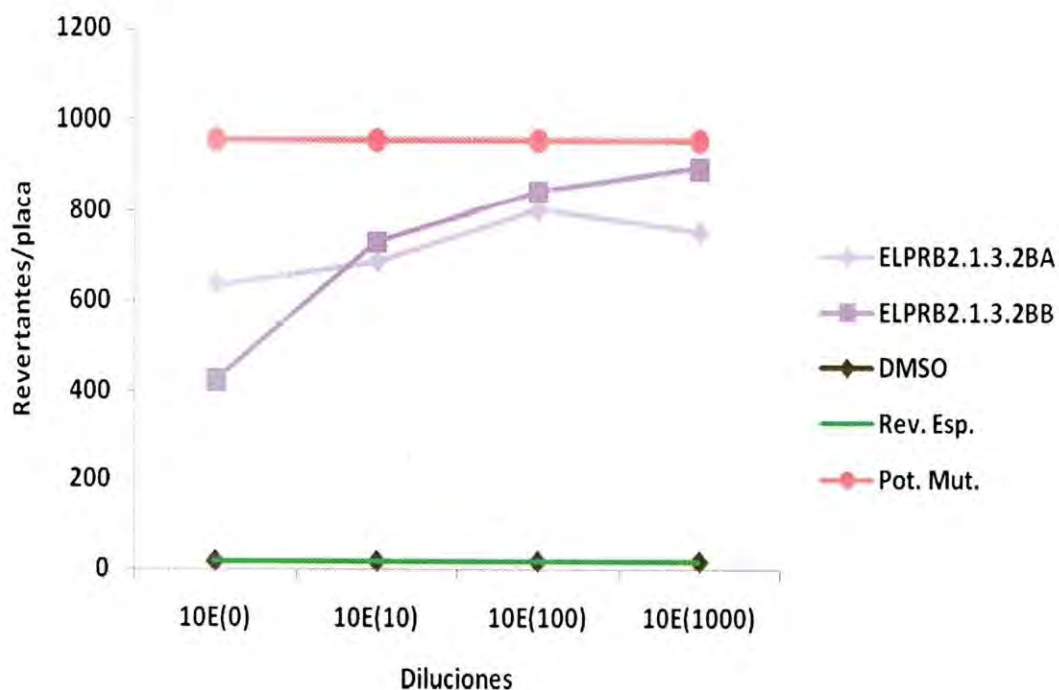


Figura 13. Potencial antimutagénico de pulpo contaminado con 500 ng de aflatoxina B₁ (AFB₁), utilizando *Salmonella* TA98 con activación metabólica S9. Pot. Mut.: Potencial Mutagénico de 500 ng de aflatoxina B₁, Rev. Esp.: Revertantes Espontáneas, DMSO: Dimetil Sulfoxido, ELPRB2.1.3.2BA: Extracto Lipídico de Pulpo Región B 2.1.3.2BA, ELPRB2.1.3.2BB: Extracto Lipídico de Pulpo Región B 2.1.3.2BB, Dilución: 10E (0): Muestra Concentrada, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E (10): Muestra diluida 10 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E (100): Muestra diluida 100 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E (1000): Muestra diluida 1000 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁

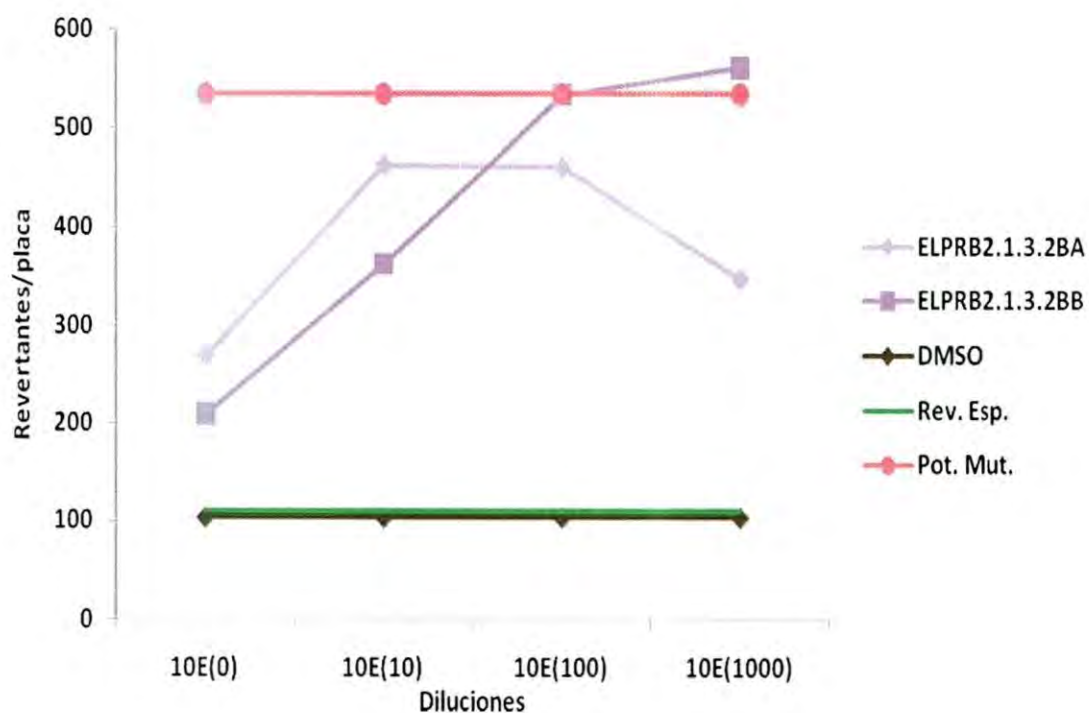


Figura 14. Potencial antimutagénico de pulpo contaminado con 500 ng de aflatoxina B₁ (AFB₁), utilizando *Salmonella* TA100 con activación metabólica S9. Pot. Mut.: Potencial Mutagénico de 500 ng de aflatoxina B₁, Rev. Esp.: Revertantes Espontáneas, DMSO: Dimetil Sulfoxido, ELPRB2.1.3.2BA: Extracto Lipídico de Pulpo Región B 2.1.3.2BA, ELPRB2.1.3.2BB: Extracto Lipídico de Pulpo Región B 2.1.3.2BB, Dilución: 10E (0): Muestra Concentrada, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E (10): Muestra diluida 10 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E (100): Muestra diluida 100 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁, 10E (1000): Muestra diluida 1000 veces, contaminada con 500 ng de AFB₁

De las siete cromatografías realizadas a los extractos de camarón y pulpo, se obtuvieron al menos dos fracciones diferentes con potencial antimutagénico. Esto indica la presencia de al menos dos compuestos con actividad quimioprotectora. Estos resultados están respaldados por otras investigaciones, donde se han encontrado compuestos con facultades anti-neoplásicas en una serie de organismos marinos (Yang, 2000). Estos efectos es el resultado de una suplementación con aceite de pescado (omega-3) en líneas celulares de cáncer colo-rectal (Augustsson, 2003).

La cantidad de lípidos en estas especies marinas es de aproximadamente 7-9 % en el caso de camarón y 0.54 % en pulpo (SAGARPA, 2005; Hernández y col., 1987) se conoce de la presencia de cantidades significantes de ácidos grasos poliinsaturados (AGP) los cuales pueden llegar a representar un buen porcentaje en algunas especies de camarón (De Moura y col., 2002), encontrándose cantidades significativas de AGP del tipo omega-3 (Mura y col., 2002). Turner y col. (2000), reportan en el pulpo *Octopus vulgaris*, cantidades altas de AGP omega-3, los cuales son un componente terapéutico altamente solicitado ya que están asociados con la reducción en el crecimiento y en la incidencia de ciertos tipos de cáncer (Jenski y col., 1995; Sakaguchi y col., 1994) y que es encontrado casi exclusivamente en alimentos del mar.

La astaxantina es el pigmento más abundante de crustáceos y algunos peces. Pertenece al importante grupo de los terpenoides, la cual tiene actividad quimioprotectora protegiendo a la célula de los productos tóxicos de su

metabolismo, como lo son los radicales libres, peróxido de lípidos y otros productos oxidativos (Mercke-Odeberg y col., 2003; Guerin, 2001).

Actividad Antiproliferativa sobre las Líneas Celulares M12.A^k y L-929 de Origen Murino

En este estudio se presentan los resultados a partir de la cromatografía cuatro, tanto para camarón como para pulpo, ya que en estudios anteriores (Wilson, 2006) se detectó actividad antiproliferativa en la cromatografía tres en la región RA3.3 para el caso del camarón (Figura 15) y RC2.2 para el pulpo (Figura 16), pero no se obtuvo una purificación total de estos compuestos. A partir de estas regiones reportadas y los valores de R_f (migración relativa de la fase móvil) en la cromatografía tres, se procedió a continuar con la purificación de estos compuestos antiproliferativos. Los valores de R_f y regiones reportadas por Wilson y colaboradores en el 2006, fueron reproducidos en este trabajo como se muestran en la tabla 5 y 6.

Para evaluar la actividad antiproliferativa de los extractos lipídicos de camarón y pulpo, se utilizaron dos diferentes líneas celulares de origen murino (ratón), M12.A^k (linfoma de células B) y L-929 (tejido conjuntivo "normal").

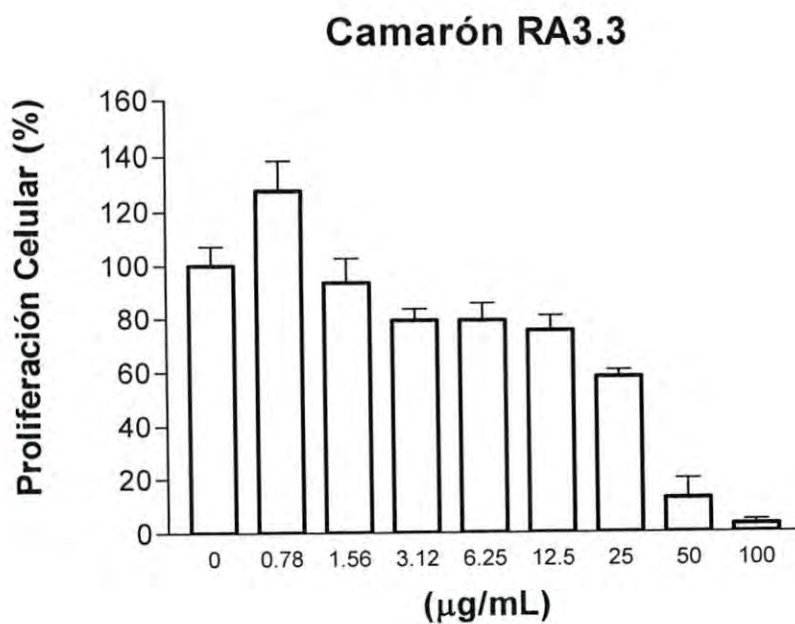


Figura 15. Actividad antiproliferativa de la región obtenida de la CCF3 de camarón sobre la línea celular M12.A^K. RA: Región A. La proliferación celular se evaluó a las 48 h posteriores a la adición del extracto al cultivo celular. Los extractos se evaluaron a las concentraciones de 0-100 µg/mL. Como cultivos control se utilizaron cultivos celulares en presencia de la máxima concentración de solvente utilizada para disolver los extractos (0.5% de DMSO).

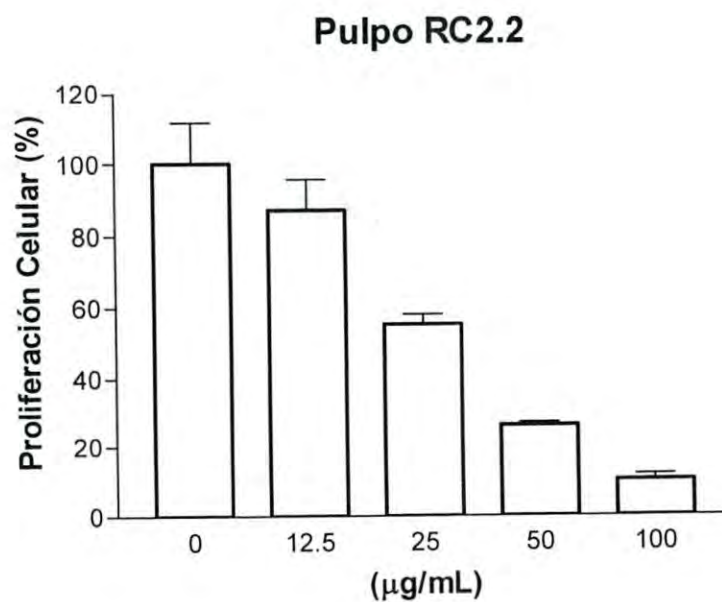


Figura 16. Actividad antiproliferativa de la región obtenida de la CCF3 de pulpo sobre la línea celular M12.A^K. RC: Región C. La proliferación celular se evaluó a las 48 h posteriores a la adición del extracto al cultivo celular. Los extractos se evaluaron a las concentraciones de 0-100 µg/mL. Como cultivos control se utilizaron cultivos celulares en presencia de la máxima concentración de solvente utilizada para disolver los extractos (0.5% de DMSO).

Tabla 5. Fraccionamiento del extracto de camarón, utilizando tres procesos seriados de cromatografía en capa fina (CCF) para el análisis de la actividad antiproliferativa.

Cromatografía	Rf (Wilson, 2006)	Rf
CCF1	RA= 0 - 0.29 RB= 0.29 - 0.71 RC= 0.71 - 1	RA= 0 - 0.29 RB= 0.29 - 0.70 RC= 0.70 - 1
CCF2	RA1= 0 - 0.26 RA2= 0.26 - 0.68 RA3= 0.68 - 1	RA1= 0 - 0.26 RA2= 0.26 - 0.68 RA3= 0.68 - 1
CCF3	RA3.1= 0 - 0.13 RA3.2= 0.63 - 0.84 RA3.3= 0.84 - 1	RA3.1= 0 - 0.13 RA3.2= 0.63 - 0.84 RA3.3= 0.84 - 1

Rf: migración relativa de la fase móvil. CCF1, CCF2, CCF3: Cromatografía en capa fina 1, 2, y 3, respectivamente, R: región, B: banda, Letra: Distribución de regiones en la primera etapa de aislamiento; Primer número: Distribución de regiones en la segunda etapa de aislamiento; Segundo número: Distribución de regiones en la tercera etapa de aislamiento.

Tabla 6. Fraccionamiento del extracto de pulpo, utilizando tres procesos seriados de cromatografía en capa fina (CCF) para el análisis de la actividad antiproliferativa.

Cromatografía	Rf (Wilson, 2006)	Rf
CCF1	RA= 0 - 0.29 RB= 0.29 - 0.71 RC= 0.71 - 1	RA= 0 - 0.32 RB= 0.32 - 0.63 RC= 0.63 - 1
CCF2	RC1= 0 - 0.26 RC2= 0.26 - 0.68	RC1= 0 - 0.7 RC2= 0.7 - 1
CCF3	RC2.1= 0 - 0.13 RC2.2= 0.63 - 0.74 RC2.3= 0.74 - 0.8 RC2.4= 0.8 - 1	RC2.1= 0 - 0.13 RC2.2= 0.13 - 0.74 RC2.3= 0.74 - 0.8 RC2.4= 0.8 - 1

Rf: migración relativa de la fase móvil. CCF1, CCF2, CCF3: Cromatografía en capa fina 1, 2, y 3, respectivamente, R: región, B: banda, Letra: Distribución de regiones en la primera etapa de aislamiento; Primer número: Distribución de regiones en la segunda etapa de aislamiento; Segundo número: Distribución de regiones en la tercera etapa de aislamiento.

Dichos extractos se estudiaron a una concentración de 0-100 $\mu\text{g/mL}$, evaluando la proliferación celular mediante el método colorimétrico de MTT a las 48 h de incubación con los extractos.

Aislamiento de Factores Antiproliferativos

Para el aislamiento de los factores con actividad antiproliferativa, los extractos lipídicos se fraccionaron por medio de cromatografía en capa fina, siguiendo el procedimiento descrito para aislamiento de los factores antimutagénicos. En la cuarta cromatografía (CCF4) para el extracto de camarón, se observaron dos regiones con los siguientes Rfs: 0-0.19 (RA3.3.1), 0.77- 1 (RA3.3.2) (Tabla 7). Las dos regiones se extrajeron con cloroformo:acetona (9:1) y se disolvieron con dimetil sulfóxido (DMSO) para obtener una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$. Partiendo de esta concentración se prepararon las siguientes diluciones seriadas: 100, 50, 25, 12.5 $\mu\text{g/mL}$, para determinar el potencial antiproliferativo sobre las líneas celulares M12.A^K y L-929.

Tabla 7. Fraccionamiento de los extractos lipídicos de camarón y pulpo, mediante cuatro procesos seriados de cromatografía de capa fina (CCF) para el análisis de la actividad antiproliferativa.

Cromatografía	Rf (camarón)	Rf (pulpo)
CCF4	RA3.3.1 = 0 - 0.19 RA3.3.2 = 0.77 - 1	RC2.2.1 = 0 - 0.125 RC2.2.2 = 0.87 - 0.93 RC2.2.3 = 0.93 - 1
CCF5	RA3.3.2.1 = 0 - 0.09 RA3.3.2.2 = 0.75 - 0.875 RA3.3.2.3 = 0.875 - 1	RC2.2.2.1 = 0 - 0.11 RC2.2.2.2 = 0.73 - 0.88 RC2.2.2.3 = 0.88 - 1
CCF6	RA3.3.2.3.1 = 0.0 - 0.06 RA3.3.2.3.2 = 0.06 - 0.33 RA3.3.2.3.3 = 0.88 - 1	RC2.2.2.3.1 = 0.0 - 0.23 RC2.2.2.3.2 = 0.88 - 0.94 RC2.2.2.3.3 = 0.94 - 1
CCF7	RA3.3.2.3.3B = 0.8 - 1	RC2.2.2.3.3 = 0.82 - 1

Rf: migración relativa de la fase móvil. CCF4, CCF5, CCF6, CCF7: Cromatografía en capa fina 4, 5, 6 y 7 respectivamente, R: región, B: banda, Letra: Distribución de regiones en la primera etapa de aislamiento; Primer número: Distribución de regiones en la segunda etapa de aislamiento; Segundo número: Distribución de regiones en la tercera etapa de aislamiento y así sucesivamente.

En la figura 17 se puede observar el efecto de las dos fracciones obtenidas de la CCF4 del extracto de camarón sobre la línea celular M12.A^K, la cual fue susceptible a las dos fracciones de camarón. El extracto RA3.3.2 presentó actividad antiproliferativa en todas las concentraciones, mientras que el extracto RA3.3.1 solo presentó actividad significativa a la concentración de 100 y 50 µg/mL. Por lo tanto, a la fracción RA3.3.2 se le determinó el potencial antiproliferativo sobre la línea celular L-929, que es la "normal" de ratón, observando que no hubo efecto antiproliferativo a las concentraciones estudiadas, teniéndose porcentajes de antiproliferación similares al control (Figura 18).

Con relación al efecto antiproliferativo de los extractos de pulpo, en la Figura 19, se aprecia que las tres regiones muestran un efecto antiproliferativo en todas las concentraciones. No obstante, la región RC2.2.2 presentó mejor efecto dosis-respuesta; esto indica que cuando el extracto de pulpo se encontraba en su más alta concentración, presenta un mayor efecto antiproliferativo sobre la línea celular M12.A^K y dicho efecto se fue atenúa conforme el (los) compuesto (s) antiproliferativos presentes en el medio de cultivo se iban disminuyendo. Al igual que los extractos marinos estudiados en este trabajo, Gerwick y col. (1997), encontraron potentes propiedades antiproliferativas en un pigmento de origen lipídico (Curacin A), obtenido de las algas azul-verde, cuyo mecanismo de acción es evitar la mitosis de células tumorales.

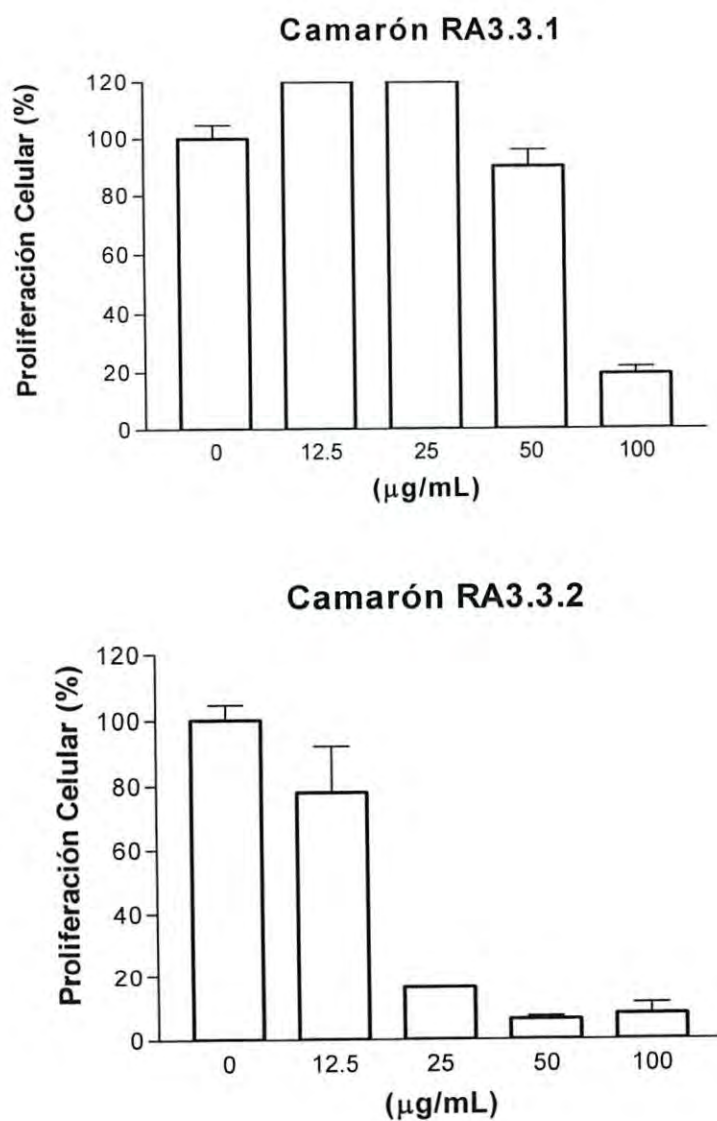


Figura 17. Actividad antiproliferativa de las regiones obtenidas de la CCF4 de camarón sobre la línea celular M12.A^K. RA: Región A. La proliferación celular se evaluó a las 48 h posteriores a la adición del extracto al cultivo celular. Los extractos se evaluaron a las concentraciones de 0-100 µg/mL. Como cultivos control se utilizaron cultivos celulares en presencia de la máxima concentración de solvente utilizada para disolver los extractos (0.5% de DMSO).

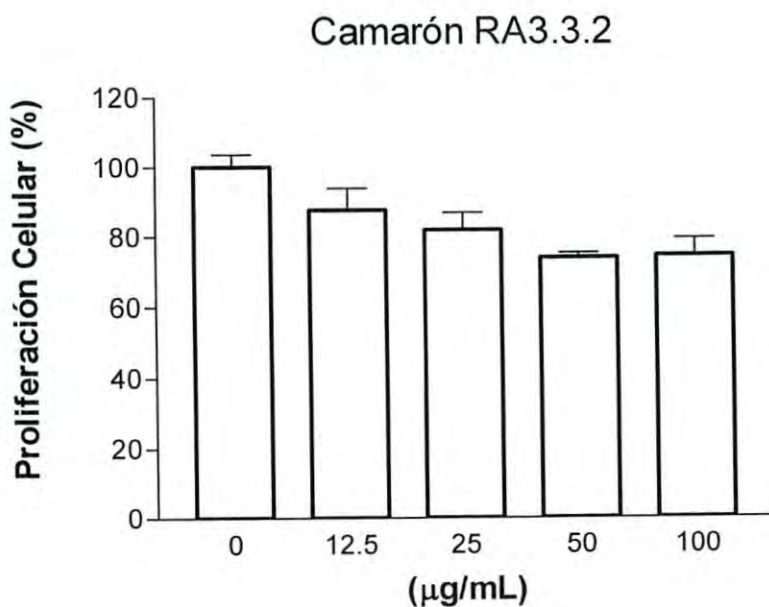


Figura 18. Actividad antiproliferativa de la región obtenida de la CCF4 de camarón sobre la línea celular L-929. RA: Región A. La proliferación celular se evaluó a las 48 h posteriores a la adición del extracto al cultivo celular. Los extractos se evaluaron a las concentraciones de 0-100 µg/mL. Como cultivos control se utilizaron cultivos celulares en presencia de la máxima concentración de solvente utilizada para disolver los extractos (0.5% de DMSO).

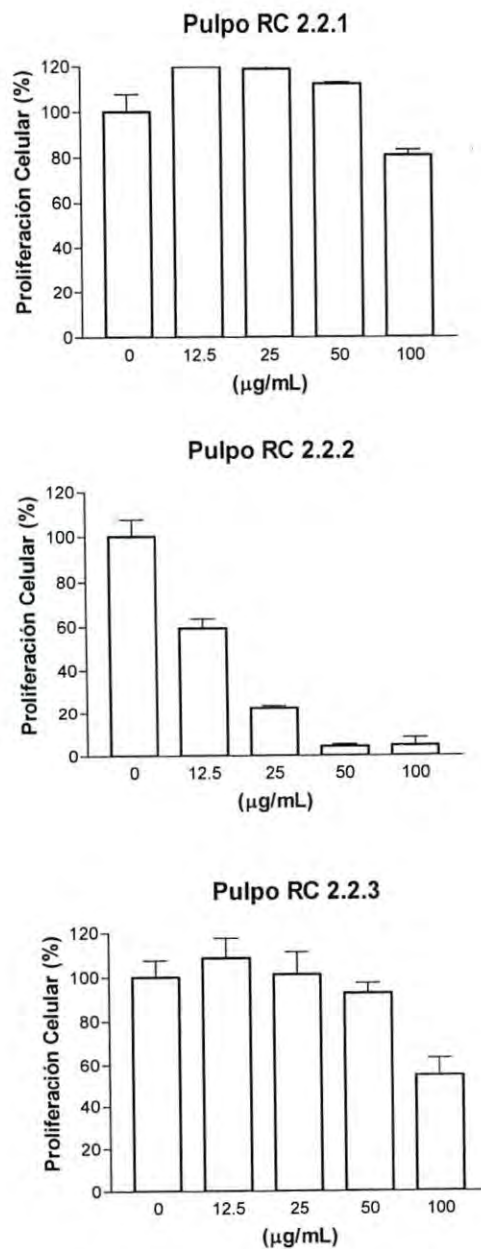


Figura 19. Actividad antiproliferativa de las regiones obtenidas de la CCF4 de pulpo sobre la línea celular M12.A^K. RC: Región C. La proliferación celular se evaluó a las 48 h posteriores a la adición del extracto al cultivo celular. Los extractos se evaluaron a las concentraciones de 0-100 µg/mL. Como cultivos control se utilizaron cultivos celulares en presencia de la máxima concentración de solvente utilizada para disolver los extractos (0.5% de DMSO).

Por lo tanto, a la fracción RC2.2.2, se le determinó el potencial antiproliferativo sobre la línea celular L-929, que es la "normal" de ratón, en donde se observa que no hubo efecto antiproliferativo a las concentraciones estudiadas, teniéndose porcentajes de antiproliferación similares a los del control (Figura 20).

Las regiones que se extrajeron y llevaron a una quinta cromatografía fueron: RA3.3.2 proveniente de camarón y RC2.2.2 para el caso de pulpo. Estas se sometieron al mismo procedimiento. Al realizar la CCF5 se observaron las siguientes regiones y Rfs: 0-0.09 (RA3.3.2.1), 0.75-0.875 (RA3.3.2.2), 0.875-1.0 (RA3.3.2.3) y 0-0.11 (RC2.2.2.1), 0.73-.88 (RC2.2.2.2), 0.88-1.0 (RC2.2.2.3) para camarón y pulpo, respectivamente (Tabla 7). En cada una de las regiones se extrajo y analizó su potencial antiproliferativo.

En las figuras 21 y 22 se muestra el efecto de los extractos marinos de camarón y pulpo sobre la línea M12.A^K. Los extractos de camarón RA3.3.2.1 y RA3.3.2.2 no muestran efecto antiproliferativo sobre la línea celular M12.A^K, mientras que la RA3.3.2.3 posee potencial antiproliferativo en todas sus concentraciones.

De los extractos provenientes de pulpo, sólo la región RC2.2.2.3 es la que presenta mejor potencial antiproliferativo sobre la línea celular M12.A^K. Así como en los crustáceos (camarón) y algunos moluscos (pulpo), también existen cantidades considerables de AGP omega-3 (EPA y DHA) en algunas algas comestibles. Rosa y col. (2005) encontraron que los extractos lipídicos

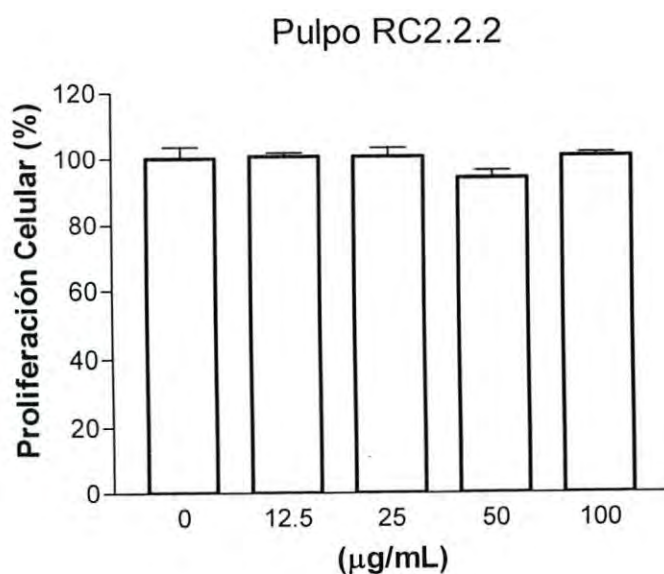


Figura 20. Actividad antiproliferativa de la región obtenida de la CCF4 de pulpo sobre la línea celular L-929. RC: Región C. La proliferación celular se evaluó a las 48 h posteriores a la adición del extracto al cultivo celular. Los extractos se evaluaron a las concentraciones de 0-100 µg/mL. Como cultivos control se utilizaron cultivos celulares en presencia de la máxima concentración de solvente utilizada para disolver los extractos (0.5% de DMSO).

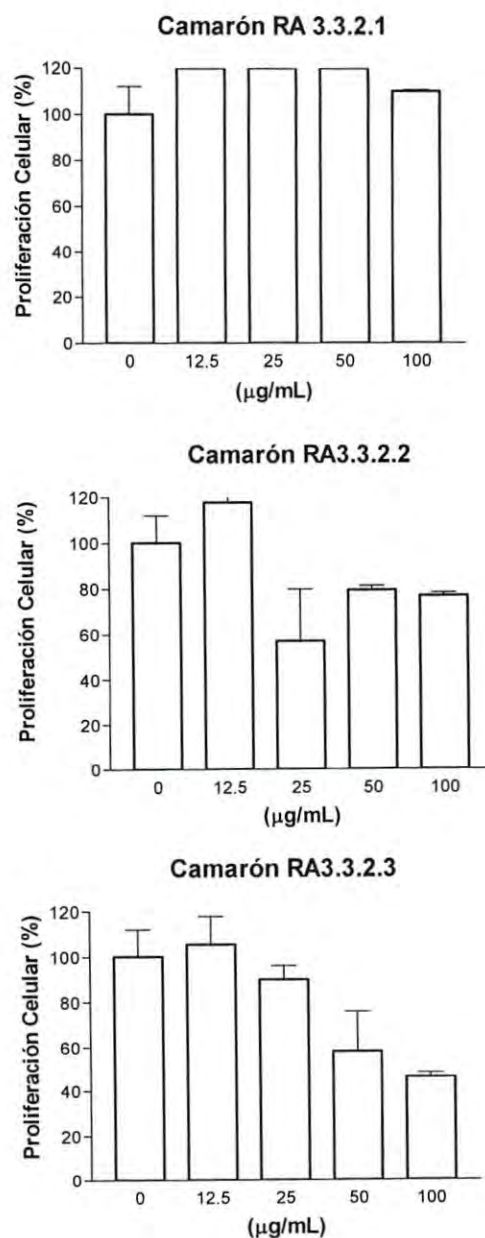


Figura 21. Actividad antiproliferativa de las regiones obtenidas de la CCF5 de camarón sobre la línea celular M12.A^K. RA: Región A. La proliferación celular se evaluó a las 48 h posteriores a la adición del extracto al cultivo celular. Los extractos se evaluaron a las concentraciones de 0-100 µg/mL. Como cultivos control se utilizaron cultivos celulares en presencia de la máxima concentración de solvente utilizada para disolver los extractos (0.5% de DMSO).

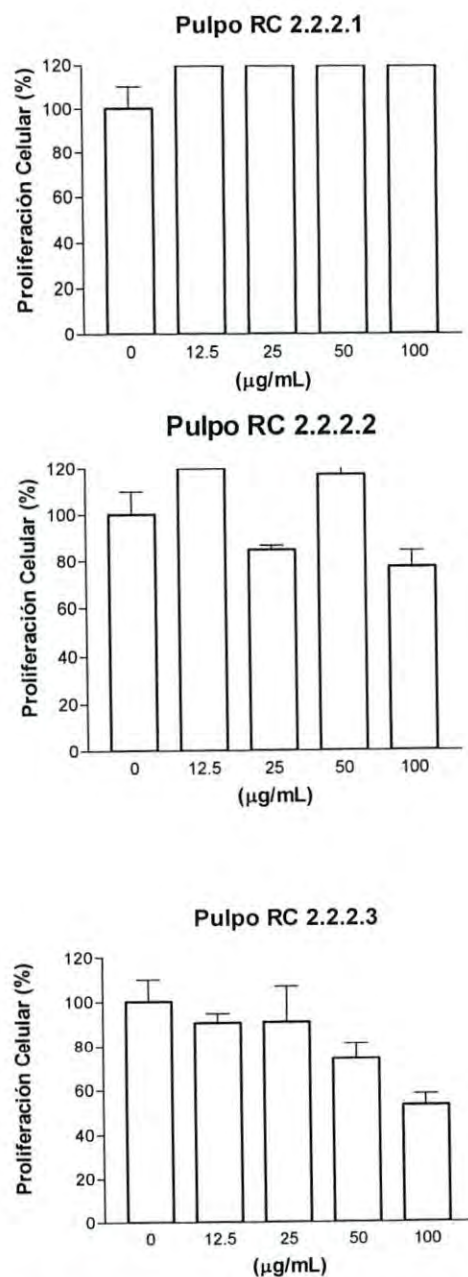


Figura 22. Actividad antiproliferativa de las regiones obtenidas de la CCF5 de pulpo sobre la línea celular M12.A^K. RC: Región C. La proliferación celular se evaluó a las 48 h posteriores a la adición del extracto al cultivo celular. Los extractos se evaluaron a las concentraciones de 0-100 $\mu\text{g/mL}$. Como cultivos control se utilizaron cultivos celulares en presencia de la máxima concentración de solvente utilizada para disolver los extractos (0.5% de DMSO).

metabólicos, hexanólicos y clorofórmicos de tres especies de microalgas *Chlorella minutissima*, *Haematococcus pluvialis* y *Tetraselmis suecica*, exhibieron actividad citotóxica significativa en células tumorales VERO (Células de riñón de mono verde africano), células MDCK (Epitelio de riñón canino) y células Hela (Adenocarcinoma de cérvix). Por lo tanto, a las fracciones RA3.3.2.3, y RC2.2.2.3 se les determinó el potencial antiproliferativo sobre la línea celular L-929, que es la "normal" de ratón, en donde se observa que no hubo efecto antiproliferativo a las concentraciones estudiadas, teniéndose porcentajes de antiproliferación similares a los del control (Figuras 23 y 24).

Las regiones RA3.3.2.3 de camarón y RC2.2.2.3 de pulpo se llevaron a una sexta cromatografía (CCF6), donde se obtuvieron las siguientes regiones con sus respectivos Rfs: 0-0.06 (RA3.3.2.3.1), 0.06-0.33 (RA3.3.2.3.2), 0.88-1 (RA3.3.2.3.3) para camarón; y 0-0.23 (RC2.2.2.3.1), 0.88-0.94 (RC2.2.2.3.2), 0.94-1 (RC2.2.2.3.3) para pulpo (Tabla 7). En cada una de las regiones se extrajo y analizó su potencial antiproliferativo.

En las figuras 25 y 26 se muestra el efecto de los extractos marinos de camarón y pulpo sobre la línea M12.A^K. Los extractos de camarón RA3.3.2.3.1 y RA3.3.2.3.2 no muestran efecto antiproliferativo sobre la línea celular M12.A^K, mientras que la RA3.3.2.3.3 posee potencial antiproliferativo en todas sus concentraciones. De los extractos provenientes de pulpo solo la región

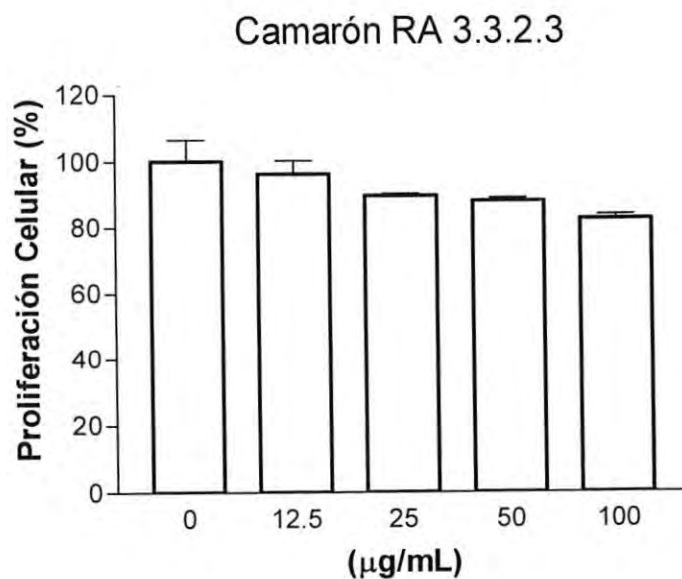


Figura 23. Actividad antiproliferativa de la región obtenida de la CCF5 de camarón sobre la línea celular L-929. RA: Región A. La proliferación celular se evaluó a las 48 h posteriores a la adición del extracto al cultivo celular. Los extractos se evaluaron a las concentraciones de 0-100 µg/mL. Como cultivos control se utilizaron cultivos celulares en presencia de la máxima concentración de solvente utilizada para disolver los extractos (0.5% de DMSO).

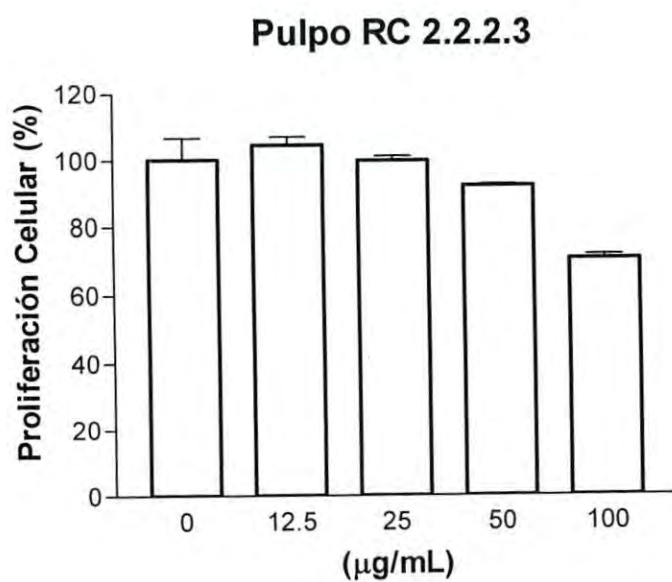


Figura 24. Actividad antiproliferativa de la región obtenida de la CCF5 de pulpo sobre la línea celular L-929. RA: Región C. La proliferación celular se evaluó a las 48 h posteriores a la adición del extracto al cultivo celular. Los extractos se evaluaron a las concentraciones de 0-100 µg/mL. Como cultivos control se utilizaron cultivos celulares en presencia de la máxima concentración de solvente utilizada para disolver los extractos (0.5% de DMSO).

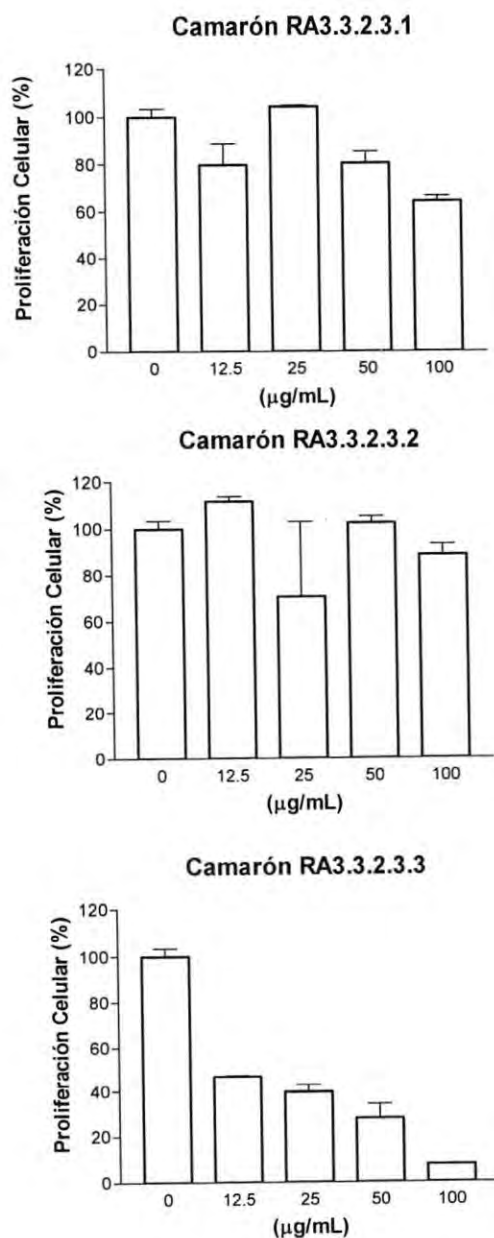


Figura 25. Actividad antiproliferativa de las regiones obtenidas de la CCF6 de camarón sobre la línea celular M12.A^K. RA: Región A. La proliferación celular se evaluó a las 48 h posteriores a la adición del extracto al cultivo celular. Los extractos se evaluaron a las concentraciones de 0-100 µg/mL. Como cultivos control se utilizaron cultivos celulares en presencia de la máxima concentración de solvente utilizada para disolver los extractos (0.5% de DMSO).

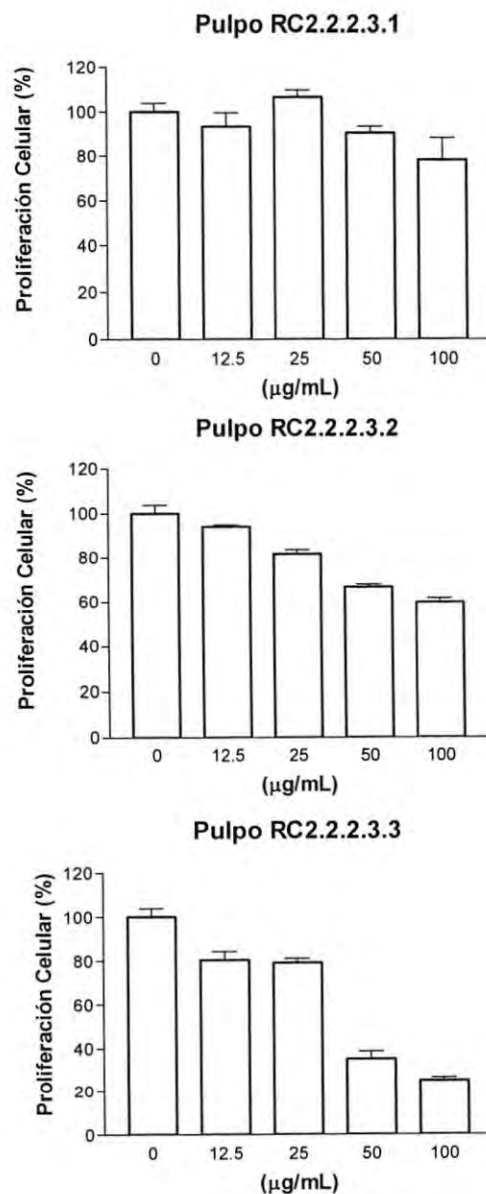


Figura 26. Actividad antiproliferativa de las regiones obtenidas de la CCF6 de pulpo sobre la línea celular M12.A^K. RC: Región C. La proliferación celular se evaluó a las 48 h posteriores a la adición del extracto al cultivo celular. Los extractos se evaluaron a las concentraciones de 0-100 µg/mL. Como cultivos control se utilizaron cultivos celulares en presencia de la máxima concentración de solvente utilizada para disolver los extractos (0.5% de DMSO).

RC2.2.2.3.3 es la que mejor potencial antiproliferativo presenta ante la línea celular M12.A^K. Las fracciones RA3.3.2.3.3 y RC2.2.2.3.3 proveniente de la CCF6 no mostraron actividad antiproliferativa sobre la línea celular L-929 (Figuras 27 y 28).

Las regiones RA3.3.2.3.3 de camarón y RC2.2.2.3.3 de pulpo se llevaron a una séptima cromatografía (CCF7), donde se obtuvieron las mismas regiones en ambos extractos, por lo cual el compuesto llegó a su purificación, obteniéndose así dos compuestos purificados y listos para su posterior caracterización utilizando espectroscopía de ultravioleta-visible (UV-VIS), infrarrojo (IR) y resonancia magnética nuclear (RMN). De las siete cromatografías realizadas a los extractos de camarón y pulpo, se obtuvieron al menos dos fracciones diferentes con potencial antiproliferativo. Esto indica la presencia de al menos dos compuestos con actividad quimioprotectora.

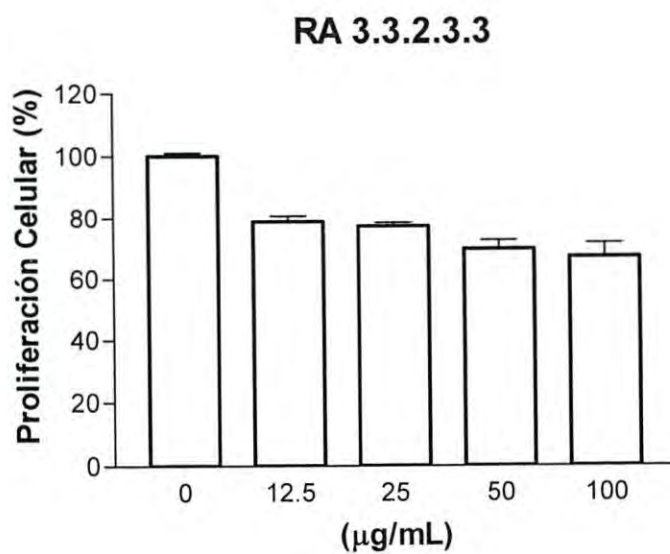


Figura 27. Actividad antiproliferativa de la región obtenida de la CCF6 de camarón sobre la línea celular L-929. RA: Región A. La proliferación celular se evaluó a las 48 h posteriores a la adición del extracto al cultivo celular. Los extractos se evaluaron a las concentraciones de 0-100 µg/mL. Como cultivos control se utilizaron cultivos celulares en presencia de la máxima concentración de solvente utilizada para disolver los extractos (0.5% de DMSO).

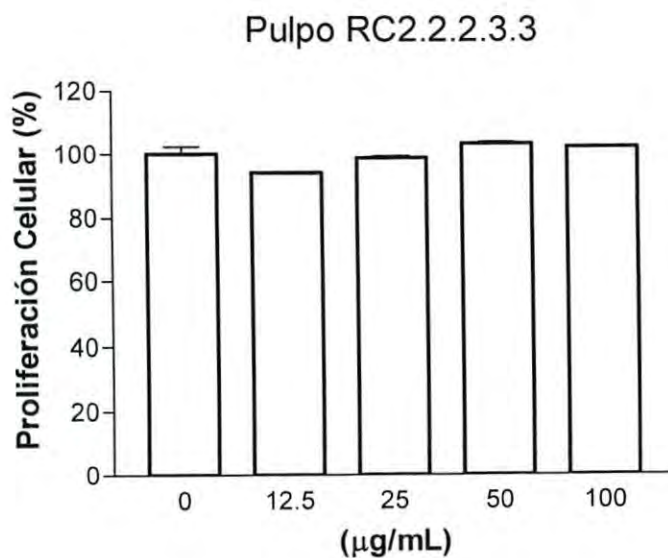


Figura 28. Actividad antiproliferativa de la región obtenida de la CCF6 de pulpo sobre la línea celular L-929. RA: Región C. La proliferación celular se evaluó a las 48 h posteriores a la adición del extracto al cultivo celular. Los extractos se evaluaron a las concentraciones de 0-100 µg/mL. Como cultivos control se utilizaron cultivos celulares en presencia de la máxima concentración de solvente utilizada para disolver los extractos (0.5% de DMSO).

Caracterización Química de Compuestos Antimutagénicos y Antiproliferativos Mediante Espectroscopia de Ultravioleta, Infrarrojo y Resonancia Magnética Nuclear

En esta sección se presentan las cuatro muestras o extractos obtenidos, tanto antimutagénicas como antiproliferativas: La muestra 1 (extracto de camarón antimutagénico), muestra 2 (extracto de pulpo antimutagénico), muestra 3 (extracto de camarón antiproliferativo) y la muestra 4 (extracto de pulpo antiproliferativo).

Los espectros de RMN de todas las muestras muestran picos intensos ubicados en la región de 1.3 ppm, atribuidos a protones metilénicos de ácidos grasos de cadena larga como el tipo omega 3. Así mismo, los espectros también muestran una banda ancha en aproximadamente 0.9 ppm atribuida a grupos metilo presentes en este tipo de compuestos (Figuras 29, 30, 31 y 32). Según lo reportado por Sacchi y col. (1993), ellos encontraron que estos grupos se presentan como un triplete por acoplamiento con los metilenos vecinos; sin embargo, en nuestras muestras no está resuelto como un triplete, excepto en la muestra 2 (extracto de pulpo antimutagénica) (Figura 30), donde se observa el triplete con mayor definición.

En esta última muestra (muestra 2), tanto el espectro de RMN (Figura 30) como los espectros de IR (Figura 34) y UV (Figura 37) nos indican que la

estructura química es distinta o que tiene una cierta proporción de un compuesto aromático. La evidencia más clara de esto son las señales en la región aromática del espectro de RMN entre 7.5 y 7.8 ppm (Figura 30). Por otro lado los espectros de FT-IR (Figuras 33, 34, 35 y 36) en todas las muestras muestran la banda típica del grupo funcional carbonilo (-C=O), lo cual es congruente con la presencia de un ácido graso. Más aún, los espectros de FT-IR de las muestras 1 (Figura 33), 3 (Figura 35) y 4 (Figura 36) muestran la banda ancha típica del grupo hidroxilo (OH) a los 3500 cm^{-1} . Esta banda está ausente en la muestra 2 (Figura 34), lo cual sugiere que el compuesto o el grupo de compuestos que la forman pueden corresponder a ésteres o cetonas.

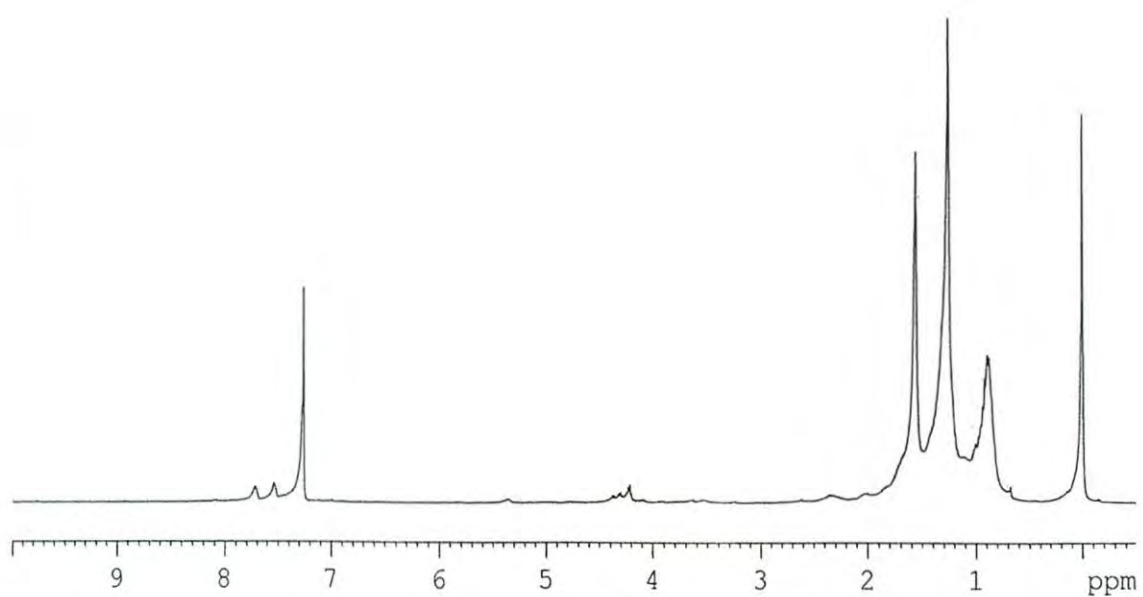


Figura 29. Espectro de RMN ^1H de la muestra 1 (Extracto Lipídico de Camarón antimutagénico), utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia.

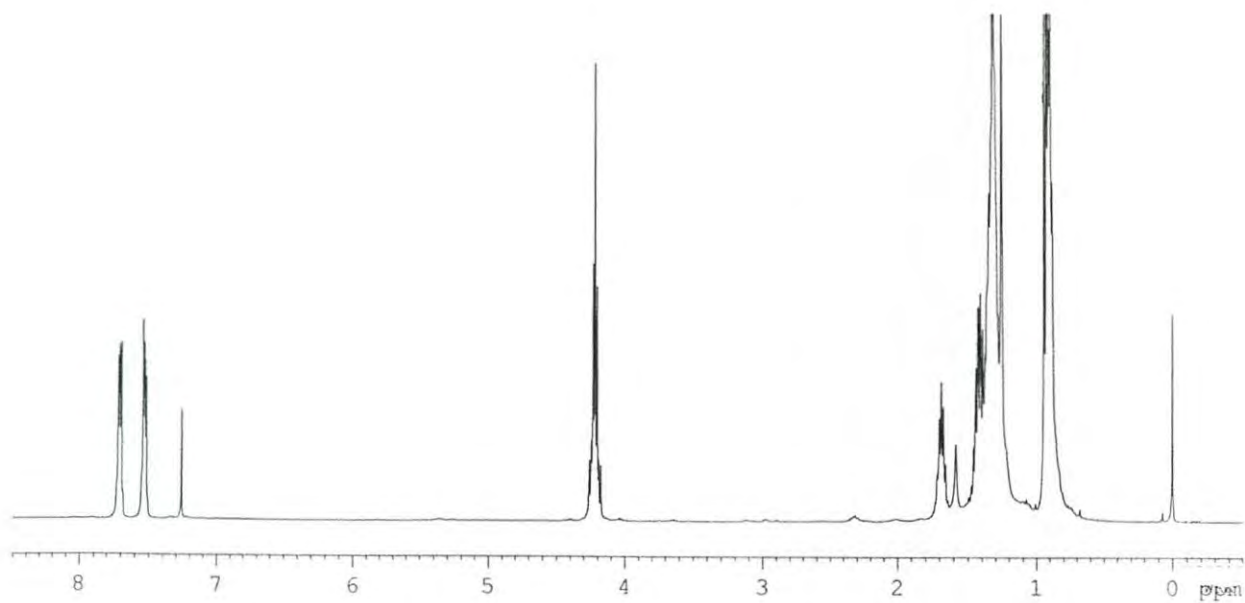


Figura 30. Espectro de RMN ^1H de la muestra 2 (Extracto Lipídico de Pulpo antimutagénico), utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia.

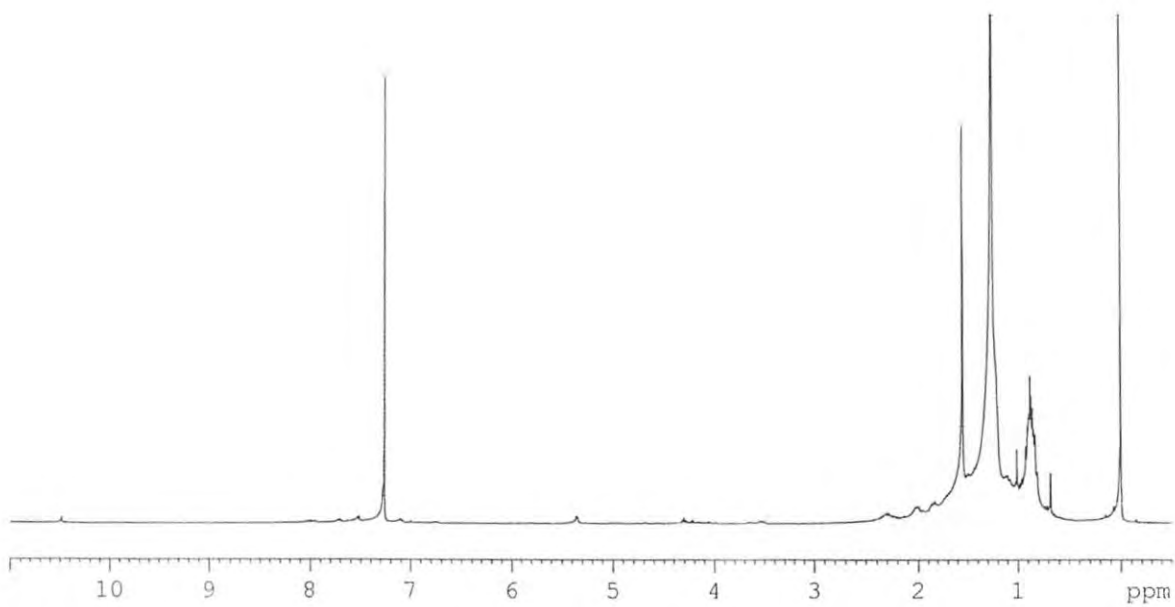


Figura 31. Espectro de RMN ^1H de la muestra 3 (Extracto Lipídico de Camarón antiproliferativo), utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia.

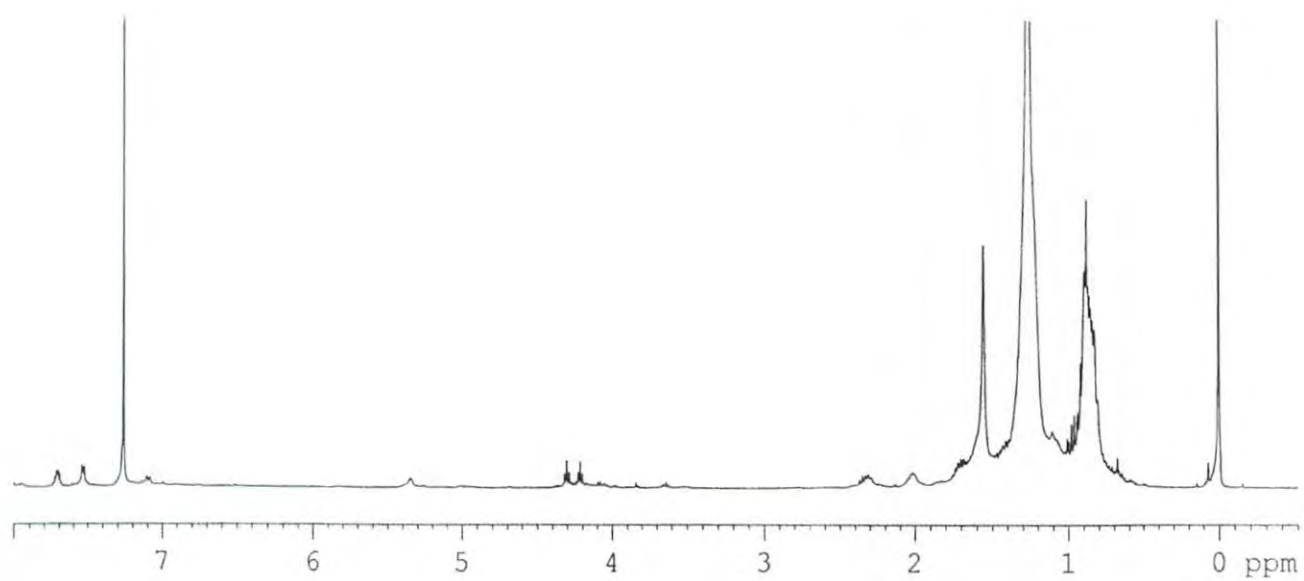


Figura 32. Espectro de RMN ^1H de la muestra 4 (Extracto Lipídico de Pulpo antiproliferativo), utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia.

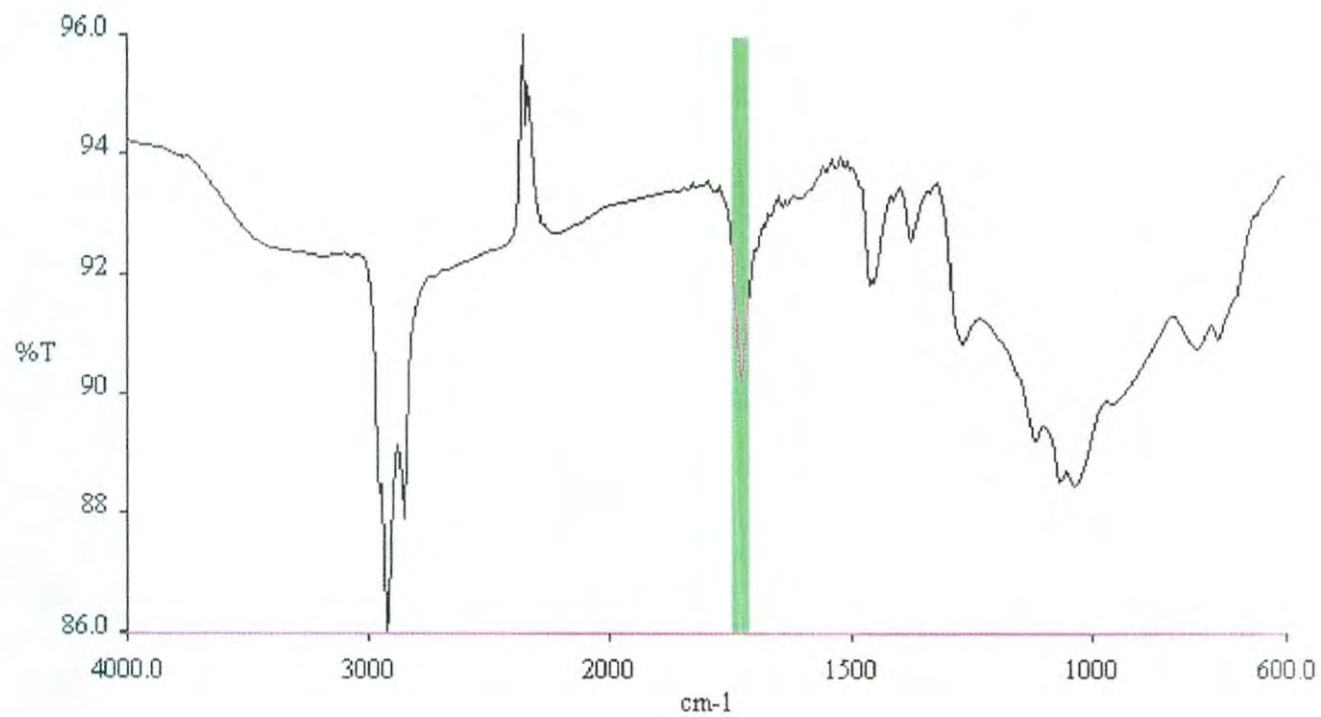


Figura 33. Espectro de Infrarrojo de la muestra 1 (Extracto Lipídico de Camarón antimutagénico).

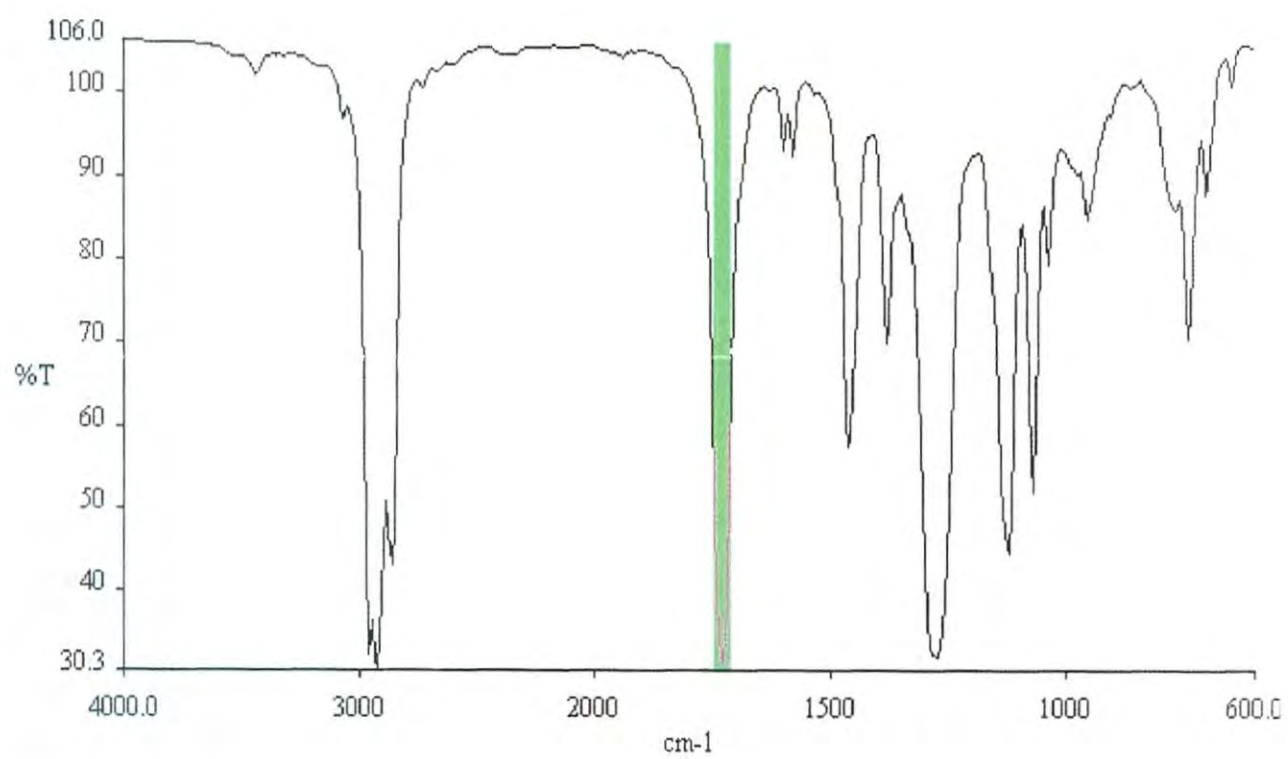


Figura 34. Espectro de Infrarrojo de la muestra 2 (Extracto Lipídico de Pulpo antimutagénico).

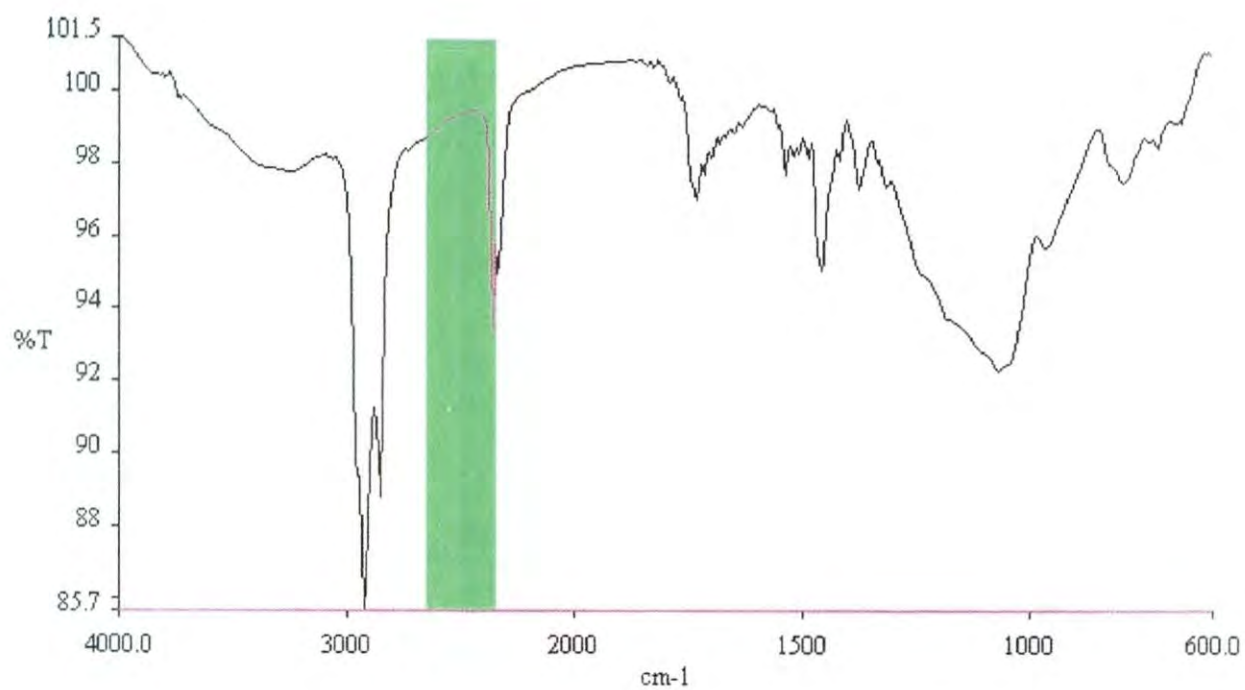


Figura 35. Espectro de Infrarrojo de la muestra 3 (Extracto Lipídico de Camarón antiproliferativo).

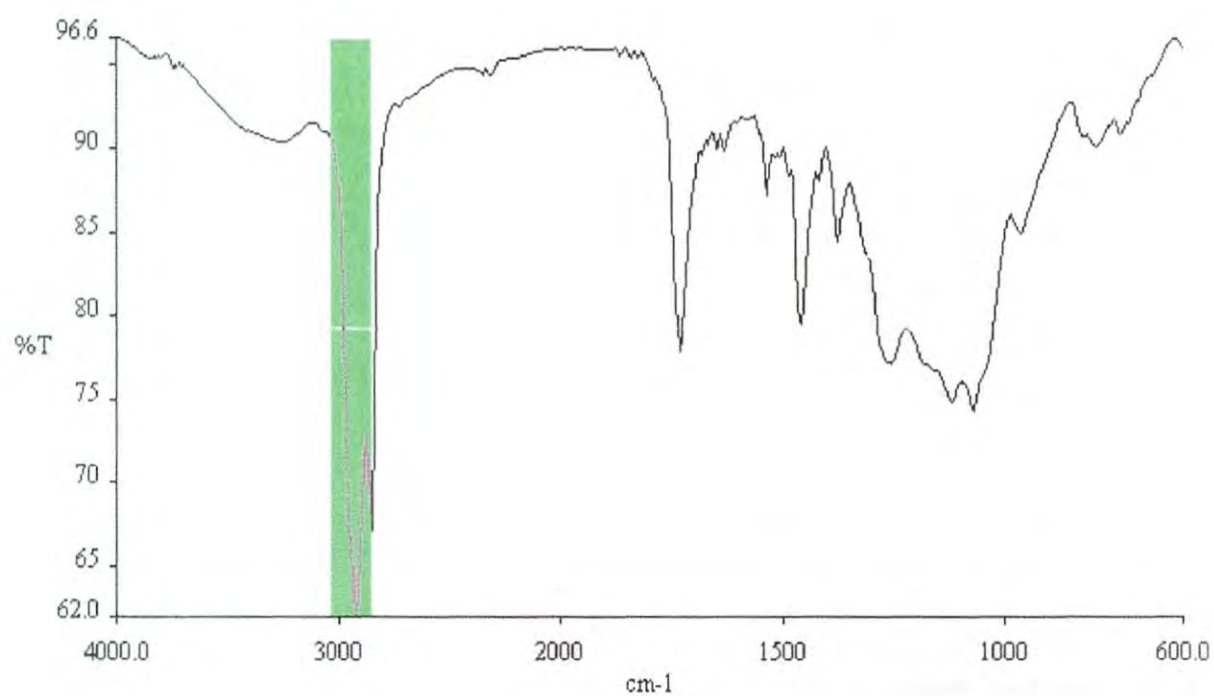


Figura 36. Espectro de Infrarrojo de la muestra 4 (Extracto Lipídico de Pulpo antiproliferativo).

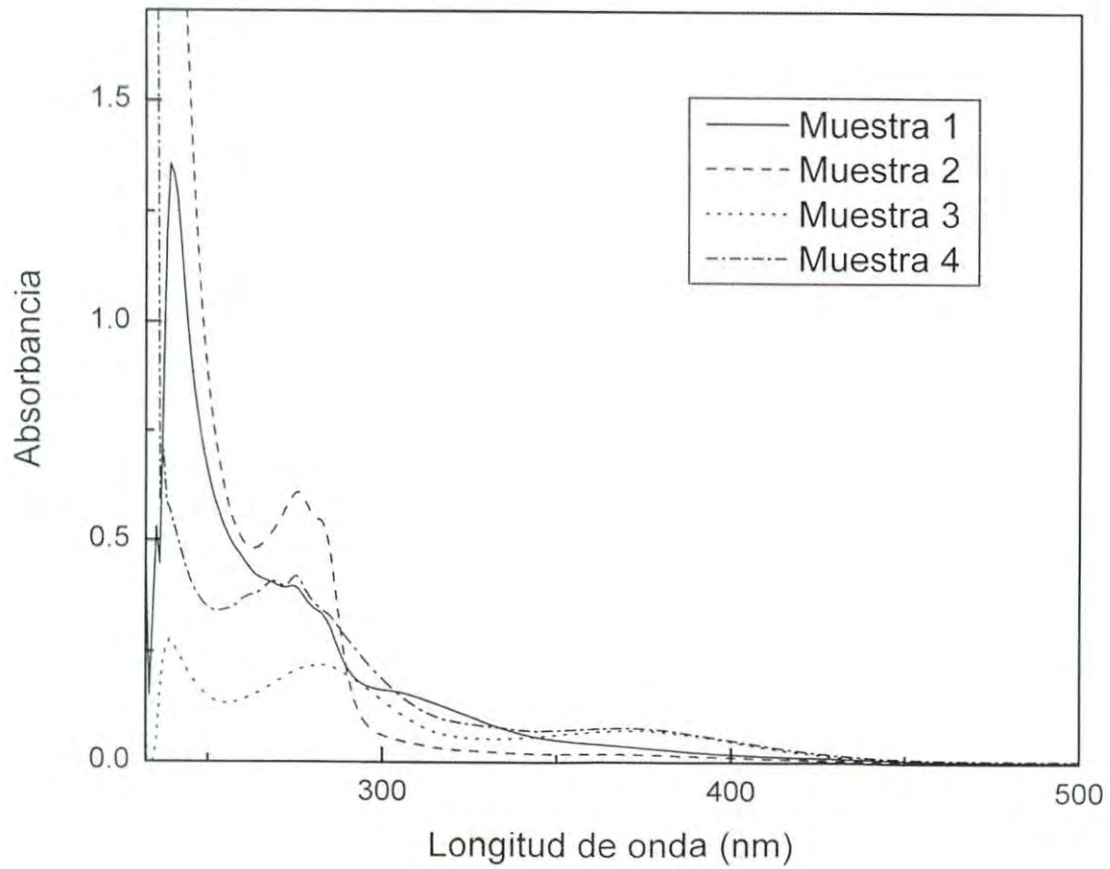


Figura 37. Espectro de Ultravioleta-Visible de las cuatro muestras.

CONCLUSIONES

Con base en las determinaciones instrumentales, se concluye que las fracciones antimutagénicas y antiproliferativas aisladas a partir de extractos lipídicos de camarón y pulpo, llegaron a un alto grado de purificación mediante cromatografía en capa fina.

Con fundamento en los resultados del aislamiento biodirigido, se concluye que en los extractos lipídicos de camarón y de pulpo se encuentran al menos seis compuestos o grupo de ellos que poseen actividad antimutagénica y cinco con actividad antiproliferativa en el caso de la cuarta cromatografía, en la quinta cromatografía se detectaron seis con actividad antimutagénica y seis con actividad antiproliferativa, y en relación a la sexta cromatografía se encontraron cuatro con actividad antimutagénica y seis con actividad antiproliferativa. Sin embargo, se seleccionó en cada caso al compuesto o grupo de compuestos con mayor actividad para continuar con el aislamiento. En relación a la séptima cromatografía se encontraron dos compuestos con actividad antimutagénica (uno de camarón y otro de pulpo) y dos compuestos con actividad antiproliferativa (uno de camarón y otro de pulpo), teniendo así, al menos cuatro compuestos o grupo de ellos con actividad biológica.

Los extractos lipídicos de camarón y de pulpo seleccionados son capaces de proteger a *Salmonella thiphymurium* TA98 y TA100 cuando son expuestas a aflatoxina B1. Los resultados de antiproliferación indican que las fracciones aisladas con este tipo de actividad son potencialmente selectivas para la línea celular cancerígena M12.A^k y no afectan la línea normal murina L-929.

En relación a los resultados obtenidos de los espectros de RMN y FT-IR, se concluye que los compuestos responsables de la actividad biológica pudieran tener una estructura similar a la de los ácidos grasos omega 3 ya que se observan picos intensos en la región 1.3 ppm atribuida a protones metilénicos de ácidos grasos de cadena larga como el tipo omega 3, así como en la región de 0.9 ppm en donde se observa una banda ancha atribuida a grupos metilo, presentes en este tipo de compuestos. Mostrando dichos compuestos las bandas típicas de los grupos funcionales carbonilo e hidroxilo, excepto en la muestra dos (extracto de pulpo antimutagénico).

Por lo anterior se concluye que la segunda muestra presenta características diferentes del resto, como fueron las estructuras químicas similares a los compuestos aromáticos, en donde se observaron señales (bandas típicas) en la región del espectro entre 7.5 y 7.8 ppm, típico del grupo de ésteres o cetonas.

RECOMENDACIONES

Dado que los resultados obtenidos en este estudio, son de importancia para la purificación de los compuestos biológicamente activos, se recomienda llevar a cabo otros estudios utilizando técnicas de separación más específicas, de tal manera que se logre purificar totalmente a los compuestos responsables del potencial antimutagénico y antiproliferativo.

Completar la caracterización de estos compuestos con actividad quimioprotectora utilizando, además de los estudios de espectroscopia realizados en este estudio, otras técnicas para el estudio de compuestos orgánicos, tales como la espectroscopia de masas, análisis elemental, entre otras.

Se recomienda además, estudiar los mecanismos de acción de estos compuestos con actividad biológica y la utilización de otros ensayos que determinen antimutagenicidad a nivel cromosómico, considerándose dosis y concentraciones a las cuales estos compuestos muestran su nivel de actividad biológica óptimo *in vivo*.

ANEXOS

Anexo 1

Potencial antimutagénico de las regiones RB2.3.1, RB2.3.2 y RB2.3.3 de camarón obtenidas después de realizar la CCF4, contaminadas con 500ng de AFB1, utilizando *Salmonella* TA98 con activación metabólica (S9).

<u>Extracto/cepa</u>	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Media	EEM
TA98					
AFB₁ (ng/placa)					
10	689	50	278	339	323.83
100	826	260	640	575.33	288.48
500	2266	1851	1588	1901.67	341.82
1000	3276	3240	2100	2872	668.81
RB2.3.1					
Contaminada con 500ng AFB1					
0	530	423	458	470.33	54.55
10	325	751	1039	705	359.21
100	726	537	330	531	198.06
1000	86	76	88	83.33	6.42
RB2.3.2					
Contaminada con 500ng AFB1					
0	85	130	137	117.33	28.21
10	296	226	610	377.33	204.51
100	282	335	448	355	84.78
1000	426	334	363	374.33	47.03
RB2.3.3					
Contaminada con 500ng AFB1					
0	334	387	623	448	153.85
10	547	372	883	334	259.69
100	694	612	694	666.67	47.34
1000	243	262	1920	808.33	962.77
Rev. Esp	179	29	23	77	88.38
DMSO	187	248	183	206	36.42

EEM: Error estándar de la media, AFB₁: Aflatoxina B1, Rev. Esp.: Revertantes Espontáneas, DMSO: Dimetil sulfóxido.

Anexo 2

Potencial antimutagénico de las regiones RB2.3.1, RB2.3.2 y RB2.3.3 de camarón obtenidas después de realizar la CCF4, contaminadas con 500ng de AFB₁, utilizando *Salmonella* TA100 con activación metabólica (S9).

<u>Extracto/cepa</u>		Placa 1	Placa 2	Placa 3	Media	EEM
TA100	AFB₁ (ng/placa)					
	10	188	162	149	166.33	19.85
	100	166	202	207	191.67	22.36
	500	458	709	650	605.67	131.24
	1000	793	597	768	719.33	106.67
RB2.3.1						
Contaminada con 500ng AFB1						
	0	136	201	317	218	91.68
	10	244	203	315	254	56.66
	100	196	221	297	238	52.60
	1000	113	83	111	102.33	16.77
RB2.3.2						
Contaminada con 500ng AFB1						
	0	134	106	141	127	18.52
	10	121	111	117	116.33	5.03
	100	197	296	225	239.33	51.03
	1000	198	218	255	223.67	28.91
RB2.3.3						
Contaminada con 500ng AFB1						
	0	80	151	160	130.33	43.82
	10	187	248	217	217.33	51.03
	100	216	261	320	265.67	52.15
	1000	182	106	105	131	44.17
Rev. Esp		88	163	121	124	37.58
DMSO		182	137	198	172.33	31.62

EEM: Error estándar de la media, AFB₁: Aflatoxina B1, Rev. Esp.: Revertantes Espontáneas, DMSO: Dimetil sulfóxido.

Anexo 3

Potencial antimutagénico de las regiones RB2.1.1, RB2.1.2 Y RB2.1.3 de pulpo obtenidas después de realizar la CCF4, contaminados con 500ng de AFB₁, utilizando *Salmonella* TA98 con activación metabólica (S9).

<u>Extracto/cepa</u>	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Media	EEM
TA98					
AFB₁ (ng/placa)					
10	689	50	278	339	323.83
100	826	260	640	575.33	288.48
500	2266	1851	1588	1901.67	341.82
1000	3276	3240	2100	2872	668.81
RB2.1.1					
Contaminada con 500ng AFB₁					
0	2160	1440	1792	1797.33	360.03
10	196	215	232	214.33	18.00
100	220	276	679	391.67	250.40
1000	320	1196	122	546	571.55
RB2.1.2					
Contaminada con 500ng AFB₁					
0	671	155	2192	1006	1059.01
10	39	0	62	33.67	31.34
100	49	2496	2080	1541.66	1309.31
1000	2624	2496	2112	2410.67	266.45
RB2.1.3					
Contaminada con 500ng AFB₁					
0	428	475	594	499	85.56
10	581	1168	739	829.33	303.74
100	1056	1120	1536	1237.33	260.62
1000	3072	2800	2912	2928	136.70
Rev. Esp	179	29	23	77	88.38
DMSO	187	248	183	206	36.42

EEM: Error estándar de la media, AFB₁: Aflatoxina B₁, Rev. Esp.: Revertantes Espontáneas, DMSO: Dimetil sulfóxido.

Anexo 4

Potencial antimutagénico de las regiones RB2.1.1, RB2.1.2 Y RB2.1.3 de pulpo obtenidas después de realizar la CCF4, contaminados con 500ng de AFB₁, utilizando *Salmonella* TA100 con activación metabólica (S9).

<u>Extracto/cepa</u>	<u>Placa 1</u>	<u>Placa 2</u>	<u>Placa 3</u>	<u>Media</u>	<u>EEM</u>
TA100					
AFB₁ (ng/placa)					
10	188	162	149	166.33	19.85
100	166	202	207	191.67	22.36
500	458	709	650	605.67	131.24
1000	793	597	768	719.33	106.67
RB2.1.1					
Contaminada con 500ng AFB₁					
0	709	385	792	628.67	215.06
10	162	150	5	105.67	87.38
100	178	191	209	192.67	15.56
1000	73	289	436	266	182.59
RB2.1.2					
Contaminada con 500ng AFB₁					
0	708	1068	479	751.67	296.91
10	102	85	98	95	8.88
100	75	115	147	112.33	36.07
1000	0	170	107	92.33	85.94
RB2.1.3					
Contaminada con 500ng AFB₁					
0	302	362	535	399.67	120.98
10	422	521	362	435	80.29
100	79	98	116	97.67	18.50
1000	107	130	69	102	30.80
Rev. Esp	88	163	121	124	37.58
DMSO	182	137	198	172.33	31.62

EEM: Error estándar de la media, AFB₁: Aflatoxina B₁, Rev. Esp.: Revertantes Espontáneas, DMSO: Dimetil sulfóxido.

Anexo 5

Potencial antimutagénico de las regiones RB2.3.2.2 y RB2.3.2.3 de camarón obtenidas después de realizar la CCF5, contaminados con 500ng de AFB₁, utilizando *Salmonella* TA98 con activación metabólica (S9).

<u>Extracto/cepa</u>	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Media	EEM
TA98					
AFB₁ (ng/placa)					
10	102	67	64	77.67	21.12
100	205	309	380	298	88.01
500	1074	1098	1078	1083.33	12.85
1000	1236	1074	953	1087.67	141.99
RB2.3.2.2					
Contaminada con 500ng AFB₁					
0	557	510	606	557.67	48.00
10	1220	1376	1570	1388.67	175.34
100	3392	1494	2096	2327.33	969.91
1000	2464	2880	2688	2677.33	208.20
RB2.3.2.3					
Contaminada con 500ng AFB₁					
0	387	445	580	470.67	99.02
10	1712	1360	1215	1429	255.58
100	1366	1920	1520	1602	285.95
1000	2160	2560	1360	2026.67	611.01
Rev. Esp	50	52	92	64.67	23.69
DMSO	49	71	62	60.67	11.06

EEM: Error estándar de la media, AFB₁: Aflatoxina B1, Rev. Esp.: Revertantes Espontáneas, DMSO: Dimetil sulfóxido.

Anexo 6

Potencial antimutagénico de las regiones RB2.3.2.2 y RB2.3.2.3 de camarón obtenidas después de realizar la CCF5, contaminados con 500ng de AFB1, utilizando *Salmonella* TA100 con activación metabólica (S9).

<u>Extracto/cepa</u>	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Media	EEM
TA100					
AFB₁ (ng/placa)					
10	153	159	215	175.67	34.19
100	214	182	221	205.67	20.79
500	470	475	528	491	32.14
1000	513	544	626	561	58.38
RB2.3.2.2					
Contaminada con 500ng AFB1					
0	310	237	355	194	59.55
10	667	652	612	643.67	28.43
100	845	874	979	899.33	70.50
1000	1408	1680	1056	1381.33	312.85
RB2.3.2.3					
Contaminada con 500ng AFB1					
0	183	263	262	236	45.90
10	415	495	477	462.33	41.96
100	820	773	794	795.67	23.54
1000	805	1149	1084	1012.67	182.75
Rev. Esp	98	110	93	100.33	8.73
DMSO	98	134	140	124	22.71

EEM: Error estándar de la media, AFB₁: Aflatoxina B1, Rev. Esp.: Revertantes Espontáneas, DMSO: Dimetil sulfóxido.

Anexo 7

Potencial antimutagénico de las regiones RB2.1.3.2 y RB2.1.3.3 de pulpo obtenidas después de realizar la CCF5, contaminados con 500ng de AFB1, utilizando *Salmonella* TA98 con activación metabólica (S9).

<u>Extracto/cepa</u>	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Media	EEM
TA98					
AFB₁ (ng/placa)					
10	102	67	64	77.67	21.12
100	205	309	380	298	88.01
500	1074	1098	1078	1083.33	12.85
1000	1236	1074	953	1087.67	141.99
RB2.1.3.2					
Contaminada con 500ng AFB1					
0	256	420	586	420.67	165.00
10	633	1381	1321	1111.67	415.62
100	725	816	1028	856.33	155.47
1000	712	633	658	667.67	40.37
RB2.1.3.3					
Contaminada con 500ng AFB1					
0	837	794	695	775.33	72.81
10	998	850	804	884	101.37
100	1550	1648	1536	1578	61.02
1000	2944	2800	2656	2800	144
Rev. Esp	50	52	92	64.67	23.69
DMSO	49	71	62	60.67	11.06

EEM: Error estándar de la media, AFB₁: Aflatoxina B1, Rev. Esp.: Revertantes Espontáneas, DMSO: Dimetil sulfóxido.

Anexo 8

Potencial antimutagénico de las regiones RB2.1.3.2 y RB2.1.3.3 de pulpo obtenidas después de realizar la CCF5, contaminados con 500ng de AFB1, utilizando *Salmonella* TA100 con activación metabólica (S9).

<u>Extracto/cepa</u>	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Media	EEM
TA100					
AFB₁ (ng/placa)					
10	153	159	215	175.67	34.19
100	214	182	221	205.67	20.79
500	470	475	528	491	32.14
1000	513	544	626	561	58.38
RB2.1.3.2					
Contaminada con 500ng AFB1					
0	289	202	228	239.67	44.65
10	864	600	764	742.67	133.28
100	850	851	871	857.33	11.84
1000	904	697	620	740.33	146.87
RB2.1.3.3					
Contaminada con 500ng AFB1					
0	326	240	1191	585.67	525.99
10	890	838	756	828	67.55
100	873	978	1020	957	75.71
1000	811	1120	1664	1198.33	431.86
Rev. Esp	98	110	93	100.33	8.73
DMSO	98	134	140	124	22.71

EEM: Error estándar de la media, AFB₁: Aflatoxina B1, Rev. Esp.: Revertantes Espontáneas, DMSO: Dimetil sulfóxido.

Anexo 9

Potencial antimutagénico de las regiones RB2.3.2.3BA y RB2.3.2.3BB, de camarón obtenidas después de realizar la CCF6, contaminadas con 500ng de AFB₁, utilizando *Salmonella* TA98 con activación metabólica (S9).

<u>Extracto/cepa</u>	<u>Placa 1</u>	<u>Placa 2</u>	<u>Placa 3</u>	<u>Media</u>	<u>EEM</u>
TA98					
AFB₁ (ng/placa)					
500	972	959	945	958.67	13.50
RB2.3.2.3BA					
Contaminada con 500ng					
AFB₁					
0	304	264	325	297.67	30.98
10	691	782	617	696.67	82.64
100	952	857	892	900.33	48.04
1000	691	776	534	667	122.77
RB2.3.2.3BB					
Contaminada con 500ng					
AFB₁					
0	271	238	461	323.33	120.35
10	577	624	540	580.33	42.09
100	824	378	1008	736.67	323.95
1000	19	9	21	16.33	6.42
Rev. Esp	23	16	14	17.67	4.72
DMSO	16	16	22	18	3.46

EEM: Error estándar de la media, AFB₁: Aflatoxina B1, Rev. Esp.: Revertantes Espontáneas, DMSO: Dimetil sulfóxido.

Anexo 10

Potencial antimutagénico de las regiones RB2.3.2.3BA y RB2.3.2.3BB, de camarón obtenidas después de realizar la CCF6, contaminadas con 500ng de AFB1, utilizando *Salmonella* TA100 con activación metabólica (S9).

<u>Extracto/cepa</u>	<u>Placa 1</u>	<u>Placa 2</u>	<u>Placa 3</u>	<u>Media</u>	<u>EEM</u>
TA100					
AFB₁ (ng/placa)					
500	566	465	578	536.33	62.06
RB2.3.2.3BA					
Contaminada con 500ng AFB1					
0	217	238	205	220	16.70
10	329	463	345	379	73.18
100	564	512	528	534.67	26.63
1000	536	622	502	553.33	61.84
RB2.3.2.3BB					
Contaminada con 500ng AFB1					
0	238	274	224	245.33	25.79
10	550	440	536	508.67	59.87
100	437	324	512	424.33	94.63
1000	358	370	411	379.67	27.79
Rev. Esp	107	133	92	110.67	20.74
DMSO	56	146	109	103.67	45.23

EEM: Error estándar de la media, AFB₁: Aflatoxina B1, Rev. Esp.: Revertantes Espontáneas, DMSO: Dimetil sulfóxido.

Anexo 11

Potencial antimutagénico de las regiones RB2.1.3.2.BA y RB2.1.3.2.BB, de pulpo obtenidas después de realizar la CCF6, contaminadas con 500ng de AFB1, utilizando *Salmonella* TA98 con activación metabólica (S9).

<u>Extracto/cepa</u>	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Media	EEM
TA98					
AFB₁ (ng/placa)					
500	972	959	945	958.67	13.50
RB2.1.3.2BA					
Contaminada con 500ng AFB1					
0	497	695	719	637	121.83
10	619	778	674	690.33	80.74
100	952	940	525	805.67	243.13
1000	672	1020	576	756	233.61
RB2.1.3.2BB					
Contaminada con 500ng AFB1					
0	545	452	275	424	137.16
10	674	762	766	734	52
100	960	915	667	847.33	157.78
1000	866	940	892	899.33	37.54
Rev. Esp	23	16	14	17.67	4.72
DMSO	16	16	22	18	3.46

EEM: Error estándar de la media, AFB₁: Aflatoxina B1, Rev. Esp.: Revertantes Espontáneas, DMSO: Dimetil sulfóxido.

Anexo 12

Potencial antimutagénico de las regiones RB2.1.3.2.BA y RB2.1.3.2.BB, de pulpo obtenidas después de realizar la CCF6, contaminadas con 500ng de AFB₁, utilizando *Salmonella* TA100 con activación metabólica (S9).

<u>Extracto/cepa</u>	<u>Placa 1</u>	<u>Placa 2</u>	<u>Placa 3</u>	<u>Media</u>	<u>EEM</u>
TA100					
AFB₁ (ng/placa)					
500	566	465	578	536.33	62.07
RB2.1.3.2BA					
Contaminada con 500ng AFB1					
0	257	290	262	269.67	17.79
10	442	507	442	463.67	37.53
100	484	431	470	461.67	27.46
1000	277	+++	419	232	213.09
RB2.1.3.2BB					
Contaminada con 500ng AFB1					
0	184	198	249	210.33	34.21
10	410	323	358	363.67	43.78
100	622	548	434	534.67	94.71
1000	567	517	605	563	44.14
Rev. Esp	107	133	92	110.67	20.74
DMSO	56	146	109	103.67	45.24

EEM: Error estándar de la media, AFB₁: Aflatoxina B1, Rev. Esp.: Revertantes Espontáneas, DMSO: Dimetil sulfóxido.

BIBLIOGRAFÍA

- Aheme S. A., and O. Brien. 2002. Dietary Flavonols: Chemistry, Food content and Metabolism. *Nutrition*, 18: 75-81.
- Albericio F; E. Giralt. Chemical Approaches to the synthesis of peptides and proteins, CRC, Boca Raton.1997.
- Acosta-Silva A. L. 2004. Efecto antiproliferativo de extractos de miel de abeja y propóleos sonorenses sobre líneas cancerígenas de humano y ratón. Tesis de Licenciatura de Químico-Biólogo. Universidad de Sonora. Pp: 31-45.
- Augustsson, K., Michaud, D.S., Rimm, E.B., Leitzmann, M.F., Stampfer, M.J., Willett, W.C., and Giovannucci, E. 2003. A prospective study of intake of fish and marine fatty acids and prostate cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 12(1), 64-67.
- Beckwith, M., Urba, W.J., and Longo, D.L. 1993. Growth inhibition of human lymphoma cell lines by the marine products, dolastins 10 and 15. *Journal of the National Cancer Institute*. 85(6), 483-8.
- Bergendi, L., L. Benes, Z. Durackova y M. Ferencik. 1999. Chemistry, physiology and pathology of free radicals, en *Life sciences*, núm. 65, pp. 1865-1874. Boix, E. y A. M. Pico. 2000. "Funciones endocrinas y envejecimiento", en *Endocr Nutr.*, núm. 47, pp.113-121.
- Bergmann, W. and Burke, D.C. 1955. Contributions to the study of marine products. XXXIX. The nucleosides of sponges. III. Spongothymidine and spongouridine. *J Org Chem*. 20: 1501-1507.
- Bergmann, W. and Feeney RJ. 1951. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. *Journal of Organic Chemistry*. 16:981-987.
- Bueren, J.A. 2002. In vitro toxicity of ET-743 and aplidine, two marine derived antineoplastics, on human bone marrow hematopoietic progenitors comparison whit the clinical results. *European Journal of Cancer*. 38(10), 1395-1404.

- Burgos-Hernández, A., Peña-Sarmiento, M., and Moreno-Ochoa, F. 2002. Mutagenicity and antimutagenicity studies of lipidic extracts from yellowtail fish (*seriola lalandi*), lisa (*Mugil cephalus*) and cazon fish (*Mustelus lunulatus*). *Food and Chemical Toxicology*. 40(10), 1469-74.
- Cartee, L., Davis, C., and Lin, P.S. 2000. Chronic exposure to bryostatin-1 increases the radiosensitivity of U937 leukaemia cells ectopically expressing Bcl-2 through a non-apoptotic mechanism. *Int J Radiat Biol*. 76:1323 –33.
- Chen, Z.Y., and Istfan, N.M. 2001. Docosahexaenoic acid, a major constituent of fish oil diets, prevents activation of cyclin-dependent kinases and S-phase entry by serum stimulation in HT-29 cell. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 64(1), 67-73.
- Colombo, D. T. 1997. Comparison of hexadecylphosphocholine with fish oil as an antitumor agent. *Journal of Lipid Mediators and cell Signalling*. 17(1), 47-63.
- Cuadros R, de Garcini EM, and Wandosell F. 2000. The marine compound spisulosine, an inhibitor of cell proliferation, promotes the disassembly of actin stress fibers. *Cancer Lett*. 152:23–9.
- Cuevas, C., Pérez, M., Martín, M.J., Chicharro, J.L., Fernández-Rivas, Flores, M.; Francesch, A., Gallego, P., Zarzuelo, M., de la Calle, F., García, J., Polanco, C., Rodríguez, I., and Manzanares, I. *Organic Letters* 2, 2545-2548, 2000. Synthesis of Ecteinascidin ET-743 and Phthalascidin Pt-650 from Cyanosafracin B.
- Davies-Coleman, M.T., Gustafson, K.R., and Cantrell, C.L. 2000. Stolononic acids A and B, new cytotoxic cyclic peroxides from an Indian Ocean ascidian *Stolonica* species. *J Nat Prod.*, 63:1411 –3.
- De Chávez, M. M., Hernández, M., y Roldan, J. A. 1992. Valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo en México. Ed. 2ª. Comisión Nacional de Alimentación. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Subirán.
- Ding, Wei-Qun, Vaught, Joshua L., Yamauchi, Hanako, Lind, Stuart E. 2004. Differential sensitivity of cancer cells to docosahexaenoic acid-induced

- cytotoxicity: The potential importance of down-regulation of superoxide dismutase 1 expression. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(9), 1109-1117.
- Donaldson, Michael S. 2004. Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutrition Journal*, 3: 25-35.
- Fukuoka, K., Yamagishi, T., Ichihara, T., Fukumoto, H., Yoneda, T., Samata, K., Ikeya, H., Nanaumi, K., Hirayama, N., Narita, N., Saijo, N., and Nishio, K. 2000. Mechanism of action of aragusterol A (YTA0040), a potent antitumor marine steroid targeting the G1 phase of the cell cycle. *Int J Cancer*, 88(5), 810-819.
- Fusetani, N., and Karger B. 2000. Drugs from the Sea. Exploring the Ocean, Starting the case for Chemistry, Scheuer, P. J. *Journal of Chemical Education*, 76, 1075-1079.
- Faulkner, D. J. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 2000; 17:7-55.
- Gago, D.M., Yuan, J.M., Sun, C.L., Lee, H.P., and Yu, M.C. 2003. Opposing effects of dietary n-3 and n-6 fatty acids on mammary carcinogenesis: the Singapore Chinese Health study. *Cancer Res UK*, 89:1686-1692.
- Garcia-Nieto, R., Manzanares, I., and Cuevas, C. 2000. Increased DNA binding specificity for antitumor ecteinascidin 743 through protein-DNA interactions?. *J Med Chem.*, 43:4367-9.
- Garcia-Nieto R., Manzanares I., and Cuevas C. 2000. Bending of DNA upon binding of ecteinascidin 743 and phthalascidin 650 studied by unrestrained molecular dynamics simulations. *J Am Chem Soc.*, 122:7172-82.
- Garson, M.J. Eds van Soest, R. W.M; van Kempen, T. M. G.; Braekman; J. C., Rotterdam: Balke, ma, 496, 1994. Sponges in time and space.
- Gerwick, W.H. 1997. Antimutagenic, antiinflammatory, and potential anticancer substances from marine algae. College of Pharmacy, Oregon State University, Corvallis, OR, USA. Editor(s): Ohigashi, Hajime. *Food Factors for Cancer Prevention*, [International Conference on Food Factors: Chemistry and Cancer Prevention], Hamamatsu, Japan, Dec., 1995 (1997), 342-347.

- Guthrie, Najla, and Manthey, John. 2000. Effectiveness of citrus flavonoids on human prostate, colon, lung, and melanoma cancer-cell proliferation. Book of Abstracts, 219th ACS National Meeting, San Francisco, CA, March 26-30, (2000). AGFD-183. Publisher: *American Chemical Society*, Washington, D. C.
- Hazra, A., Kumar, T.S., and Ghosh, A. 1999. Pharmacology and therapeutic potential of the n-3 polyunsaturated fatty acids, eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in fish oil. *Indian Journal of pharmacology*, 31(4), 247-264.
- Heltzel, C.E., Huyck, R.H., Valco, A.J., and Horgen, F.D. 2002. Mechanism-based search for novel anticancer agents from marine organisms. Department of Natural Sciences and Mathematics, Transylvania University, Lexington, KY, USA. Abstracts of Papers, 223rd ACS National Meeting, Orlando, FL, United States. Pág. 7-11.
- Hernandez, M., Chavez, A., and Bourges, H. 1987. Valor nutritivo de los Alimentos Mexicanos. Tablas de uso práctico. Instituto Nacional de la Nutrición México. Publicación de la División de nutrición. L-12, 10^a. Edición. Pp 16 y 17..
- Izbicka, E., Lawrence, R., Raymond, E., Eckhardt, G., Faircloth, G., Jimeno, J., Clarck, G. and Von Hoff, DD. 1998. In vitro antitumor activity of the novel marine agent, Ecteinascidin-743 (ET-743, NSC-648766) against human tumors explanted from patients. *Ann Oncol.*, 9:981-987.
- Jackson, J. R., Metterm, M., Gerwick, W., Jacobs, R. S., and Marshall, L.A. 2002. The identification and characterization of the marine natural products scytonemin as a novel antiproliferative pharmacophore. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(2), 858-866.
- Jang M., Cai L., Udeani G. O, 1997. Cancer Chemopreventive Activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275: 218-221.
- Jensen, P.R., and Fenical, W. *Annual Review of Microbiology*, 48, 559-584, 1994. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: ecological perspectives.

- Jenski, L.j., Zerouga, M., and Stillwell, W. 1995. Omega-3 Fatty acid-containing liposomes in cancer therapy. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 210(3), 227-33.
- Jin S, Gorfajn B, and Faircloth G. 2000. Ecteinascidin 743, a transcriptiontargeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation. *Proc Natl Acad Sci*, 97:6775–9.
- Kirpal S. Sidhu. 2003. Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 38:336-344.
- Koutcher, J. A., Motwani, M., and Zakian, KL. 2000. The in vivo effect of bryostatin-1 on paclitaxel-induced tumor growth, mitotic entry and blood. *Clin Cancer Res.*, 6:1498 –507.
- Kristal, Alan R., King, Irena B., Albanes, Demetrius, Pollak, Michael N., Stanzyk, Frank Z., Santella, Regina M., and Hoque, Ashraful. 2005. Centralized Blood Processing for the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial: Effects of Delayed Processing on Carotenoids, Tocopherols, Insulin-Like Growth Factor-I, Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 3, Steroid Hormones, and Lymphocyte Viability. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 14(3), 727-73.
- Larsson, S.C., Kumlin, M., Ingelman-Sundberg, M., and Wolk, A. 2004. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr.*, 79:935-45.
- Ling, W. H., and Jones, P. J. H. 1995. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sciences*, 57(3), 195-206.
- Longley, R.E., and Koehn, F.E. 1997. Antiproliferative and immunosuppressive properties of microcolin A, a marine-derived lipopeptide. *Life Sciences*, 60(10), 751-762.
- Lopez, M.R. 2003. Marine-derived anticancer agents in clinical trials. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 12(8), 1367-1383.

- Lopez-Macia, A., Jimenez, J. C., Royo, M., Giralt, E., and Albericio, F. 2001. Synthesis and Structure Determination of Kahalalide *J. Am. Chem. Soc.* 123; 11398-11401,
- Margulis L. Early Life, Boston, Mass, USA: Jones and Bartlett, 1982.
- Margulis L. Sagan D. Microcosmos. Barcelona: Tusquets ed., 115-130. 1995
- Maron, D.M., and Ames, B.D. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res*, 113:173-215.
- Marshall, J.L., Dahut, W., Rizvi, N., Trocky, N., Williams, J. I., Hait, H., Song, S., Holroyd, K.J., and Hawkins, M.J. *Clinical Cancer Research* 7, 3912-3919, 2001. A Phase I and pharmacokinetic study of squalamine, a novel antiangiogenic agent, in patients with advanced cancers Bhargava, P.
- Matsumoto, S.S., Sidford, M.H., and Holden, J.A. 2000. Mechanism of action Mayer, M.S.A and Gustafson, K.R. 2003. Marine pharmacology in 2000: antitumor and cytotoxic compounds. *International Journal Cancer*. 105, 291-299.
- Mayer A.M, and Hamann MT. 2002. Marine pharmacology in 1999: compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anthelmintic, anti-inflammatory, antiplatelet, antiprotozoal and antiviral activities affecting the cardiovascular, endocrine immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 132: 315-39.
- Mayer, S.A.M., and Gustafson, R.K. 2003. Marine pharmacology in 2000: antitumor and cytotoxic compounds. *Int. J. Cancer*, 105, 291-299.
- Menon K., Alvarez E., Forler P. 2000. Antitumor activity of cryptophycins: effect of infusion time and combination studies. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 46:142-9.
- Minuzzo M., Marchini S., and Brogginini M. 2000. Interference of transcriptional activation by the antineoplastic drug ecteinascidin-743. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:6780-4.
- Mohammad, R.M., Wall, N.R., and Dutcher, J.A. 2000. The addition of bryo-statin 1 to cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and pred-nisone

- (CHOP)chemotherapy improves response in a CHOP-resistant human diffuse large cell lymphoma xenograft model. *Clin Cancer Res.*, 6:4950 –6.
- Murray H. G., Munro, John W., Blunt, Eric J., Dumdei, Sarah J. H., Hickford, Rachel E. Lill, Shangxiao Li, Crristopher N. Battershill, and Alan R, Duckworth *Journal of Biotechnology* 70, 15-25, 1999. The discovery and developmente of marine compounds with pharmaceutical potencial.
- Nakazawa H., Kitano K., and Cioca, D.P. 2000. Induction of polyploidization by jaspamide in HL-60 cells. *Acta Haematol.*, 104:65–71.
- Neilsen, N.H. and Hansen, J.P.H. 1976. Marine produc natural and cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.*, 98:287-299.
- Okumura, H., Ren, X., Belinsky, M.G., Lee, K., Kruh, G., Kobayashi, M., and Akiyama, S. 2001. Reversal of drug resistance mediated by multidrug resistance protein (MRP) 1 by dual effects of agosterol A on MRP1 function. *International Journal of Cancer.* 93(1), 107-113.
- Osinga, R. Biotechnological aspects of marine sponges. *J Biotechnol* 2003; 100:91-2.
- Panda, D.; Ananthnarayan V, Larson G. 2000. Interaction of the antitumor compound cryptophycin-52 with tubulin. *Biochemistry*, 39:14121–7.
- Pettit, G.R.; Hess, A.D. 1991. Successful treatment of murine melanoma with bryostain 1. *Cancer Research*, 51(2), 682-687.
- Pettit, G.R., and Sensenbrenner, L. L. 1993. Differential effects of bryostatin 1 on human non-Hodgkin's B-lymphoma cell lines. *Leukemia Research*, 17(1), 1-8.
- Piers, E., Britton R., and Andersen R. *J. J. Org. Chem.* 65, 530-535, 2000. Improved synthesis of isogranulatimide, a G2 checkpoint inhibitor. Synthesis of didemnimide C, isodidemnimide A, neodidemnimide A, 17-methylgranulatimide, and isogranulatimides A-C.
- Pryor W. Free radicals. Nueva York: McGraw-Hill Book, 1966.
- Pryor W. Introducción a la química de los radicales libres. Madrid: Alhambra, 1974.

- Quintero Vargas, J.T.J. 2005. Efecto citotóxico de propóleos sonorenses sobre líneas celulares cancerígenas de humano y ratón. Tesis de Licenciatura de Químico-Biólogo. Universidad de Sonora, Pp: 16-26.
- Rho J. 2000. New bioactive steroids from the Gorgonian *Acalycigorgia Inermis*. *Bull Korean Chem Soc.*, 21:518 –20.
- Roberge, M., Cinel, B., and Anderson, H.J. 2000. Cell-based screen for antimitotic agents and identification of analogous of rhizoxin, eleutherobin and paclitaxel in natural extracts. *Cancer Res.* 60: 5052-5058.
- Roca, A., Álvarez, M., Mane, J., Fernandez-Banares, F., and Gassull, M.A. 2002. The effects of fish oil, olive oil and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. *Clinical nutrition*, 22(1), 71-79.
- Rosa, Antonella; Deidda, Delia; Serra, Alberto; Deiana, Monica; Dessi, M. Assunta; Pompei, Raffaello. 2005. Omega-3 fatty acid composition and biological activity of three microalgae species. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 3(2), 120-124.
- Rose, D.P., and Connolly, J.M. 1999. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacol Ther.*, 83:217-44.
- Sakaguchi, M., Yamagishi, T., Yamada, H., and Shirasu, Y. 1994. Bio-anticlastogenic effects of unsaturated fatty acids included in fish oil docosahexaenoic acid, docosapentaenoic acid, and eicosapentaenoic acid in cultured Chinese hamster cells. *Mutation Research.* 320(1-2), 9-22.
- Sánchez-Villegas A, Martínez-González MA, Martínez JA. Dieta mediterránea y cáncer: evidencias epidemiológicas. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 10 (1):1-9. 2003.
- Shao, Y., and Pardini, L. 1994. Pharmacology and therapeutic potential of the n-3 polyunsaturated fatty acids, and cachexia. *Cancer Res.*, 54:6452-6457.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2005. Indicadores de la actividad pesquera. Pp. 1-10

- Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP), en el Estado de Sonora, subdelegación de pesca. 1999. Sector pesquero: desarrollo y perspectivas.
- Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP), Indicadores de la actividad pesquera. Marzo 2005.
- Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP), en el Estado de Sonora, subdelegación de pesca. 1998. Sector pesquero: desarrollo y perspectivas.
- Sheu, JH., Chang, KC., and Duh, CY. 2000. A cytotoxic 5 α ,8 α -epidioxy-sterol from a soft coral *Sinularia* species. *J Nat Prod.*, 63:149–51
- Soeyland, E., Nenseter, M.S., Braathen, L., and Drevon, C.A. 1993. Very long chain n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid inhibit proliferation of human T-lymphocytes in vitro. *European Journal of Clinical Investigation*, 23(2), 112-121.
- Starvic, B. 1994. Antimutagens and anticarcinogens in foods. *Food Chem Toxic.*, Vol 32(1): 76-90.
- Strissel, Pamela L., and Strick, Reiner. 2005. Multiple effects of bioflavonoids on gene regulation, cell proliferation and apoptosis: Natural compounds move into the limelight of cancer research. *Leukemia Research*, Vol. 29(8), 859-861.
- Teicher BA, Forler P, and Menon K. 2000. Cryptophycin 52 and cryptophycin 55 in sequential and simultaneous combination treatment regimens in human tumor xenografts. *In Vivo*, 14:471–80.
- Terry, P.D., Rohan, T.E., and Wolk, A. 2003. Intake of fish and marine fatty acids and the risks of cancers of the breast and prostate and of other hormone-related cancers: a review of the epidemiologic evidence. *Am J Clin Nutr.*, 77:532-43
- Tisdale, M., and Dhesi. 1990. Very long chain n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids inhibit proliferation of human in vitro. *Cancer Res.*, 50:5022-5026.

- Visioli, F., Grande, S., Bogani, P., and Galli, C. 2004. The role of antioxidants in the mediterranean diets: focus on cancer. *European Journal of Cancer Prevention*, 13, 337-347.
- Watanabe, K.; Tsuda, Y.; Iwashima, M. 2000. A new bioactive triene aldehyde from the marine sponge *Leucetta microraphis*. *J Nat Prod.*, 63:258 –60.
- WCRF/AICR: Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective: World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research; 1997.
- Welsch, M. 1992. Cancer and polyunsaturated fatty acids marine. *Cancer Res.*, 52:2040s-2048s.
- Wilson Sánchez G. 2006. Detección y Aislamiento Parcial de Fracciones Antimutagénicas y Antiproliferativas a Partir de Extractos Lipídicos de Organismos Marinos. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora.
- Yang, Wenge. 2000. Advance in study on antineoplastic substace of marine organism. *Haiyang Kexue*. 24(7), 38-41.
- Yoshida, T.; Morimoto, J.; Taniguchi, Y.; Imai, S.; Kurebayashi, J. 2001. Antitumor effects of *Marginisporium crassissimum* (Rhodophyceae), a marine red alga. *Cancer letters* (Shannon, Ireland). 167(2), 145-150.
- Zhang, Z.; Wang, Y.; Yao, R.; Li, J.; Yan, Y.; La Regina, M.; Lemon, W. L.; Grubbs, C.J.; Lubet, R.A.; You, M. 2004. Cancer chemopreventive activity of a mixture of chinese herbs (antitumor B) in mouse lung tumor models. *Nature Publishing Group*. 23, 3841-3850.