

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el SECIHTI (Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Doctorado en Ciencias  
en Ciencias de la Vida**

---

**Estudio y caracterización del efecto del fucoidan como  
modulador de la remodelación ósea *in vitro* y en dos modelos  
*in vivo* de pérdida ósea**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias

Presenta:

**Jessica Sharlin Landeros Juárez**

Ensenada, Baja California, México

2025

Tesis defendida por

**Jessica Sharlin Landeros Juárez**

y aprobada por el siguiente Comité

**Dra. Patricia Juárez Camacho**

Directora de tesis

**Dr. Enrique Hernández Garibay**

**Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier**

**Dra. Alejandra Prieto Davó**

**Dra. Lorena María Durán Riveroll**



**Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo**

Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

**Dra. Ana Denise Re Araujo**

Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Jessica Sharlin Landeros Juárez** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctora en Ciencias en Ciencias de la Vida.

### **Estudio y caracterización del efecto del fucoïdan como modulador de la remodelación ósea *in vitro* y en dos modelos *in vivo* de pérdida ósea**

Resumen aprobado por:

Dra. Patricia Juárez Camacho  
**Directora de tesis**

El hueso es un tejido dinámico en constante remodelación, cuyo desequilibrio puede derivar en enfermedades de pérdida ósea como la osteoporosis o la metástasis ósea asociada al cáncer. Si bien existen terapias que mejoran la integridad del hueso, su uso prolongado provoca efectos secundarios. En este trabajo se exploró el efecto de los fucoïdanos aislados de tres especies de algas pardas - *Macrocystis pyrifera*, *Sargassum muticum* y *Undaria pinnatifida*- sobre el proceso de remodelado óseo, así como en la pérdida ósea inducida por la deficiencia de estrógenos y la generada en un modelo de metástasis osteolítica del cáncer de mama. La caracterización química de los fucoïdanos confirmó un contenido variable de fucosa (10-31.5 %), de sulfatos (26.5-41.5 %) y de ácidos urónicos (hasta 44 %). En el análisis estructural por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés) se encontraron similitudes entre los fucoïdanos extraídos y sus análogos comerciales. En los ensayos biológicos con células de médula ósea o de preosteoblastos de ratón, los fucoïdanos en altas concentraciones (a partir de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) aumentaron significativamente los depósitos de calcio posterior a 21 días de cultivo. Por el contrario, en los ensayos de osteoclastogénesis, los fucoïdanos, con concentraciones menores (5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), inhibieron significativamente la formación de los osteoclastos. Los ensayos de expresión de genes mostraron una disminución en la relación *Rankl/Opg*, lo que sugiere un efecto osteoprotector. Los experimentos *ex vivo* en calvarias de ratón neonato confirmaron un aumento en las áreas de formación ósea dependiente de la concentración y una modulación en diferentes genes de la remodelación ósea como *Sost*, *Runx2*, *Ctsk*, *Rankl*, y *Opg*. El efecto de los fucoïdanos se evaluó en dos modelos de pérdida ósea *in vivo*: por ovariectomía (OVX) y por metástasis ósea. En el primer modelo, la administración de 10 y 100  $\text{mg kg}^{-1}$  del fucoïdan de *U. pinnatifida* generó una pérdida ósea significativa dependiente de la dosis. Por otro lado, en el modelo de metástasis ósea, el tratamiento intraperitoneal diario de los fucoïdanos (10  $\text{mg kg}^{-1}$ ) redujo significativamente las lesiones osteolíticas, disminuyó la carga tumoral y preservó la microarquitectura ósea. En conjunto, estos hallazgos muestran que los fucoïdanos pueden tener un efecto diferente en función de la concentración y de la dosis, y esta versatilidad demuestra que tienen potencial como agentes terapéuticos contra las enfermedades óseas.

**Palabras clave:** Agente anabólico, formación ósea, *Macrocystis pyrifera*, polisacárido sulfatado, reabsorción ósea, *Sargassum muticum*, *Undaria pinnatifida*

Abstract of the thesis presented by **Jessica Sharlin Landeros Juárez** as a partial requirement to obtain the Doctor of science degree in Life Sciences.

**Study and characterization of the effect of fucoidan as a modulator of bone remodeling *in vitro* and in two *in vivo* models of bone loss**

Abstract approved by:

Dra. Patricia Juárez Camacho

**Thesis Director**

Bone is a dynamic tissue that undergoes constant remodeling, whose imbalance can lead to bone loss diseases, such as osteoporosis or cancer-associated bone metastasis. Although therapies exist to maintain bone integrity, their long-term use can cause side effects. In this work, we explored the effect of fucoidans isolated from three brown macroalgae species -*Macrocystis pyrifera*, *Sargassum muticum*, and *Undaria pinnatifida*- on bone remodeling, bone loss induced by estrogen deficiency, and bone loss caused by a breast cancer-induced osteolytic bone metastasis model. The chemical characterization of fucoidans confirmed a variable content of fucose (10-31.5 %), sulfates (26.5-41.5 %), and uronic acids (up to 44 %). Structural analysis by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) found similarities between the extracted fucoidans and their commercial analogs. In biological assays using bone marrow cells (BMCs) or preosteoblasts from mice, fucoidans significantly increased calcium deposits at higher concentrations (from 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) after 21 days in culture. In contrast, in osteoclastogenesis assays, fucoidans significantly inhibited osteoclast formation at lower concentrations (5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Gene expression assays showed a decrease in the *Rankl/Opg* ratio, suggesting an osteoprotective effect. *Ex vivo* experiments in neonatal mouse calvaria confirmed a concentration-dependent increase in bone formation and modulation of various bone remodeling genes, including *Sost*, *Runx2*, *Ctsk*, *Rankl*, and *Opg*. The effect of fucoidans was evaluated in two *in vivo* models of bone loss: by ovariectomy (OVX) and by bone metastasis. In the first model, the administration of 10 and 100  $\text{mg kg}^{-1}$  produced a significant dose-dependent bone loss. On the other hand, in the bone metastasis model, daily intraperitoneal treatment with fucoidan (10  $\text{mg kg}^{-1}$ ) significantly reduced osteolytic lesions, tumor burden, and preserved bone microarchitecture. Altogether, these findings indicate that fucoidans can have varying effects depending on the dose and concentration, demonstrating their potential as therapeutic agents against bone diseases.

**Keywords:** Anabolic agent, bone formation, bone resorption, *Macrocystis pyrifera*, *Sargassum muticum*, sulfated polysaccharide, *Undaria pinnatifida*

## **Dedicatoria**

*A mí:*

*Porque te demostraste que aun en los momentos más difíciles, pudiste crear grandes cosas.*

## Agradecimientos

Al **Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE)** por aceptarme en el Posgrado en Ciencias de la Vida para realizar mis estudios de doctorado.

A la **Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI)** por la beca de manutención a través del no. de becario: 829661.

Al **Posgrado en Ciencias de la Vida** y al **Departamento de Innovación Biomédica** por darme la oportunidad de hacer uso de los laboratorios, instalaciones y equipos que necesité durante mi proyecto.

A mi directora de tesis, **Dra. Patricia Juárez Camacho**, por permitirme formar parte de su grupo de investigación "*Ensenada Cancer and Bone Research*", por compartirme sus conocimientos en todas las áreas del proyecto, por guiarme en este viaje y por ser una amiga incondicional. Agradezco las horas invertidas de usted para mi formación académica y personal.

A los miembros de mi comité de tesis: Dr. Enrique Hernández Garibay, Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier Dra. Lorena María Durán Riveroll y Dra. Alejandra Prieto Davó.

Al **Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier**, por su apoyo en la realización de los experimentos *in vivo* y para analizar los datos e interpretarlos. También agradezco el financiamiento de su parte para la realización de este proyecto.

Al **Dr. Enrique Hernández Garibay**, experto en el área de la psicología. Agradezco su apoyo al enseñarme a extraer los compuestos utilizados en esta tesis, a caracterizarlos químicamente y a ayudarme a entender los resultados obtenidos; asimismo, le agradezco su apoyo en enseñarme a interpretar los espectros obtenidos mediante FT-IR.

A la **Dra. Lorena María Durán Riveroll**, por enseñarme el arte de la escritura científica y el encanto por la literatura.

A la **Dra. Lilian L. Plotkin**, de la Universidad de Indiana en EE. UU., por permitirme realizar una estancia de investigación en su laboratorio dedicado al estudio del hueso. Adicionalmente, agradezco su mentoría en el ámbito científico.

Al **Dr. Rodrigo Beas**, de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), experto en el monitoreo de las algas, y a su equipo de investigación por realizar la colecta de las algas utilizadas en este trabajo.

Al **Dr. Hugo Borbón**, experto en espectroscopía infrarroja del Centro de Nanociencias de la UNAM (CNyN), por su apoyo en la medición de los compuestos mediante FTIR, así como su dedicación para enseñarme a interpretar los resultados.

Al Biol. **Felipe Olvera**, del Departamento de Biología Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología (UNAM, Cuernavaca, Morelos; México) y el Dr. **Christopher David Wood** del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada en el Instituto de Biotecnología (UNAM, Cuernavaca, Morelos, México) por su apoyo y experiencia en el análisis de huesos por radiografía.

A **Adriana Mejía** y a **Carmen Labastida**, por velar por los intereses y necesidades de los estudiantes del Departamento de Innovación Biomédica.

A los doctores **Francois y Candice** de Lyon, Francia que analizaron las muestras de los huesos por  $\mu$ CT.

A **Carmen Coss**, al técnico **Rodolfo** y al **Dr. Nomura**, encargados de los procesos de histología en el Laboratorio de histopatología de Ensenada por ayudarme a embeber y cortar las muestras de calvarias necesarias para esta investigación.

A la **Dra. Johanna Bernáldez Sarabia**, por entrenarme en cultivo celular.

A los técnicos **M. en C. Samantha Mireya Jiménez Flores** y al **Dr. Ricardo Alberto González Sánchez**, por el apoyo en la disección de los ratones de los experimentos *in vivo* realizados en este proyecto.

A mis compañeros PnP: **Erasmus Pérez, Eréndira Olvera, Leslie Maya, Daniel Velázquez, Verónica Olachea, Antonio Cárdenas, Oyuki Mendoza, Tonatzin Zertuche, Brenda Iduarte, Alcira Espinoza**, por su ayuda en el proceso de los experimentos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* y por siempre estar dispuestos para apoyarme.

A mis compañeros de la Universidad de Indiana en Indianápolis: **Roquelina Pianeta, Gabriel Ramírez, Alex Teal y Lakshmi Chellaganapathy**, por su valioso apoyo en el procesamiento y análisis de las muestras de los huesos mediante  $\mu$ CT y DXA.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	xii
Lista de tablas.....	xix
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 El sistema óseo.....	2
1.1.2 Células del sistema óseo.....	2
1.1.3 Proceso de remodelación ósea.....	4
1.1.4 Remodelación ósea en desequilibrio: cuando gana la reabsorción ósea.....	6
1.1.5 Osteoporosis.....	6
1.1.6 Metástasis ósea del cáncer de mama.....	8
1.1.7 Tratamientos contra la pérdida ósea.....	9
1.1.7.1 Bisfosfonatos.....	10
1.1.7.2 Anticuerpos monoclonales.....	10
1.1.8 Efectos secundarios de las terapias contra la pérdida ósea.....	11
1.1.9 Compuestos bioactivos de origen marino.....	11
1.1.10 El fucoidan y su bioactividad.....	11
1.1.11 Efectos del fucoidan en el hueso.....	12
1.2 Justificación.....	14
1.3 Hipótesis.....	14
1.4 Objetivos.....	14

1.4.1 Objetivo general.....	14
1.4.2 Objetivos específicos.....	14
<b>Capítulo 2. Metodología .....</b>	<b>16</b>
2.1 Colecta de las algas: <i>M. pyrifera</i> , <i>S. muticum</i> y <i>U. pinnatifida</i> .....	16
2.2 Extracción de fucoïdan de las algas <i>M. pyrifera</i> , <i>S. muticum</i> y <i>U. pinnatifida</i> .....	16
2.3 Caracterización química del fucoïdan .....	17
2.3.1 Cálculo de las concentraciones, los rendimientos y las razones molares.....	19
2.4 Caracterización de los fucoïdanos por espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier.....	20
2.5 Efecto del fucoïdan en la viabilidad celular de células cancerosas y no cancerosas.....	20
2.5.1 Cultivo celular.....	20
2.5.2 Ensayo de viabilidad celular MTT .....	22
2.6 Efecto de los fucoïdanos en la remodelación ósea .....	23
2.6.1 Ensayo de osteoblastogénesis en células de médula ósea y MC3T3-E1.....	23
2.7 Efecto de los fucoïdanos en la formación ósea mediante un modelo <i>ex vivo</i> de calvaria .....	26
2.7.1 Extracción de las calvarias de ratones neonatos .....	26
2.7.2 Histología de las calvarias .....	27
2.7.3 Extracción de ARN de las calvarias.....	28
2.7.4 Retrotranscripción del ARN de las calvarias .....	28
2.7.5 Medición de la expresión de los genes óseos mediante RT-qPCR.....	29
2.8 Evaluación del efecto del fucoïdan en la pérdida ósea inducida por ovariectomía (OVX) .....	30
2.8.1 Experimento piloto: fucoïdan y ácido zoledrónico en la pérdida ósea por OVX .....	31
2.8.2 Efecto del fucoïdan extracto de <i>Undaria pinnatifida</i> en la pérdida ósea por OVX.....	32
2.8.2.1 Efecto de los fucoïdanos en la densidad mineral ósea en ratones ovariectomizados	33
2.8.2.2 Evaluación del efecto de los fucoïdanos por microtomografía computarizada ( $\mu$ CT)...	34
2.9 Efecto de los fucoïdanos en el cáncer de mama .....	34
2.9.1 Efecto del fucoïdan de <i>U. pinnatifida</i> en la migración de 4T1 .....	34
2.10 Evaluación del efecto del fucoïdan en un modelo ortotópico de cáncer de mama .....	35

2.11 Evaluación de la pérdida ósea en la metástasis ósea del cáncer de mama .....	36
2.11.1 Experimento piloto: Efecto del fucoïdan de <i>M. pyrifera</i> en la metástasis ósea .....	37
2.11.2 Efecto del fucoïdan de <i>Undaria pinnatifida</i> en la metástasis ósea.....	37
2.12 Análisis estadístico .....	38
<b>Capítulo 3. Resultados .....</b>	<b>39</b>
3.1 Extracción y caracterización del fucoïdan de <i>M. pyrifera</i> , <i>S. muticum</i> y <i>U. pinnatifida</i> .....	39
3.1.1 Caracterización química de los fucoïdanos .....	39
3.1.2 Caracterización de los fucoïdanos por FT-IR .....	42
3.2 Efecto del fucoïdan en el proceso de remodelación ósea .....	43
3.2.1 Efecto de los fucoïdanos en la viabilidad de las células MC3T3-E1 .....	43
3.2.2 Determinación de los controles para osteoblastogénesis .....	44
3.2.3 Efecto de los fucoïdanos en la osteoblastogénesis.....	44
3.2.4 Efecto de los fucoïdanos en la formación ósea mediante un modelo <i>ex vivo</i> de calvaria..	45
3.2.5 Efecto de los fucoïdanos en los genes de remodelación ósea.....	45
3.3 Efecto del fucoïdan en la pérdida ósea por ovariectomía (OVX) .....	49
3.3.1 Determinación de las dosis del fucoïdan en el modelo de OVX .....	49
3.3.2 Efecto del fucoïdan de <i>U. pinnatifida</i> en la pérdida ósea inducida por OVX.....	52
3.4 Efecto de los fucoïdanos en la viabilidad de células de cáncer de mama.....	58
3.4.1 Curvas de crecimiento celular.....	58
3.4.2 Efecto de los fucoïdanos en las células de cáncer de mama y no cancerosas.....	59
3.4.3 Efecto del fucoïdan de <i>M. pyrifera</i> y ácido zoledrónico en células de cáncer 4T1.....	59
3.4.4 Efecto combinado del fucoïdan de <i>M. pyrifera</i> y ácido zoledrónico células cancerosas .....	63
3.5 Efecto del fucoïdan de <i>U. pinnatifida</i> en la migración de células 4T1 .....	65
3.6 Efecto del fucoïdan de <i>U. pinnatifida</i> en la formación de tumores de cáncer de mama .....	67
3.7 Efecto del fucoïdan comercial de <i>Macrocystis pyrifera</i> en la metástasis ósea .....	68
3.7.1 Efecto del fucoïdan de <i>M. pyrifera</i> en la metástasis ósea <i>in vivo</i> .....	68
3.7.2 Efecto del fucoïdan de <i>U. pinnatifida</i> en la metástasis ósea.....	69

<b>Capítulo 4. Discusión.....</b>	<b>75</b>
4.1 Obtención y caracterización de los fucoïdanos.....	75
4.2 Efecto de los fucoïdanos en el proceso de remodelación ósea .....	76
4.3 Efecto de los fucoïdanos sobre los genes óseos, la reabsorción y la formación ósea .....	77
4.4 Efecto de los fucoïdanos en la pérdida ósea por OVX.....	79
4.5 Efecto de los fucoïdanos en la viabilidad de las células de cáncer de mama .....	79
4.6 Efectos del fucoïdan de <i>U. pinnatifida</i> en la migración celular.....	80
4.7 Efecto del fucoïdan de <i>U. pinnatifida</i> en la formación de tumores .....	81
4.8 Efecto del fucoïdan comercial de <i>M. pyrifera</i> en la metástasis ósea .....	82
<b>Capítulo 5. Conclusiones .....</b>	<b>84</b>
<b>Literatura citada .....</b>	<b>86</b>

## Lista de figuras

Figura	Página
<p>Figura 1. Células que conforman el hueso. Los osteoblastos activos (flechas negras) son células que forman el hueso. Se muestran osteoblastos que rodean la superficie del hueso. a), izquierda: Microfotografía histológica de secciones de fémur teñidas con Safranina O y contrateñidas con tinción de Goldner. a), derecha: Osteoblastos presentes en superficies óseas cubiertas por osteoide en secciones de hueso de rata teñidas con von Kossa y McNeal. Los osteoclastos son células que reabsorben el hueso. b), izquierda: Células multinucleadas teñidas con la tinción TRAP (en morado). b), derecha: Osteoclastos teñidos (flechas negras) mediante la tinción TRAP en secciones de hueso trabecular del fémur distal de ratones. Los osteocitos son células mecanosensoras que modulan el proceso de remodelación ósea. c), izquierda: Imagen de reconstrucción tridimensional de la red de osteocitos en el hueso de pollo. c), derecha: Imagen microscópica de un osteocito, obtenida con un microscopio electrónico de barrido por emisión de campo. Obtenido y modificado de (Bellido et al., 2019; Robling y Bonewald, 2020; Safadi et al., 2009).....</p>	3
<p>Figura 2. Microfotografía de una unidad multicelular básica ósea. Al comienzo del proceso de remodelación ósea, se forman BMUs que permiten la interacción entre diferentes células óseas. Se observa una BMU de una sección del hueso cortical de una vértebra de ratón. La imagen se tomó con un microscopio electrónico de barrido y posteriormente se coloreó. Obtenido y modificado de Gasser y Kneissel (2017).....</p>	5
<p>Figura 3. La remodelación ósea es dinámica e involucra diferentes células. La remodelación ósea es un ciclo complejo dividido en diferentes fases: reposo, reabsorción, reversa, formación y mineralización. Imagen obtenida y modificada de Arakil et al. (2024).....</p>	5
<p>Figura 4. La microarquitectura ósea se altera con la osteoporosis. Comparación de la densidad ósea entre un hueso normal versus uno con osteoporosis. a) Reconstrucción tridimensional de una vértebra de una paciente sana de 24 años. b) Reconstrucción tridimensional de una vértebra de un paciente de 84 años con osteoporosis. Nótese el deterioro de las trabéculas. Imagen obtenida y modificada de Pavy-Le Traon et al. (2007).....</p>	7
<p>Figura 5. Efecto de los estrógenos y andrógenos en el cuerpo. El estrógeno regula el remodelado óseo suprimiendo la formación y activación de los osteoclastos (flechas truncadas azules) mientras estimula la activación y la mineralización de los osteoblastos (flechas azules). Los andrógenos inhiben la diferenciación de los precursores mesenquimales de los osteoblastos (flecha truncada azul), pero promueven la diferenciación de los osteoblastos (flechas rojas). Durante el tratamiento con los inhibidores de la aromatasa se disminuyen los niveles de estrógeno y la reabsorción y formación ósea se desbalancean, lo que da como resultado la pérdida ósea. Las flechas se refieren al rol de promoción, y el símbolo de flechas truncadas “⊥” se refiere al rol de inhibición (Almeida et al., 2017). .....</p>	7
<p>Figura 6. Cascada de invasión metastásica. El paso inicial de la invasión permite que las células del tumor primario rompan la membrana basal. Después estas células pueden intravasarse en los microvasos linfáticos o sanguíneos. Estos últimos pueden transportar a las células cancerosas a través de la circulación general hacia sitios anatómicos distantes donde pueden quedar</p>	

- atrapadas, posteriormente extravasarse y formar micrometástasis dormantes. Algunas de las micrometástasis pueden adquirir la capacidad de colonizar el tejido en el que han aterrizado, lo que les permite formar una metástasis macroscópica. Imagen obtenida y modificada de Arakil et al. (2024). .....8
- Figura 7. Estructura química del fucoidan. El fucoidan es un polisacárido sulfatado, formado por unidades de fucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) y  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), con grupos sulfato en los carbonos 2 y/o 4. Además esta molécula puede tener pequeñas cantidades de otros azúcares como galactosa, manosa o xilosa, así como ácido urónico y grupos acetilo, lo que le confiere una elevada carga negativa. La estructura del fucoidan varía de acuerdo con la especie del alga y el método de extracción. Imagen obtenida de Kang et al. (2015). ..... 12
- Figura 8. a) Región de muestreo en el estado de Baja California propuesta por (Rubio-Polania et al., 2016). b) Diagrama ilustrativo de la forma de colecta de los especímenes (Beas-Luna y Lada, 2014). ..... 16
- Figura 9. Diagrama de flujo para la obtención de fucoidan. .... 17
- Figura 10. Líneas celulares empleadas en los ensayos de viabilidad celular. (a y b): Líneas celulares no cancerosas (MC3T3-E1 y 293T). (c y d): Líneas celulares de cáncer de mama de ratón (4T1 y PyMT-R221A). (e-g): Líneas celulares de cáncer de mama de humano (MDA-MB-231, MCF-7 y T47-D). Barra 400  $\mu$ M. .... 22
- Figura 11. Anatomía de la calvaria murina. Ubicación de las suturas óseas en la calvaria murina. a) Distribución de los cortes realizados sobre la calvaria. b) Modificado de Mohammad et al., (2008). ..... 26
- Figura 12. Ovariectomía en los ratones. Sitios de incisión para acceder a la cavidad abdominal mediante doble incisión dorsolateral. a) Escisión de los ovarios. b) X denota corte. Modificado de Souza et al., (2019). ..... 30
- Figura 13. Región de corte entre la lumbar 1 y el sacro 1. La imagen superior muestra una tomografía computarizada, y la imagen inferior muestra una resonancia magnética del esqueleto axial de un ratón. X denota corte. Tomado y modificado de Harrison et al. (2013). ..... 33
- Figura 14. Inoculación intracardiaca en el ventrículo izquierdo del corazón. a) Vista radiográfica del tórax de un ratón adulto que muestra la zona adecuada para la inoculación intracardiaca. b) La muesca esternal y el apéndice xifoides (línea horizontal punteada superior e inferior, respectivamente) sirven como puntos de referencia anatómicos para la inoculación intracardiaca. Obtenido y modificado de Campbell et al. (2012). ..... 36
- Figura 15. Curvas estándar para la caracterización química de los extractos de fucoidan. a) Curva estándar de fucosa, b) curva estándar de carbohidratos totales, c) curva estándar de sulfatos y d) curva estándar de ácidos urónicos. .... 40
- Figura 16. Modelo ramificado de Percival. Estructura que muestra los grupos sulfatos que se encuentran enlazados a la molécula principal de fucosa en los carbonos número 3 y 4. .... 41
- Figura 17. Espectros de FT-IR de los fucoidanos. Las líneas verticales en rosado señalan los picos característicos del fucoidan: 1,620  $\text{cm}^{-1}$  (C=O, ácidos urónicos); 1,417  $\text{cm}^{-1}$  (CH<sub>3</sub>, grupos carboxilos de los ácidos urónicos); 1,250  $\text{cm}^{-1}$  (S=O, vibración de estiramiento de los grupos

sulfato) y  $840 \text{ cm}^{-1}$  (C-4 axial de los grupos sulfato). UPC= *U. pinnatifida* comercial, UP= *U. pinnatifida* extracto, SM= *S. muticum* extracto, MPE= *M. pyrifera* extracto y MPC= *M. pyrifera* comercial. .... 42

Figura 18. Efecto de los fucoidanos en la viabilidad de los preosteoblastos de ratón MC3T3-E1. (a y d) Las células MC3T3-E1 se trataron con diferentes concentraciones de cada fucoidan ( $5\text{-}160 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) por 24 h. (b y c) Los fucoidanos comerciales no tuvieron efecto en la viabilidad celular, pero los fucoidanos extraídos de *M. pyrifera* y *S. muticum* la inhibieron significativamente. e) Solo el fucoidano extraído de *U. pinnatifida* promovió el aumento en la viabilidad de las células con bajas concentraciones. Los resultados se presentan como gráficas de barras con todos los valores individuales ( $n=4$  replicados biológicos) y el error sobre la media ( $\pm\text{SEM}$ ). ANOVA de una vía seguido del post test de Dunnett. El valor  $P<0.05$  se consideró como estadísticamente significativo. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$  y ns como no significativo. .... 43

Figura 19. Panel de selección de controles para la osteoblastogénesis. Imágenes representativas de la tinción con rojo de alizarina S que muestran la mineralización formada posterior a 21 días de cultivo. De izquierda a derecha se muestra el control de dexametasona  $10 \text{ nM}$ ; ácido ascórbico  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $\beta$ -glicerofosfato  $5 \text{ mM}$ ; la combinación de dexametasona  $10 \text{ nM}$ , ácido ascórbico  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $\beta$ -glicerofosfato  $5 \text{ mM}$ ; y la combinación de ácido ascórbico  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $\beta$ -glicerofosfato  $5 \text{ mM}$ . De arriba a abajo se muestra el efecto en la mineralización de las células de médula ósea y de las células MC3T3-E1, respectivamente. Aumento  $200\times$ . .... 44

Figura 20. El fucoidan modula la osteoblastogénesis en las células de médula ósea. a) Efecto de los fucoidanos aislados de *M. pyrifera*, b) *S. muticum* y c) *U. pinnatifida*. Imágenes representativas de los depósitos de calcio producidos por las células de médula ósea después de 21 días de exposición a los fucoidanos. Control positivo ( $C^+$ ): medio completo  $\alpha$ -MEM con ácido ascórbico y  $\beta$ -glicerofosfato sin fucoidan. Control negativo ( $C^-$ ): medio completo  $\alpha$ -MEM. Aumento  $100\times$ . Las imágenes mostradas son representativas de tres experimentos independientes, cada uno con cuadruplicados ( $n=4$ ). d) Evaluación cuantitativa de las imágenes de ARS por medio de la densidad integrada (área  $\times$  intensidad de rojo). ANOVA de una vía seguida del post test de Tukey. Para todas las comparaciones  $p<0.05$  se consideró significativo. .... 46

Figura 21. Los fucoidanos aumentan los depósitos de calcio con altas concentraciones durante la diferenciación de las células MC3T3-E1. Imágenes representativas de la tinción con rojo alizarina S de células MC3T3-E1 que muestran depósitos de fosfato de calcio (rojo) tras 21 días de tratamiento con fucoidan a  $5, 50, 100, 200$  y  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Los fucoidanos se aislaron de a) *M. pyrifera*, b) *S. muticum* y c) *U. pinnatifida*. Control positivo ( $C^+$ ): medio  $\alpha$ -MEM completo con ácido ascórbico y  $\beta$ -glicerofosfato sin fucoidan. Control negativo ( $C^-$ ): medio  $\alpha$ -MEM completo. Aumento  $100\times$ . Imágenes representativas de tres experimentos independientes con cuadruplicados ( $n=4$ ). d) La mineralización se evaluó cuantitativamente por medio de la densidad integrada de las imágenes teñidas con ARS. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post test de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con  $p<0.05$ . .... 47

Figura 22. Efecto de los fucoidanos en el tejido de calvaria. Secciones del tejido de las calvarias teñidas con H&E correspondientes a a) *M. pyrifera*, b) *S. muticum* y c) *U. pinnatifida* (aumento  $400\times$ ). Los fucoidanos promovieron de manera diferente el área de nuevo hueso (d-f). Análisis histomorfométrico del área de formación ósea. Los resultados se expresan como diagramas de cajas con bigotes con valores individuales de los datos ( $n = 9$ ). ANOVA de una vía con post test de Dunnett. Los resultados de la cuantificación se expresaron con sus respectivos valores de p. OB: old bone (viejo hueso) y NB: new bone (hueso nuevo). .... 48

- Figura 23. Efecto de los fucoidanos en los genes de remodelación ósea. (a-e) Expresión génica de los marcadores de formación y reabsorción ósea en calvarias de ratón neonato tratadas con 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de cada fucoidan. f) La relación *Rankl/Opg* muestra que solo el fucoidan extraído de *U. pinnatifida* redujo significativamente la capacidad osteoclástica. Los resultados se presentan como gráficos de barras con valores individuales de los datos ( $n = 4$ ). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con la prueba post hoc de Tukey. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró significativo. Control: medio completo, C+: insulina 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , MPE: *M. pyrifera* extracto, SM: *S. muticum* extracto, UPE: *U. pinnatifida* extracto. .... 49
- Figura 24. Efecto del fucoidan comercial y del ácido zoledrónico en los pesos de los ratones. Los ratones Balb/c se pesaron una vez por semana durante ocho semanas. Análisis de modelos mixtos con post test de Sidak. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.000$  y ns como no significativo cuando se compararon contra el control OVX. Los resultados se expresaron como # $P < 0.05$ ; ## $P < 0.01$ ; ### $P < 0.001$ ; #### $P < 0.0001$  y ns como no significativo cuando se compararon contra el control *sham*. .... 50
- Figura 25. Efecto del fucoidan y del ácido zoledrónico en el peso del útero. Los ratones Balb/C fueron tratados con fucoidan (100  $\text{mg kg}^{-1}$ ) o ácido zoledrónico (1.25  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) durante cuatro semanas. Los úteros se disectaron 48 h después del último tratamiento. Úteros disectados (a). Pesos de los úteros en relación con el peso corporal de los ratones (b). ANOVA de una vía con post test de Dunnett. Los resultados de la cuantificación se expresaron como la media  $\pm$  SEM \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.000$  y ns como no significativo. .... 50
- Figura 26. Efecto del fucoidan y del ácido zoledrónico en el hueso trabecular de ratones ovariectomizados tratados con el fucoidan de *U. pinnatifida*. a) Fracción del volumen óseo (% BV/TV), b) espesor trabecular (Tb. Th), c) separación trabecular (Tb. Sp), d) número trabecular (Tb. N), e) densidad de conectividad (Conn.D) y f) Densidad Mineral ósea (BMD). ANOVA de una vía con post test de Dunnett. Los resultados cuantificados se expresaron como la media  $\pm$  SEM \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$  y ns como no significativo. .... 51
- Figura 27. Efecto del fucoidan extraído de *U. pinnatifida* en la morfología y el peso de los úteros de los ratones C57BL/6 ovariectomizados. a) Diseño experimental. b) Porcentaje de cambio de peso a partir del peso inicial de cada ratón. Análisis de modelos mixtos con post test de Sidak. Los resultados se expresaron como # $P < 0.05$ ; ## $P < 0.01$ ; ### $P < 0.001$ ; #### $P < 0.0001$  y ns como no significativo cuando se compararon contra el control *sham*. c) Imágenes que muestran la morfología de los úteros que recibieron la ovariectomía bilateral o la cirugía simulada. Nótese que los grupos control (OVX) y los tratados con 100 y 10  $\text{mg kg}^{-1}$  de fucoidan provocaron el adelgazamiento de los úteros. d) Cuantificación de los pesos de los úteros. ANOVA de una vía con post test de Dunnett. .... 53
- Figura 28. Efecto del fucoidan extraído de *Undaria pinnatifida* en la densitometría ósea de los fémures y vértebras de los ratones ovariectomizados. a) DXA de los fémures. b) DXA de las vértebras lumbares L1-L4. ANOVA de una vía con post test de Dunnett. Los resultados se expresaron como gráfica de cajas con bigotes con todos los puntos. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  y ns como no significativo cuando se compararon con el control OVX o *sham*. .... 54
- Figura 29. Efecto de los tratamientos del fucoidan de *Undaria pinnatifida* en el hueso cortical de los ratones ovariectomizados. El hueso cortical de los fémures de los ratones ovariectomizados se midió y se determinó que ningún tratamiento con fucoidan alteró los parámetros del hueso cortical. a) Área total (TA), b) área de hueso (BA), c) relación del área transversal total ocupada

- por tejido óseo (BA/TA), d) área de médula ósea (Ma. Ar), e) grosor cortical (Ct. Th.) y f) densidad mineral ósea (BMD). ANOVA de una vía con post test de Dunnett. Los resultados se expresaron como gráfica de cajas con bigotes con todos los puntos y ns significa no significativo cuando se compararon con los controles. .... 55
- Figura 30. Efecto de los tratamientos del fucoïdan de *U. pinnatifida* en el hueso trabecular de los ratones ovariectomizados. Se midieron los parámetros relacionados con el hueso trabecular en los fémures de los ratones ovariectomizados. a) Volumen óseo (BV), b) volumen total (TV), c) fracción del volumen óseo por volumen total (BV/TV), d) grosor trabecular (Tb. Th.), e) separación trabecular (Tb. Sp.), f) número trabecular (Tb. N.), g) densidad de conectividad (Conn. D) y h) densidad mineral ósea. ANOVA de una vía con post test de Dunnett. Los resultados se expresaron como gráfica de cajas con bigotes con todos los puntos. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001 y ns como no significativo cuando se compararon contra el control OVX o sham ..... 56
- Figura 31. Efecto del fucoïdan extraído de *U. pinnatifida* en la pérdida ósea inducida por OVX. El panel superior muestra imágenes representativas del hueso cortical (vistos como discos blancos) de los fémures de los ratones ovariectomizados y tratados con el fucoïdan de *U. pinnatifida*. En el panel central se muestran imágenes representativas del hueso trabecular de los grupos de estudio. Nótese las áreas de pérdida ósea en los grupos OVX y de 100 mg kg<sup>-1</sup> del fucoïdan. En el panel inferior se observan imágenes representativas de las reconstrucciones de los fémures de los grupos de estudio. Barra 1 mm. .... 57
- Figura 32. Curvas de crecimiento en las células de cáncer de mama y no cancerosas. Panel de gráficas de crecimiento celular para a) MC3T3-E1, b) 293T, c) 4T1, d) PyMT-R221A, e) MDA-MB-231, f) MCF-7 y g) T47-D. .... 58
- Figura 33. Efecto de los fucoïdanos en la viabilidad celular de distintas líneas celulares de cáncer de mama y no cancerosas. Gráficas de barras que muestran el efecto de los fucoïdanos en la viabilidad de diferentes células de cáncer comparadas con las células normales 293T. Los resultados se presentan como gráficas de barras con todos los valores individuales (n=4 replicados biológicos) y el error sobre la media ( $\pm$ SEM). ANOVA de una vía seguido del post test de Dunnett. El valor P<0.05 se consideró como estadísticamente significativo. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001 y ns como no significativo. .... 60
- Figura 34. Efecto de los fucoïdanos en la viabilidad celular de distintas líneas celulares de cáncer de mama humano. Gráficas de barras que muestran el efecto de los fucoïdanos en la viabilidad de diferentes células de cáncer de mama humano a 24 y 48 h de exposición. Los resultados se presentan como gráficas de barras con todos los valores individuales (n=4 replicados biológicos) y el error sobre la media ( $\pm$ SEM). ANOVA de una vía seguido del post test de Dunnett. El valor p<0.05 se consideró como estadísticamente significativo. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001 y ns como no significativo. .... 61
- Figura 35. Efecto del fucoïdan comercial de *M. pyrifera* en la viabilidad celular de 4T1. Las células 4T1 se cultivaron en presencia o ausencia del fucoïdan por 24, 48 y 72 h antes de la medición de la viabilidad celular. Las concentraciones de 80 y 160  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> mantuvieron su efecto inhibitorio hasta las 72 h. Cada condición se evaluó por cuadruplicado y la absorbancia se midió a 570 nm. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; y \*\*\*\*P<0.0001. ANOVA de una vía con el post test de Bonferroni. .... 62

- Figura 36. Efecto del ácido zoledrónico en la viabilidad celular de 4T1. Las concentraciones de 75 y 100  $\mu\text{M}$  inhibieron más del 50 % de la viabilidad celular a partir de 48 h de exposición a los tratamientos. El efecto inhibitorio se mantuvo hasta las 72 h en la concentración de 100  $\mu\text{M}$ . Cada condición se evaluó por cuadruplicado y la absorbancia se midió a 570 nm. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; y \*\*\*\* $P < 0.0001$ . ANOVA de una vía con el post test de Bonferroni. .... 63
- Figura 37. Efecto combinado del fucoïdan y del ácido zoledrónico en la viabilidad de células de cáncer 4T1. Las células 4T1 se trataron en presencia o ausencia del fucoïdan y ácido zoledrónico por 24 y 48 h. MPC = fucoïdan comercial de *M. pyrifera*. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; y \*\*\*\* $P < 0.0001$ . ANOVA de una vía con el post test de Bonferroni. .... 64
- Figura 38. El fucoïdan de *U. pinnatifida* inhibe la migración de las células 4T1. a) Ensayo de la herida realizado en células 4T1 tratadas con 160  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de los fucoïdanos. Panel de imágenes representativas que muestra la trayectoria del cierre de la herida a través del tiempo. Nótese que en las últimas dos columnas no hay un cierre de la herida. b) Gráfica de líneas que muestra la cuantificación del porcentaje del cierre de la herida en diferentes tiempos. ANOVA de dos vías con post test de Tukey. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  y \*\*\*\* $P < 0.0001$ . .... 66
- Figura 39. Efecto del tratamiento del fucoïdan de *Undaria pinnatifida* en un modelo ortotópico de cáncer de mama. a) Los ratones Balb/c se pesaron tres veces por semana durante un mes. Se determinó el porcentaje de cambio de peso de los ratones con tumores primarios. b) Volumen de los tumores. c) Morfología de los tumores al finalizar el régimen de tratamiento. d) Peso de los tumores. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  y \*\*\*\* $P < 0.0001$  cuando se compararon con el control PBS 1X. UPE: *U. pinnatifida* extracto. .... 67
- Figura 40. Variación del peso de los ratones en el experimento de metástasis ósea. Se determinó el peso relativo medio de los ratones con metástasis ósea tratados con fucoïdan (100 mg  $\text{kg}^{-1}$ ) y se comparó con ratones que recibieron PBS 1X como control. Análisis de modelos mixtos con post test de Sidak. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  y ns como no significativo cuando se compararon con el control PBS 1X. .... 68
- Figura 41. Radiografías de los fémures y tibias en el tratamiento de la metástasis ósea. a) Imágenes representativas de los ratones tratados con el fucoïdan de *U. pinnatifida*. Las flechas blancas muestran las áreas de osteólisis. b) Cuantificación de las áreas de osteólisis. ANOVA de una vía con post test de Dunnet. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. ns significa no significativo cuando se compararon con el control. .... 69
- Figura 42. Efecto del tratamiento del fucoïdan en el peso de los ratones con metástasis ósea. Los ratones Balb/c se pesaron diariamente durante doce días. Se determinó el porcentaje del cambio de peso de los ratones con metástasis ósea. Nótese que los grupos que recibieron el tratamiento con el fucoïdan de *U. pinnatifida* evitaron la pérdida de peso significativamente. Análisis de modelos mixtos con post test de Sidak. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  y ns como no significativo cuando se compararon con el control PBS 1X. .... 70

- Figura 43. Morfología y peso de los bazos de los ratones con metástasis ósea tratados con el fucoïdan de *U. pinnatifida*. Los ratones Balb/c se trataron con dos fuentes de fucoïdan de *Undaria pinnatifida*: un extracto y uno comercial. a) Morfología de los bazos. b) Pesos de los bazos. ANOVA de una vía con post test de Dunnett. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.000$  y ns como no significativo cuando se compararon con el control PBS 1X. .... 70
- Figura 44. Efecto del fucoïdan de *U. pinnatifida* en la metástasis ósea del cáncer de mama. a) Imágenes representativas de radiografías correspondientes a los fémures y tibias de los ratones con metástasis ósea. b) Fémures tratados con el fucoïdan de *U. pinnatifida*. (c) Cuantificación de las áreas de osteólisis (d). Cuantificación del área de hueso y del tumor en los cortes histológicos. Aumento 100X. Los resultados se expresaron como gráfica de cajas con bigotes con todos los puntos. ANOVA de una vía con post test de Dunnett. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  y ns como no significativo cuando se compararon con el control PBS. .... 71
- Figura 45. Efecto de los tratamientos del fucoïdan de *U. pinnatifida* en el hueso cortical de los ratones con metástasis ósea. El hueso cortical de los fémures de los ratones con metástasis se midió y se determinó que ningún tratamiento con fucoïdan alteró los parámetros del hueso cortical. a) Área total (TA), b) área de hueso (BA), c) relación del área transversal total ocupada por tejido óseo (BA/TA), d) área de médula ósea (Ma. Ar), e) grosor cortical (Ct. Th.) y f) densidad mineral ósea (BMD). ANOVA de una vía con post test de Dunnett. Los resultados se expresaron como gráfica de cajas con bigotes con todos los puntos. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  y ns como no significativo cuando se compararon con el control PBS y entre grupos. .... 72
- Figura 46. Efecto de los tratamientos del fucoïdan de *Undaria pinnatifida* en el hueso trabecular de los ratones con metástasis ósea. Se midieron los parámetros relacionados con el hueso trabecular en los fémures de los ratones con metástasis ósea. a) Volumen óseo (BV), b) volumen total (TV), c) fracción del volumen óseo por volumen total (BV/TV), d) grosor trabecular (Tb. Th.), e) separación trabecular (Tb. Sp.), f) número trabecular (Tb. N.), g) densidad de conectividad (Conn. D) y h) densidad mineral ósea. ANOVA de una vía con post test de Dunnett. Los resultados se expresaron como gráfica de cajas con bigotes con todos los puntos. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  y ns como no significativo cuando se compararon contra el control PBS. .... 73
- Figura 47. Efecto del fucoïdan de *U. pinnatifida* en la pérdida ósea inducida por la metástasis ósea del cáncer de mama. En el panel superior se muestran imágenes del hueso cortical de los fémures de los ratones con metástasis ósea. En el panel central se muestran imágenes del hueso trabecular de los grupos de estudio. El panel inferior muestra imágenes representativas de las reconstrucciones de los fémures en 3D. Barra 1 mm. .... 74

## Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Lista de genes y primers utilizados para medir los genes de remodelación ósea.....	29
Tabla 2. Esquema de analgesia y antiinflamatorios postoperatorios. ....	31
Tabla 3. Grupos y dosis evaluados en el experimento piloto de OVX.....	31
Tabla 4. Órganos disectados de los ratones ovariectomizados. ....	32
Tabla 5. Grupos y dosis evaluados en el experimento de OVX. ....	32
Tabla 6. Órganos disectados de los ratones ovariectomizados. ....	33
Tabla 7. Grupos y dosis evaluados en el modelo ortotópico de cáncer de mama. ....	35
Tabla 8. Grupos y dosis evaluados en el experimento piloto del modelo de metástasis ósea.....	37
Tabla 9. Grupos y dosis evaluados en el modelo de metástasis ósea.....	38
Tabla 10. Lista de órganos y células colectadas a partir del experimento de metástasis ósea. ....	38
Tabla 11. Contenido de fucoidan a partir de 1 g de alga de cada especie en las extracciones realizadas. .....	39
Tabla 12. Composición porcentual del contenido de carbohidratos totales, fucosa, ácidos urónicos y sulfatos. ....	41
Tabla 13. Razones molares de los fucoidanos.....	41

## Capítulo 1. Introducción

---

El tejido óseo es un sistema complejo y dinámico en el que se mantiene un equilibrio entre los procesos de reabsorción y formación ósea. Este balance depende principalmente de la acción coordinada de tres tipos de células: los osteoclastos, los osteoblastos y los osteocitos. En condiciones fisiológicas, este balance permite mantener la densidad mineral ósea y reparar microdaños derivados de las actividades cotidianas. Sin embargo, cuando este equilibrio se rompe, surgen patologías que promueven la pérdida o la formación ósea excesiva.

La osteoporosis constituye una enfermedad metabólica ósea de relevancia clínica a nivel mundial. Se presenta principalmente en mujeres posmenopáusicas, en las cuales la caída de los niveles de estrógenos disminuye su efecto osteoprotector. Este proceso se provoca la pérdida de masa ósea, el adelgazamiento del hueso cortical y el deterioro de la microarquitectura trabecular.

Por otro lado, la metástasis ósea es otra condición que refleja la compleja interacción entre las células tumorales y el microambiente óseo. En el caso del cáncer de mama, las células que llegan al hueso estimulan a las células óseas para activar a los osteoclastos y promover la reabsorción ósea. El resultado es la formación de lesiones osteolíticas que provocan dolor intenso, fracturas, hipercalcemia y la muerte de los pacientes.

El manejo clínico actual de la pérdida ósea incluye el uso de bisfosfonatos o anticuerpos monoclonales como el ácido zoledrónico y el denosumab, respectivamente. Sin embargo, su consumo a largo plazo provoca efectos secundarios como la osteonecrosis mandibular y el síndrome musculoesquelético. Lo anterior evita la adherencia terapéutica a la medicación y promueve la progresión de la enfermedad principal. Ante este panorama, la búsqueda de nuevos compuestos con potencial terapéutico ha cobrado relevancia. En particular, los polisacáridos sulfatados derivados de las algas pardas, conocidos como fucoidanos, han despertado interés por sus múltiples actividades biológicas. Recientemente, se ha descrito su potencial para modular a las células óseas y evitar la proliferación de las células de cáncer de mama. En este contexto, el estudio del efecto de los fucoidanos como moduladores del proceso de remodelación ósea y como agentes con potencial en escenarios de pérdida ósea por la osteoporosis y la metástasis se vuelve relevante. Estas moléculas, con capacidad de actuar sobre distintos componentes celulares y moleculares del tejido óseo, podrían convertirse en una estrategia terapéutica innovadora que podría preservar la microarquitectura del hueso y evitar la progresión tumoral.

## 1.1 Antecedentes

### 1.1.1 El sistema óseo

El sistema óseo cumple múltiples funciones esenciales, entre las que destacan el soporte estructural del organismo, el anclaje de los músculos, los tendones y los ligamentos, así como la protección de los órganos vitales (da Costa Reis y Oliveira, 2020). Además, la médula ósea desempeña un papel crucial en la hematopoyesis y actúa como reservorio de minerales como el calcio y el fósforo (Ansari, 2019). El hueso es una matriz mineralizada formada por células óseas embebidas en una red de fibras de colágeno y cristales inorgánicos como la hidroxiapatita (Rosen, 2009). La composición del hueso se distribuye en alrededor de un 20-40 % de la matriz orgánica, un 50 % de componentes minerales y 5-10 % de agua (Wolde-Semail y Komlos, 2020).

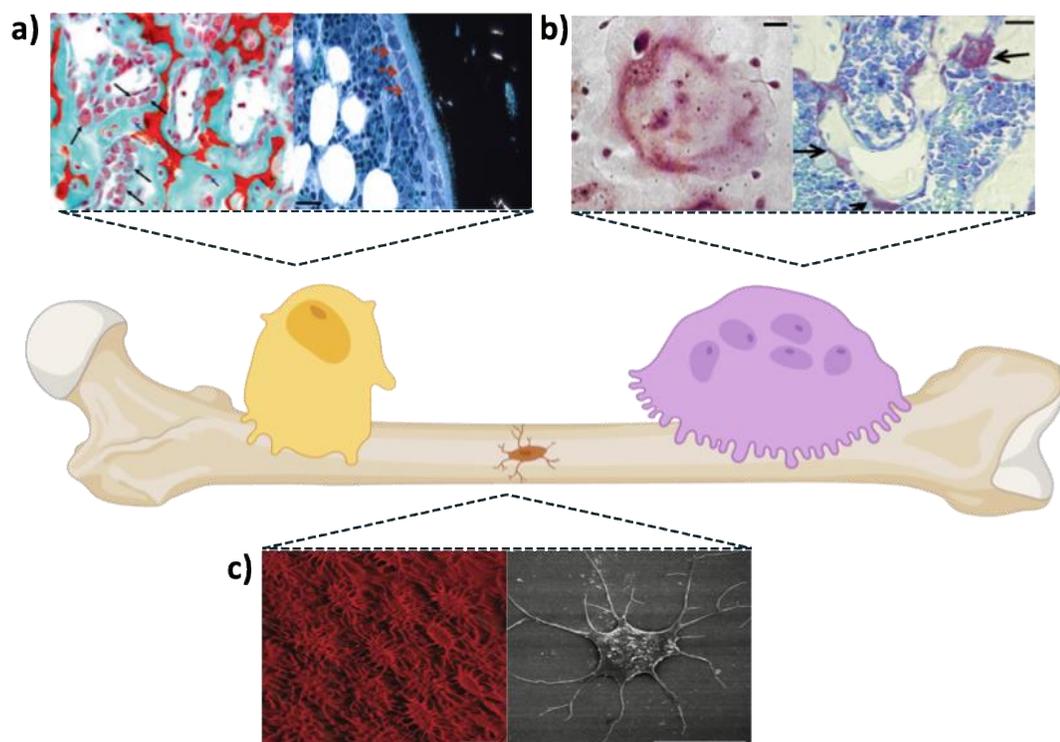
### 1.1.2 Células del sistema óseo

La homeostasis del hueso está regulada por distintos tipos celulares que se originan en la médula ósea (Bellido et al., 2019): los osteoblastos, los osteoclastos y los osteocitos.

Los osteoblastos son los responsables de la formación del hueso. Su principal función es la síntesis y la secreción de matriz ósea compuesta por colágeno tipo I y proteínas no colágenas, además de regular la mineralización a través de enzimas como la fosfatasa alcalina (ALP), osteocalcina (OCN) y osteopontina (OPN) (Bellido, 2014). Los osteoblastos se originan a partir de un precursor multipotente de origen mesenquimal, el cual también da lugar a condrocitos, adipocitos, miocitos y fibroblastos. La diferenciación hacia cada una de estas líneas celulares está regulada por factores de transcripción específicos, comúnmente denominados factores de transcripción maestros. (Grabowski, 2009). La diferenciación hacia osteoblastos mediada por las proteínas morfogénicas óseas (BMPs, por sus siglas en inglés) y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF, por sus siglas en inglés), entre otras proteínas. Las vías de señalización que intervienen en la formación y la diferenciación de las células óseas son Wnt/ $\beta$ -catenina y la de Hedgehog. Una vez diferenciados, los osteoblastos pueden embeberse en la matriz mineral ósea, convertirse en células de revestimiento óseo o sufrir apoptosis (Rutkovskiy et al., 2016)(Figura 1 a).

Por otro lado, los osteoclastos son células grandes ( $\sim 100 \mu\text{m}$ ), multinucleadas, que degradan el tejido óseo

dañado o innecesario. Estas células se originan de progenitores hematopoyéticos de la línea monocito-macrófago, y su diferenciación está mediada por el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, por sus siglas en inglés) y por el ligando del receptor activador del factor nuclear  $\kappa\beta$  (RANKL, por sus siglas en inglés) (Boyle et al., 2003). El M-CSF promueve la proliferación y supervivencia de los precursores mieloides, mientras que RANKL, al unirse con el receptor RANK, activa vías de señalización intracelular como NF- $\kappa\beta$ , MAPK y NFATc1; este último considerado como el regulador maestro de la osteoclastogénesis (Asagiri y Takayanagi, 2007). Estas señales promueven la fusión de células mononucleadas para formar osteoclastos multinucleados capaces de adherirse a la superficie del hueso y formar un borde en cepillo especializado a través del cual secretan protones, enzimas lisosomales (como la catepsina K, CTSK) y la fosfatasa alcalina resistente al tartrato (TRAP, por sus siglas en inglés), que degradan la matriz mineral y orgánica (Xu y Teitelbaum, 2013) (Figura 1 b).



**Figura 1. Células que conforman el hueso.** Los osteoblastos activos (flechas negras) son células que forman el hueso. Se muestran osteoblastos que rodean la superficie del hueso. a), izquierda: Microfotografía histológica de secciones de fémur teñidas con Safranina O y contrateñidas con tinción de Goldner. a), derecha: Osteoblastos presentes en superficies óseas cubiertas por osteoide en secciones de hueso de rata teñidas con von Kossa y McNeal. Los osteoclastos son células que reabsorben el hueso. b), izquierda: Células multinucleadas teñidas con la tinción TRAP (en morado). b), derecha: Osteoclastos teñidos (flechas negras) mediante la tinción TRAP en secciones de hueso trabecular del fémur distal de ratones. Los osteocitos son células mecanosensoras que modulan el proceso de remodelación ósea. c), izquierda: Imagen de reconstrucción tridimensional de la red de osteocitos en el hueso de pollo. c), derecha: Imagen microscópica de un osteocito, obtenida con un microscopio electrónico de barrido por emisión de campo. Obtenido y modificado de (Bellido et al., 2019; Robling y Bonewald, 2020; Safadi et al., 2009).

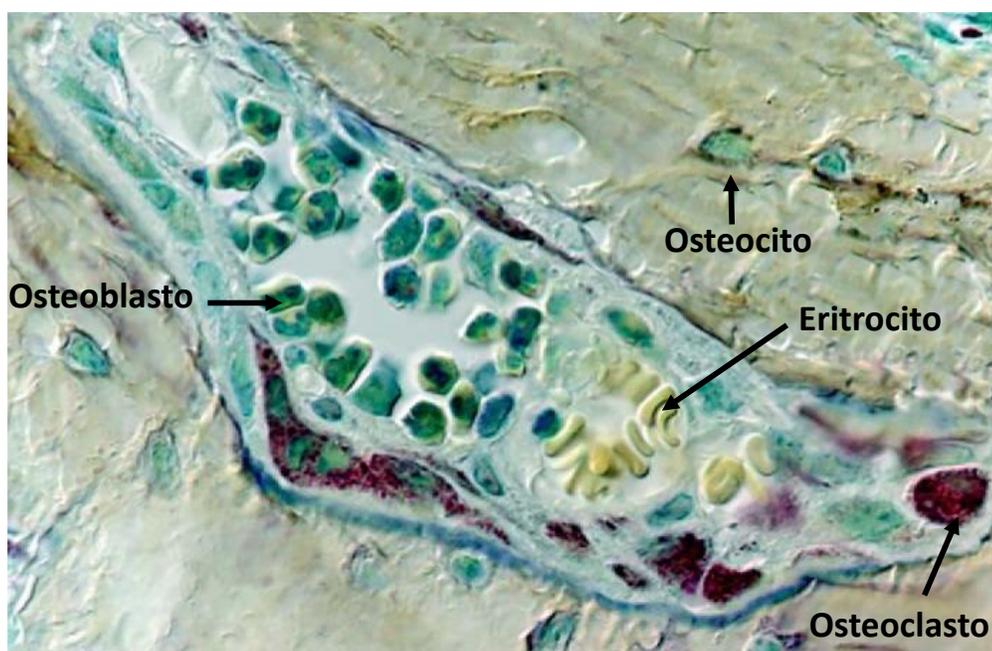
Por su parte, los osteocitos son las células más abundantes del hueso y derivan de los osteoblastos que quedan embebidos en la matriz mineralizada durante el proceso de formación ósea. Morfológicamente, estas células tienen prolongaciones citoplasmáticas que se extienden a través de canaliculos, lo que les permite establecer una red interconectada y mantener la comunicación con osteoblastos, osteoclastos y otras células óseas (Bonewald, 2011). Su función principal es reguladora, ya que los osteocitos detectan cambios mecánicos y minerales (Dallas et al., 2013). Estas células regulan la actividad de reabsorción y formación ósea a través de la secreción de esclerostina y de la modulación del RANKL (Figura 1 c).

Finalmente, las células de revestimiento óseo desempeñan un rol regulador en el proceso de remodelado óseo al comunicarse con los osteocitos y proveer de señales para la iniciación de la diferenciación de células madre hematopoyéticas a osteoclastos. Adicionalmente, son las encargadas de preparar la superficie del hueso al degradar fibras de colágeno no mineralizadas con el uso de las metaloproteinasas de matriz (Florencio-Silva et al., 2015).

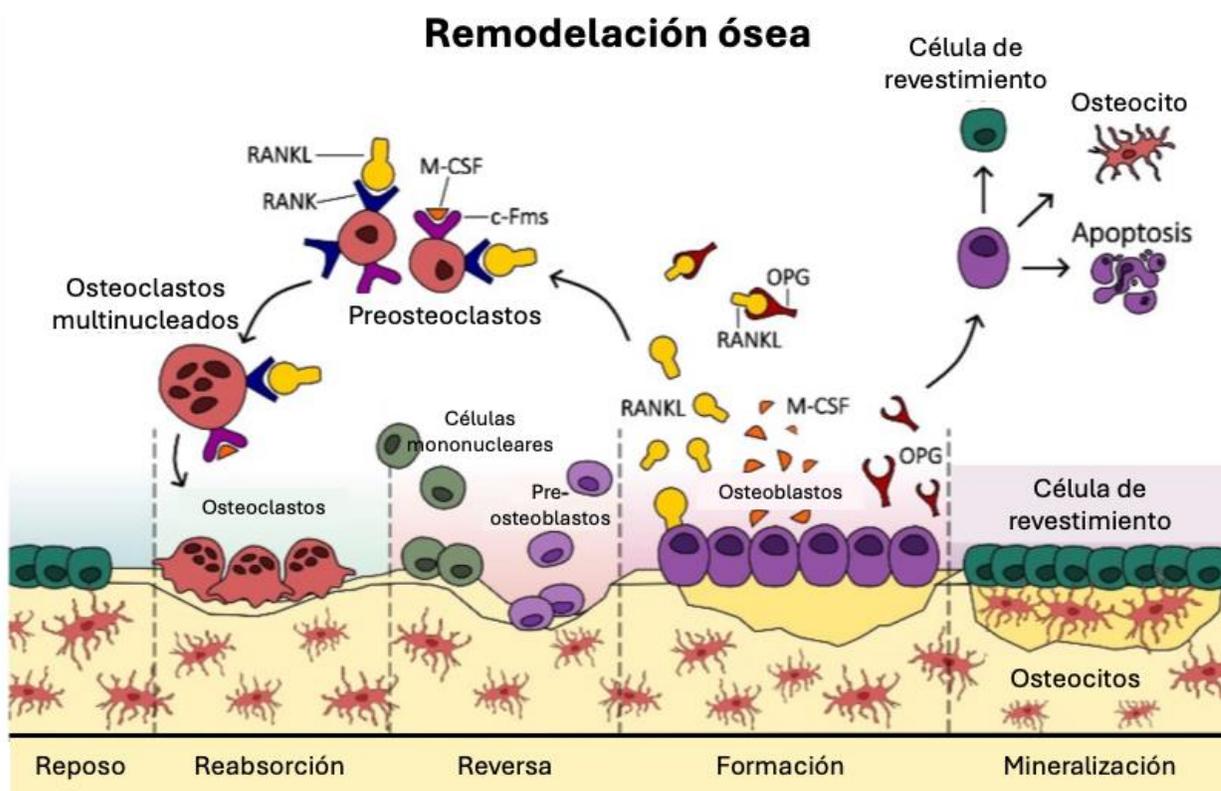
### **1.1.3 Proceso de remodelación ósea**

La remodelación ósea es un proceso dinámico y coordinado que involucra la interacción secuencial de osteoclastos y osteoblastos dentro de unidades anatómicas denominadas unidades multicelulares básicas (BMUs, por sus siglas en inglés) (Figura 2).

Este proceso tiene como objetivo la reabsorción y la formación del hueso (Figura 3). Durante la primera etapa (fase de activación), se inicia el proceso en un sitio específico del hueso. La segunda fase consiste en la reabsorción mediada por osteoclastos, acompañada del reclutamiento de células madre mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés) y osteoprogenitoras. Durante esta etapa, los osteoclastos se adhieren a la superficie ósea a través de integrinas  $\alpha\beta3$  y forman un anillo de actina, secretan ácidos y enzimas como colagenasas y proteasas que desmineralizan la matriz y degradan proteínas estructurales como el colágeno tipo I (Cappariello et al., 2014). En la tercera fase ocurre la diferenciación de los osteoblastos, y, finalmente, se produce la mineralización de la matriz ósea (Crockett et al., 2011).



**Figura 2. Microfotografía de una unidad multicelular básica ósea.** Al comienzo del proceso de remodelación ósea, se forman BMUs que permiten la interacción entre diferentes células óseas. Se observa una BMU de una sección del hueso cortical de una vértebra de ratón. La imagen se tomó con un microscopio electrónico de barrido y posteriormente se coloreó. Obtenido y modificado de Gasser y Kneissel (2017).



**Figura 3. La remodelación ósea es dinámica e involucra diferentes células.** La remodelación ósea es un ciclo complejo dividido en diferentes fases: reposo, reabsorción, reversa, formación y mineralización. Imagen obtenida y modificada de Arakil et al. (2024).

#### 1.1.4 Remodelación ósea en desequilibrio: cuando gana la reabsorción ósea

El proceso de remodelación ósea puede ser alterado por múltiples factores, incluidos los cambios hormonales asociados a la menopausia, el envejecimiento, la inactividad física, el uso de fármacos (como los glucocorticoides o la quimioterapia) y enfermedades secundarias que conducen al desarrollo de diversos trastornos, tanto en hombres como en mujeres (Feng y McDonald, 2011). Estos factores pueden desequilibrar la comunicación entre los osteoblastos y los osteoclastos al generar un estado de mayor reabsorción ósea, lo que conduce a la pérdida de masa ósea.

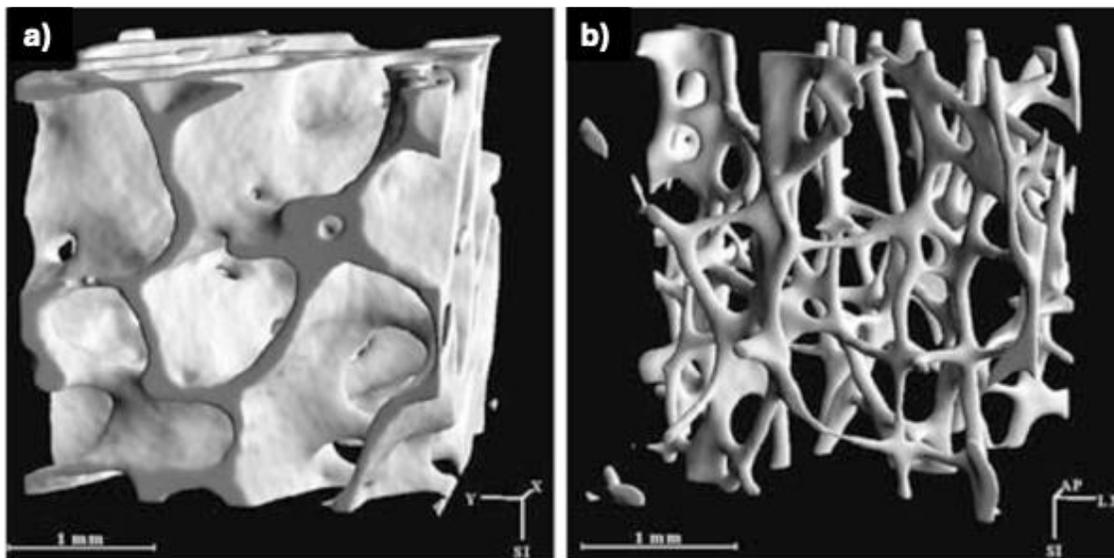
La pérdida ósea representa una manifestación frecuente en diversas enfermedades entre las que destacan la osteoporosis y la metástasis ósea del cáncer de mama. En la osteoporosis, el desequilibrio entre los procesos de formación y reabsorción ósea provoca una disminución progresiva de la masa y la calidad del hueso, lo que incrementa el riesgo de fracturas, en particular en mujeres posmenopáusicas y adultos mayores (Kok-Yong, 2022). En el caso de la metástasis ósea, las células tumorales que colonizan el tejido óseo inducen alteraciones profundas en su microambiente, estimulan la actividad de los osteoclastos mediante la vía *Rank/Rankl* y favorecen una reabsorción ósea acelerada (Lipton et al., 2009). Aunque los mecanismos son diferentes entre la osteoporosis y la metástasis ósea, ambas conducen al mismo desenlace: la pérdida ósea.

#### 1.1.5 Osteoporosis

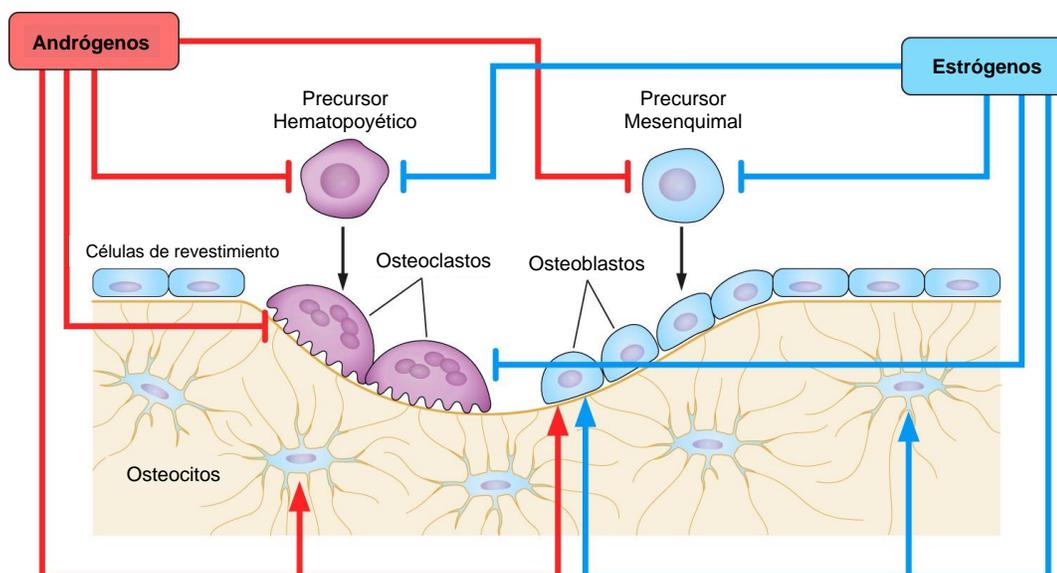
La osteoporosis es un desorden óseo que se caracteriza por una disminución de la resistencia ósea como resultado de la reducción de la densidad mineral ósea (BMD, por sus siglas en inglés) (Figura 4). Se considera que una persona presenta osteoporosis cuando su densidad mineral ósea, medida por absorciometría de rayos X (DXA, por sus siglas en inglés), es inferior a -2.5 desviaciones estándar respecto del promedio de un adulto joven sano (valor  $T \leq -2.5$ ) (Kanis et al., 1994). La pérdida ósea en mujeres posmenopáusicas se relaciona con la disminución en los niveles de estrógenos, cuya función principal es mantener el equilibrio de la remodelación ósea.

En el hueso, los estrógenos tienen tres funciones principales (Figura 5): (1) inhiben la activación de la remodelación ósea y el inicio de nuevas Unidades Multicelulares Básicas (UMB); (2) inhiben la diferenciación y promueven la apoptosis de los osteoclastos (reducción de la reabsorción ósea); y (3)

suprimen la auto regeneración de los precursores mesenquimales y promueven la diferenciación de las células osteoblásticas (inducir la formación ósea) (Khosla et al., 2011).



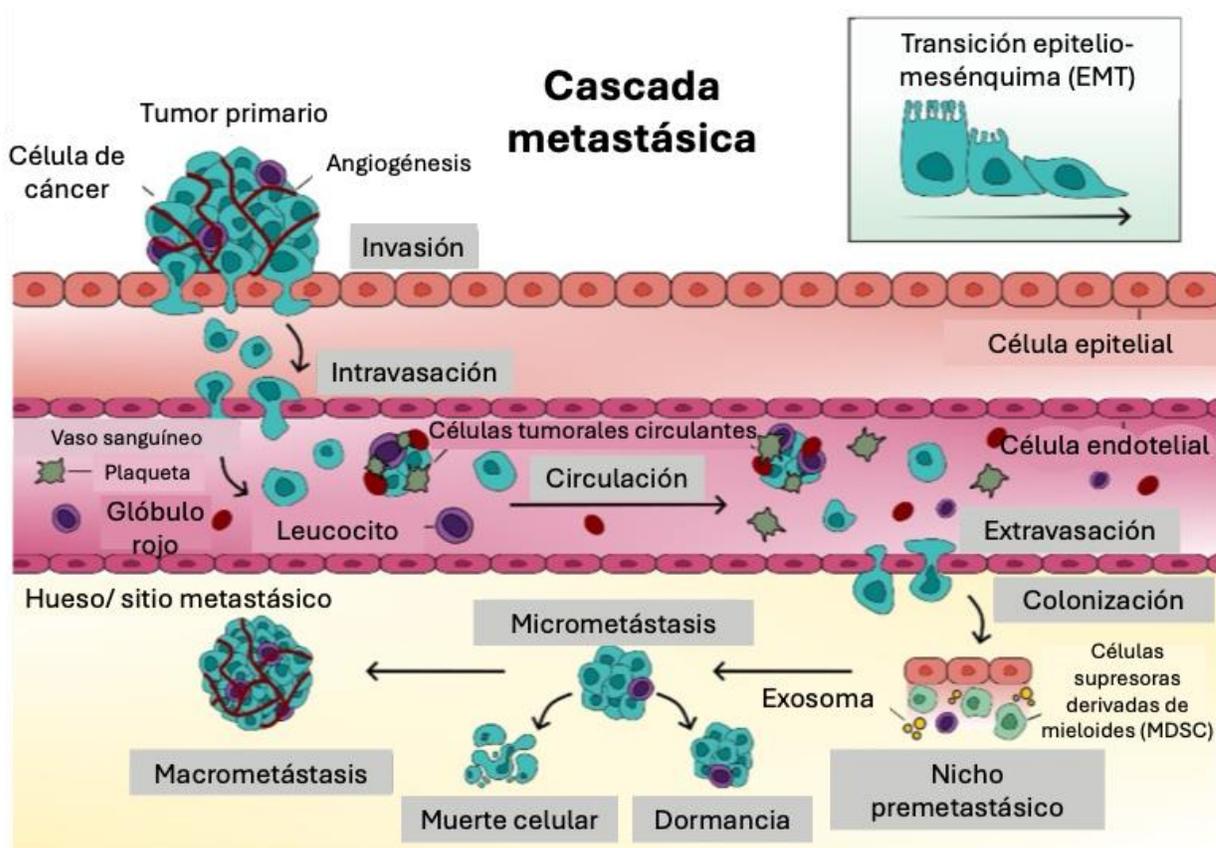
**Figura 4. La microarquitectura ósea se altera con la osteoporosis.** Comparación de la densidad ósea entre un hueso normal *versus* uno con osteoporosis. a) Reconstrucción tridimensional de una vértebra de una paciente sana de 24 años. b) Reconstrucción tridimensional de una vértebra de un paciente de 84 años con osteoporosis. Nótese el deterioro de las trabéculas. Imagen obtenida y modificada de Pavy-Le Traon et al. (2007).



**Figura 5. Efecto de los estrógenos y andrógenos en el cuerpo.** El estrógeno regula el remodelado óseo suprimiendo la formación y activación de los osteoclastos (flechas truncadas azules) mientras estimula la activación y la mineralización de los osteoblastos (flechas azules). Los andrógenos inhiben la diferenciación de los precursores mesenquimales de los osteoblastos (flecha truncada azul), pero promueven la diferenciación de los osteoblastos (flechas rojas). Durante el tratamiento con los inhibidores de la aromatasa se disminuyen los niveles de estrógeno y la reabsorción y formación ósea se desbalancean, lo que da como resultado la pérdida ósea. Las flechas se refieren al rol de promoción, y el símbolo de flechas truncadas “⊥” se refiere al rol de inhibición (Almeida et al., 2017).

### 1.1.6 Metástasis ósea del cáncer de mama

La metástasis es el resultado de una serie de eventos secuenciales y altamente regulados que involucran la diseminación tumoral desde un sitio primario hacia un órgano distante (Figura 6). El proceso inicia con la invasión local del tejido primario, en la que las células tumorales adquieren el fenotipo más migratorio mediante la transición epitelio-mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés), lo que facilita la degradación de la matriz extracelular (Weinberg, 2014). Posteriormente, las células de cáncer adquieren acceso a la circulación sanguínea (intravasación), sobreviven en un entorno hostil gracias a la resistencia a la apoptosis y al “camuflaje” mediante plaquetas y células inmunes, y logran desplazarse hasta los capilares óseos (transporte sistémico). Una vez en la médula ósea, las células metastásicas deben extravasarse a través del endotelio y adaptarse a un nicho rico en factores de crecimiento, citoquinas y células estromales, lo que facilita su supervivencia y establecimiento inicial (colonización) (Arakil et al., 2024).



**Figura 6. Cascada de invasión metastásica.** El paso inicial de la invasión permite que las células del tumor primario rompan la membrana basal. Después estas células pueden intravasarse en los microvasos linfáticos o sanguíneos. Estos últimos pueden transportar a las células cancerosas a través de la circulación general hacia sitios anatómicos distantes donde pueden quedar atrapadas, posteriormente extravasarse y formar micrometástasis dormantes. Algunas de las micrometástasis pueden adquirir la capacidad de colonizar el tejido en el que han aterrizado, lo que les permite formar una metástasis macroscópica. Imagen obtenida y modificada de Arakil et al. (2024).

La metástasis ósea constituye una de las complicaciones más frecuentes del cáncer de mama avanzado. Se ha reportado que hasta el 70% de los pacientes con cáncer de mama avanzado desarrollan metástasis óseas (Pang et al., 2022). Una vez que la metástasis ocurre, la probabilidad de curación disminuye y la supervivencia media se mide en años (Coleman, 2006). El esqueleto ofrece un entorno favorable para la proliferación y el crecimiento tumoral. Una vez en el hueso, las células de cáncer alteran el remodelado óseo al promover la activación de los osteoclastos, principalmente mediante la secreción de la hormona paratiroidea (PTHrP, por sus siglas en inglés), que estimula a los osteoblastos y otras células del microambiente óseo para producir RANKL, lo que promueve la activación de los osteoclastos (Durand et al., 2013). Esta activación genera una reabsorción ósea acelerada en la que se liberan factores de crecimiento almacenados en la matriz como TGF $\beta$  e IGF-I. Este fenómeno da lugar a un círculo vicioso que potencia la destrucción ósea y la progresión tumoral. Las manifestaciones clínicas incluyen fracturas espontáneas, dolor óseo, hipercalcemia y compresión medular (Mesny et al., 2025). Más allá de las complicaciones clínicas, la pérdida ósea secundaria a la metástasis se asocia con la disminución de la calidad de vida, la reducción en la movilidad y una mayor mortalidad, lo que enfatiza la necesidad de desarrollar terapias que interrumpan la interacción entre las células cancerosas y el hueso.

### **1.1.7 Tratamientos contra la pérdida ósea**

El tratamiento de la pérdida ósea proveniente de la osteoporosis o de la metástasis ósea se basa en el uso de fármacos antirresortivos o anabólicos, independientemente de la fuente de la enfermedad, con ajustes en los regímenes de administración. La función de los antirresortivos es inhibir la actividad osteoclástica, lo que reduce la reabsorción ósea y contribuye al mantenimiento o aumento de la densidad mineral ósea. Actualmente, los medicamentos antirresortivos comúnmente utilizados en la clínica incluyen los bisfosfonatos como el alendronato, el risendronato, el ibandronato y el ácido zoledrónico, así como el anticuerpo monoclonal denosumab (Cummings et al., 2009; Qaseem et al., 2023). Su vía de administración puede ser oral o parenteral, con esquemas que van desde dosis diarias, semanales, mensuales, dos veces al año o anuales. Por otro lado, los agentes anabólicos estimulan la formación y mejoran la microarquitectura ósea. Entre los fármacos anabólicos más comunes se encuentran la teriparatida (fragmento activo de la hormona paratiroidea) y romosozumab (anticuerpo monoclonal que inhibe a la esclerostina) (Bandeira y Lewiecki, 2022). Sin embargo, su uso está limitado por criterios clínicos estrictos, duración máxima del tratamiento (entre 12 y 24 meses) y costos elevados.

### **1.1.7.1 Bisfosfonatos**

Los bisfosfonatos son medicamentos análogos sintéticos del pirofosfato presente en el hueso. Este grupo de fármacos presenta alta afinidad por los iones de  $\text{Ca}^{+2}$  en el hueso y permite su unión con la hidroxiapatita mediante quelación (Rudnick-Glick et al., 2015). Al inicio de la reabsorción, los bisfosfonatos son liberados y captados por el osteoclasto y se deteriora su capacidad para formar el borde en cepillo, de adherirse a la superficie del hueso y de producir los protones y enzimas lisosómicas necesarias para continuar con la fase de reabsorción ósea.

Los bifosfonatos, como el ácido zoledrónico, son potentes inhibidores de la reabsorción ósea y han demostrado su eficacia para prevenir la pérdida ósea en mujeres posmenopáusicas con baja densidad mineral ósea (DMO) y en pacientes con cáncer de mama que reciben terapia de privación de estrógenos (Coleman et al., 2013; Gasser et al., 2006). El estudio E-ZOFAST de 2013 demostró que la terapia adyuvante con ácido zoledrónico en combinación con letrozole mejoró la salud esquelética en mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama temprano, en comparación con la terapia con ácido zoledrónico iniciada después del deterioro del hueso (Coleman et al., 2013).

### **1.1.7.2 Anticuerpos monoclonales**

Los anticuerpos monoclonales han revolucionado el tratamiento de diversas enfermedades, incluido el manejo de enfermedades óseas. En el contexto de la pérdida ósea, se ha desarrollado el denosumab, un anticuerpo monoclonal humano que se une a RANKL e impide su interacción con su receptor RANK. Esta acción evita la diferenciación, la activación y la supervivencia de los osteoclastos, lo que reduce la reabsorción ósea (Hildebrand et al., 2024).

Otro anticuerpo monoclonal es el romosozumab que se dirige contra la esclerostina, una proteína que actúa como inhibidor de la formación ósea. Al bloquearla, romosozumab estimula la actividad de los osteoblastos (Kim et al., 2017) y reduce la reabsorción ósea, lo que genera un efecto dual (Castañeda et al., 2022).

### **1.1.8 Efectos secundarios de las terapias contra la pérdida ósea**

A pesar de la eficacia de los bisfosfonatos como terapia para el tratamiento de la pérdida ósea, el tratamiento a corto y a largo plazo provoca efectos secundarios que incluyen dolor musculoesquelético severo, efecto adverso en el tracto gastrointestinal superior, reacción de fase aguda, hipocalcemia, inflamación ocular y cáncer de esófago en el caso de administración. Los efectos secundarios a largo plazo incluyen osteonecrosis de la mandíbula, fracturas femorales subtrocanterias, fibrilación y supresión del recambio óseo (Adler, 2021; Oryan y Sahvieh, 2021).

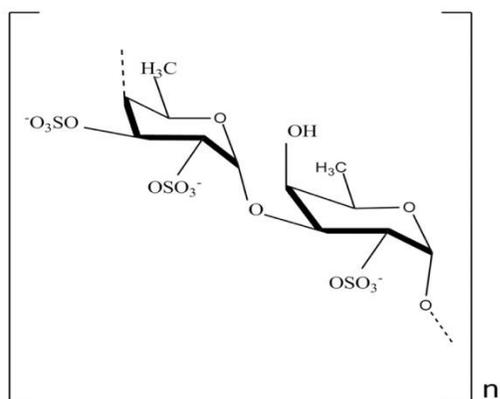
### **1.1.9 Compuestos bioactivos de origen marino**

Los organismos marinos son una reserva muy importante de compuestos bioactivos que podrían ser auxiliares en el tratamiento de diversas enfermedades musculoesqueléticas. Los organismos marinos han desarrollado capacidades metabólicas únicas para asegurar su supervivencia en hábitats diversos y hostiles, lo que resulta en la biosíntesis de una serie de metabolitos secundarios con actividades específicas. Varios de estos metabolitos son productos comerciales de alto valor para las industrias farmacéutica y cosmeceútica (Martins et al., 2014). Estas moléculas se han aprovechado durante mucho tiempo en el campo médico como antioxidantes, agentes antimicrobianos y anticancerígenos, y en aplicaciones biotecnológicas (Giordano, 2020). Un grupo de organismos marinos que contienen compuestos bioactivos con potencial terapéutico en humanos son las algas marinas (Carson y Clarke, 2018).

#### **1.1.10 El fucoïdan y su bioactividad**

El fucoïdan, inicialmente llamado "fucoïdin" cuando Kylin lo aisló por primera vez en 1913, es un polisacárido natural soluble en agua que se encuentra en los tejidos de las algas pardas (Kylin, 1918). La molécula del fucoïdan consiste de una cadena principal formada por fucosa con grupos sulfatos adosados en diferentes carbonos (polisacárido sulfatado) (Figura 7). La molécula también puede contener otros azúcares, iones inorgánicos y componentes proteicos (Li et al., 2008). Algunas propiedades bioactivas de los fucoïdanos son la actividad anticancerígena, antiinflamatoria, antioxidante, anticoagulante y proliferativa de células epiteliales (Bittkau et al., 2019; Huang et al., 2022; Lin et al., 2020; Yu et al., 2021),

y estas bioactividades pueden depender de la especie de alga, del método de extracción y de la temporada de cosecha (Flórez-Fernández et al., 2020).



**Figura 7. Estructura química del fucoidan.** El fucoidan es un polisacárido sulfatado, formado por unidades de fucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) y  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), con grupos sulfato en los carbonos 2 y/o 4. Además esta molécula puede tener pequeñas cantidades de otros azúcares como galactosa, manosa o xilosa, así como ácido urónico y grupos acetilo, lo que le confiere una elevada carga negativa. La estructura del fucoidan varía de acuerdo con la especie del alga y el método de extracción. Imagen obtenida de Kang et al. (2015).

### 1.1.11 Efectos del fucoidan en el hueso

El fucoidan ha despertado interés por sus propiedades moduladoras en el proceso de remodelación ósea. El efecto osteogénico se ha asociado principalmente a su grado de sulfatación y peso molecular. La presencia de los grupos sulfato aumenta la carga negativa de la molécula, lo que facilita la formación de complejos con proteínas cargadas positivamente dentro de la célula (Haroun-Bouhedja et al., 2000; Ramos-de-la-Peña et al., 2022).

Con referencia al hueso, las fracciones altamente sulfatadas han demostrado una mayor estimulación de la actividad de la fosfatasa alcalina, la producción de colágeno y la depositación de calcio, tanto en células humanas como en modelos murinos (Hwang et al., 2016). Además, se ha reportado que el fucoidan aumenta la expresión de *Runx2*, osteocalcina y colágeno tipo I a través de la activación de vías de señalización como las quinasas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés) y las Smads 1/5/8, lo que confirma su capacidad para favorecer su efecto anabólico (Kim et al., 2015).

Además de su efecto osteogénico, los fucoidanos han demostrado la capacidad de inhibir la diferenciación de osteoclastos en su etapa temprana por medio de la inhibición del RANKL (Kim et al., 2014). También, los fucoidanos inhibieron significativamente la activación de proteínas cinasas en la vía de señalización de

MAP cinasas como JNK, ERK y p38, al igual que c-Fos y NFATc1, que son factores de transcripción cruciales para la osteoclastogénesis (Kim et al., 2014). Sin embargo, también se ha observado un efecto resortivo del fucoïdan bajo ciertas condiciones. Fuller et al. (1991) reportaron que 100 µg mL<sup>-1</sup> de heparán sulfato o de fucoïdan aumentaron la reabsorción ósea en un modelo *ex vivo* de láminas de hueso cortical bovino en presencia de suero de ternera fetal. Estos resultados sugieren que el fucoïdan puede potenciar la reabsorción ósea de acuerdo con el contexto molecular, la presencia de factores séricos y las características estructurales de la molécula. De igual manera, el fucoïdan de alto peso molecular tuvo un efecto antiosteogénico en sistemas de co-cultivos de células endoteliales y similares a osteoblastos (Ohmes et al., 2020).

En modelos *in vitro*, el fucoïdan ha mostrado efectos osteogénicos y antirresortivos. Los fucoïdanos aislados de *Macrocystis pyrifera*, *Sargassum muticum* y *Undaria pinnatifida* demostraron un efecto dual dependiente de la concentración en el proceso de remodelación ósea. En los ensayos de mineralización con células MC3T3-E1 o de médula ósea de ratón, los fucoïdanos aumentaron significativamente la mineralización dependiente de la concentración (Landeros-Juárez et al., 2025). Por otro lado, en cultivos de macrófagos estimulados con RANKL, el fucoïdan inhibió de forma significativa la formación de osteoclastos y algunas proteínas relacionadas con la reabsorción, como TRAP, catepsina K y metaloproteïnasa 9 (Kim et al., 2014).

En modelos *in vivo*, se ha demostrado que el fucoïdan puede preservar la arquitectura ósea y mejorar los parámetros de la densidad mineral ósea. En un modelo de ovariectomía en ratas Sprague-Dawley, el fucoïdan de bajo peso molecular previno la pérdida ósea y aumentó la densidad mineral ósea, además de reducir el número de osteoclastos (Jin et al., 2017). Asimismo, la adición del fucoïdan de *Fucus evanescens* en un implante de hidroxihapatita, aumentó la regeneración ósea en un modelo animal grade de ovejas hembras (Nielsen et al., 2022).

En la última década se ha avanzado en el desarrollo de agentes terapéuticos que modulan la actividad de los osteoclastos al prevenir o disminuir las enfermedades óseas. Sin embargo, aún se requieren estudios para ampliar el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que regulan su actividad, así como descubrir nuevas moléculas terapéuticas efectivas con menores efectos secundarios.

## 1.2 Justificación

La pérdida ósea constituye un problema clínico con impacto significativo, tanto en enfermedades metabólicas como la osteoporosis, como en la progresión del cáncer de mama hacia el hueso. En ambas enfermedades, la reabsorción supera la formación del hueso, lo que compromete la integridad y la microarquitectura ósea. Los tratamientos actuales, aunque son efectivos, provocan efectos secundarios importantes. Por tal motivo, se requieren nuevos agentes terapéuticos capaces de modular el remodelado óseo, preservar la función de las células óseas y, en el caso del cáncer, limitar la migración tumoral hacia el hueso.

## 1.3 Hipótesis

Los polisacáridos sulfatados del tipo fucoidan modularán el remodelado óseo e inhibirán la progresión del cáncer de mama metastásico *in vivo*

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de los fucoidanos sobre el remodelado óseo, *in vitro* y en dos modelos de pérdida ósea *in vivo*.

### 1.4.2 Objetivos específicos

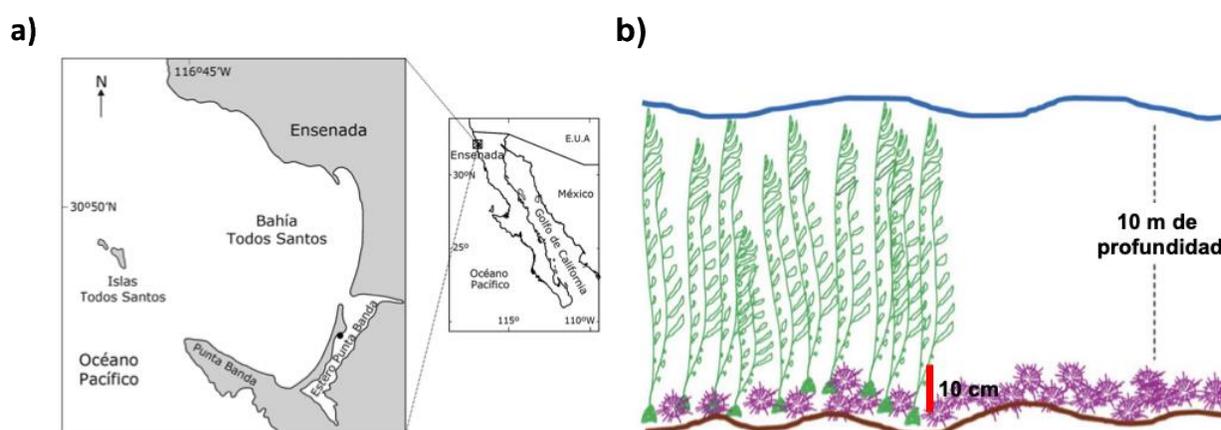
- 1.- Caracterizar químicamente el fucoidan comercial y comparar su actividad en ensayos de remodelación ósea *in vitro* con los extractos de polisacáridos sulfatados del tipo fucoidan extraídos de algas pardas.
- 2.- Determinar el efecto del fucoidan comercial y de los extractos de polisacáridos sulfatados de algas marinas en estudios *in vitro* en células cancerosas y no cancerosas.

3.- Evaluar el efecto del fucoidan comercial y de los extractos de polisacáridos sulfatados de algas pardas en dos modelos de pérdida ósea *in vivo* para determinar su potencial osteogénico y efectos sobre tumores y metástasis al hueso.

## Capítulo 2. Metodología

### 2.1 Colecta de las algas: *M. pyrifera*, *S. muticum* y *U. pinnatifida*

Los ejemplares se colectaron en el submareal por medio de buceo libre en la Isla Todos Santos, Baja California (31.809°N, -116.800°W) en octubre de 2018 (Figura 8a). Las algas se cortaron a partir de 10 cm arriba del disco de fijación del alga, hasta la zona apical (Figura 8b).



**Figura 8.** a) Región de muestreo en el estado de Baja California propuesta por (Rubio-Polania et al., 2016). b) Diagrama ilustrativo de la forma de colecta de los especímenes (Beas-Luna y Ladah, 2014).

### 2.2 Extracción de fucoïdan de las algas *M. pyrifera*, *S. muticum* y *U. pinnatifida*

Previo a la extracción de fucoïdan, las algas colectadas se lavaron con agua dulce. Posteriormente, se secaron al aire libre o en horno de convección a 60 °C por 24 h y se trituraron hasta un tamaño de partícula de ~1 mm. El método de extracción de fucoïdan empleado fue descrito por Larsen (1978). La Figura 9 esquematiza el proceso de extracción del fucoïdan.

Para la extracción del fucoïdan, 1 g de cada alga seca se suspendió en 25 mL de HCL (Sigma) 0.2 N y se calentó en un baño de agua a 70 °C por 1 h. El extracto crudo obtenido se centrifugó a 1917 x g durante 10 min (HN-SII, *International Equipment Company*, Massachusetts, EE. UU.) y se filtró con papel filtro grado 1 de 110 mm (Whatman). Del extracto filtrado se tomó una alícuota de 1 mL para una caracterización química preliminar, y el resto se utilizó para la recuperación de fucoïdan seco. Al extracto crudo restante

se le agregó NaCl sólido (Mallinckrodt) hasta alcanzar una concentración final de 0.1 M. Posteriormente, se agregaron 3 volúmenes de etanol al 96 % (v. v<sup>-1</sup>) y la muestra resultante se sedimentó a 4 °C durante la noche. Después, la muestra se centrifugó a 1917 x g por 10 min. El sobrenadante se descartó y la parte sólida (fucoïdan crudo) se lavó dos veces con 20 mL de etanol al 70 % (v. v<sup>-1</sup>), seguido de una centrifugación a 1917 x g por 10 min después de cada lavado. Para deshidratar el fucoïdan se utilizaron 20 mL de etanol al 96 % (v. v<sup>-1</sup>), y se centrifugó a 1917 x g por 10 min. Finalmente, el líquido se descartó y la pastilla obtenida se secó a 60 °C durante la noche. Al día siguiente se pesó y se almacenó a temperatura ambiente (15-20 °C) hasta su uso en los análisis celulares.

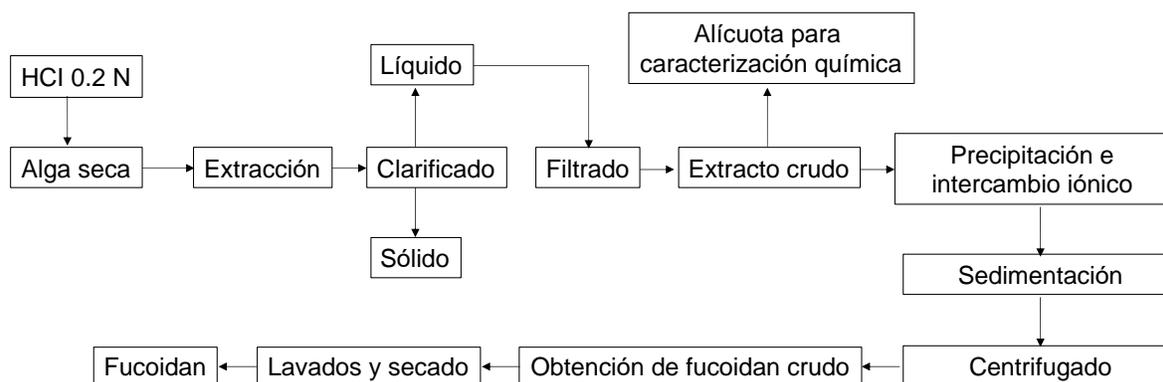


Figura 9. Diagrama de flujo para la obtención de fucoïdan.

### 2.3 Caracterización química del fucoïdan

La caracterización química consistió en evaluar: (1) el contenido de fucosa; (2) de carbohidratos totales; (3) de ácidos urónicos; y (4) de sulfatos. Para cada determinación se realizó una curva de calibración con los diferentes estándares respectivos y puntos de medición a diferentes concentraciones. Para todos los métodos se empleó espectrometría de luz visible (Epoch, *Biotek Instrument Inc.*, Winooski, EE. UU.).

Para la cuantificación de fucosa se empleó el método propuesto por Dische (1955). Para la curva de calibración se preparó un estándar de fucosa (Sigma) a una concentración de 100 µg mL<sup>-1</sup>. Para las muestras a analizar, se tomó 1 mL del extracto crudo del fucoïdan y se diluyó hasta tener una dilución 1:10. Del fucoïdan seco se preparó una solución a una concentración de 0.15 mg mL<sup>-1</sup>. Posteriormente, se agregaron 2.5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Fermont, 37 %, v. v<sup>-1</sup>) 6:1 y se colocó en un baño de agua a 100 °C por 10 min. Después se agregaron 100 µL de la solución de cisteína hidrociorada al 3 % (m. v<sup>-1</sup>) y se procedió a la lectura de las absorbancias a 396 y 427 nm. La segunda lectura corresponde a un factor de corrección y la absorbancia que se consideró para la determinación de la concentración de las muestras consistió en

restar las lecturas de 396 menos las de 427 nm. De acuerdo con Larsen (1978), la concentración de fucoïdan corresponde a la concentración obtenida de fucosa multiplicada por un factor de 2.

La cuantificación de carbohidratos totales se realizó por el método colorimétrico de fenol- ácido sulfúrico propuesto por Dubois et al. (1956). Para la curva de concentración se utilizó un estándar de fucosa a una concentración de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para la cuantificación, se colocó 1 mL de muestra o estándar en tubos de ensayo. Posteriormente, se agregaron 250  $\mu\text{L}$  de fenol al 3 % (m. v<sup>-1</sup>) seguidos de 2.5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 98 % (v. v<sup>-1</sup>) en movimiento rápido. Las muestras se dejaron reposar durante 30 min a temperatura ambiente (15-20 °C), y se midió la absorbancia a 485 nm.

Para evaluar el contenido de sulfatos se empleó el método turbidimétrico de Tabatabai (1974) modificado por Craigie y Wen (1984). Para la curva de calibración se utilizó un estándar de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con una concentración de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  del ion SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>.

Para la cuantificación de sulfatos de las muestras se hidrolizaron de 10 a 20 mg de cada muestra de fucoïdan con 0.5 mL de HCL 2 N a 100 °C por 2 h. Las muestras hidrolizadas se filtraron y se aforaron a 5 mL con agua destilada. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  en tubos de ensayo (10 x 110 mm) y se adicionaron 5 mL de HCL 0.05 N. Después, se agregaron 250  $\mu\text{L}$  de una solución de cloruro de bario-bactogelatina a cada tubo. Estos se agitaron y se dejaron reposar durante 30 min a temperatura ambiente (15-20 °C). Finalmente, se midió la absorbancia a 560 nm.

La cuantificación de ácidos urónicos se llevó a cabo con el método modificado de Carbazol de Bitter y Muir (1962). Se utilizó un estándar de ácido glucurónico (Sigma) a una concentración de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para la cuantificación de ácidos urónicos, en tubos de ensayo colocados en un baño de hieslo, se colocaron alícuotas de 1 mL de cada muestra o estándar. A cada tubo se le agregaron 2.5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 98 % (v. v<sup>-1</sup>), 100  $\mu\text{L}$  de una solución de borato de sodio (J. T. Baker) 0.025 M y 100  $\mu\text{L}$  de una solución de carbazole (Sigma) al 0.125 % (m. v<sup>-1</sup>). Posteriormente, las muestras se calentaron en baño María a 100 °C por 10 min. Al finalizar el tiempo de reacción, los tubos se enfriaron en un baño de hielo durante 1.5 min y se procedió con la lectura de las absorbancias a 530 nm.

### 2.3.1 Cálculo de las concentraciones, los rendimientos y las razones molares

Una vez obtenidos los valores de las absorbancias correspondientes a las curvas estándar de cuantificación de fucosa, carbohidratos totales, cuantificación de ácidos urónicos y de sulfatos, se procedió a analizarlas en una hoja de cálculo de Excel. El análisis consistió en trazar una línea de tendencia lineal para cada curva y, con base en los puntos graficados, se obtuvo la ecuación de la recta en el gráfico. Para el cálculo de las concentraciones se tomó el valor de las absorbancias obtenidas y se dividió entre el coeficiente de extinción respectivo.

El cálculo de los rendimiento en miligramos de cada componente de fucosa, ácidos urónicos o sulfatos (M) se obtuvo mediante la ecuación 1:

$$mg M = \left( \frac{xyz}{1000} \right)$$

(1)

Donde:

M= fucosa, ácidos urónicos o sulfatos,

x = concentración de la muestra,

y = dilución utilizada, y

z = volumen del extracto de fucoïdan filtrado

Para el cálculo de los porcentajes, el valor de los miligramos obtenidos se multiplicó por 100 y se dividió entre la masa (m) de las algas molidas que se usaron para la extracción ácida de fucoïdan. La ecuación 2 ejemplifica lo anterior:

$$\% M = \left( \frac{mg \text{ fucosa}}{m} \right) 100$$

(2)

Donde:

M= masa en mg de alga usada

Con base en los rendimientos obtenidos se calcularon los moles de cada componente. Para ello se emplearon los pesos moleculares correspondientes: fucosa  $C_6H_{12}O_5$  (PM=146 g mol<sup>-1</sup>), ácidos urónicos

$C_6H_{12}O_7$  (PM=176 g mol<sup>-1</sup>) y grupos sulfato  $SO_3Na$  (PM=103 g mol<sup>-1</sup>). Posteriormente, se determinó la razón molar de cada componente en relación con la molécula de fucosa (fucosa: sulfatos: ácidos urónicos).

## **2.4 Caracterización de los fucoidanos por espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier**

Para comprobar la presencia de los grupos funcionales característicos de los fucoidanos, se realizó la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés). Para la medición, se mezclaron alrededor de 3 mg de cada fucoidan con bromuro de potasio (KBr; Sigma) en una relación de 1:100. La mezcla se maceró en un mortero de ágata y se depositó en una cámara pelletizadora de 13 mm de diámetro. Posteriormente, la cámara se prensó con 7 ton de peso durante 3 min en una prensa hidráulica (GS15011, Specac Ltd, Orpington, Reino Unido) para obtener una pastilla cristalina. Después, la pastilla se colocó en el espectrómetro de infrarrojo (Tensor 27 FT-IR *Spectrometer*, Bruker *Optics*, Ettlingen, Alemania) para la medición de las lecturas. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron a partir del modo de transmisión en un rango de 4000- 400 cm<sup>-1</sup> con una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>. Se analizaron los espectros después de 100 escaneos mediante la transformada de Fourier. Finalmente, todos los resultados se normalizaron, se graficaron y se analizaron con el software GraphPad Prisma versión 9.4.1.

## **2.5 Efecto del fucoidan en la viabilidad celular de células cancerosas y no cancerosas**

### **2.5.1 Cultivo celular**

Las células MC3T3-E1 (ATCC) (Figura 10a) son células no cancerosas que provienen de la calvaria de ratón y tienen la capacidad de diferenciarse en osteoblastos y osteocitos. Estas células se eligieron para conocer el efecto de los fucoidanos en la viabilidad de células precursoras de osteoblastos.

Las células epiteliales 293 T (ATCC) (Figura 10b) corresponden a células de riñón embrionario humano y se utilizaron para evaluar los efectos de los fucoidanos en un modelo de células sanas.

Las células 4T1 (ATCC) (Figura 10c) son células de carcinoma mamario murino triple negativo. Esta línea celular es un modelo para cáncer de mama humano en estadio IV. Se seleccionó esta línea celular para evaluar los efectos del fucoídano y el ácido zoledrónico en el cáncer de mama avanzado y para inducir la metástasis ósea en un modelo *in vivo* de cáncer de mama.

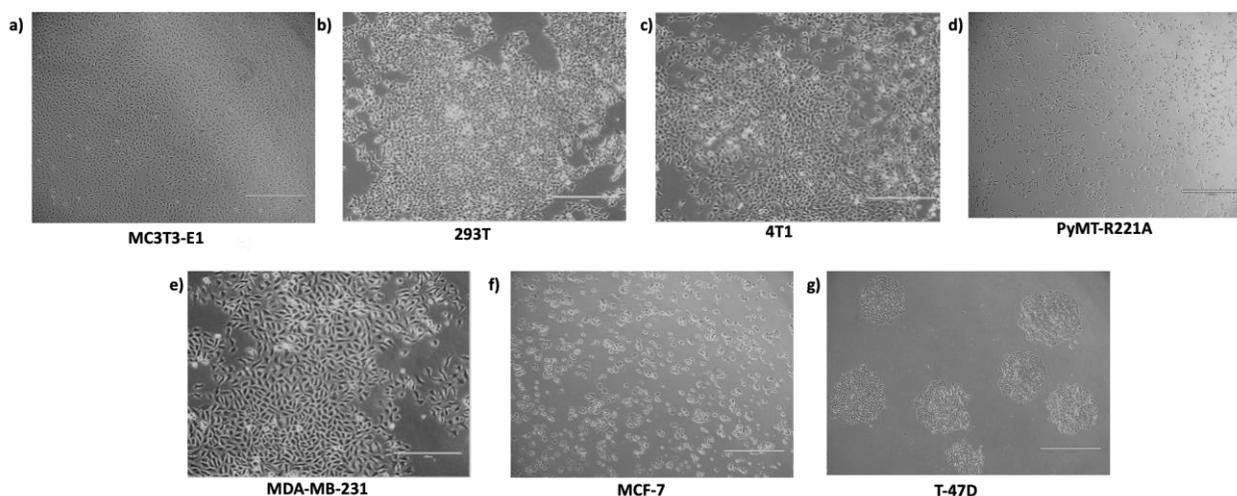
La línea celular PyMT-R221A (Figura 10d) fue cortesía del Dr. Connor Lynch del Moffitt *Cancer Center* (EE. UU.). Estas células se derivan de ratones transgénicos del modelo MMTV-PyMT, en el cual se introdujo el oncogén *Polyoma middle T antigen* (PyMT, por sus siglas en inglés) bajo el control del promotor del virus mamario murino (MMTV), que dirige su expresión hacia la glándula mamaria, lo que provoca que los animales desarrollen espontáneamente tumores en la mama. Esta línea celular corresponde al subtipo luminal B del cáncer de mama, caracterizado por ser positivo a receptores hormonales, pero con una tasa proliferativa más alta que los tumores luminal A.

Las células MDA-MB-231 (ATCC) (Figura 10e) corresponden a células de tejido mamario humano con adenocarcinoma. Esta línea celular de cáncer de mama triple negativo se seleccionó con el fin de examinar los efectos específicos de los fucoídanos en el cáncer de mama en ausencia de los efectos en la señalización del receptor de estrógeno.

Por su parte, la línea celular MCF-7 (ATCC) (Figura 10f) corresponde a células de cáncer ductal mamario humano que expresan los receptores de estrógenos y que proliferan en presencia de estos. Se escogió esta línea celular para estudiar el efecto de los fucoídanos en el cáncer de mama humano.

Finalmente, las células T47-D (ATCC) (Figura 10g) corresponden a un carcinoma ductal de la mama de células de cáncer de mama. Estas células expresan los receptores de estrógenos, de andrógenos y de progesterona. Se seleccionó esta línea celular para conocer los efectos de los fucoídanos en la viabilidad celular del cáncer de mama que expresa los receptores de estrógeno.

Cada vial celular se activó de criopreservación en una caja de cultivo de 100 mm con cambio de medio al día siguiente y cada 48 h hasta alcanzar una confluencia del 80 %. Posteriormente, las células se lavaron con PBS 1X estéril y se desprendieron del fondo de la caja de cultivo con una solución de tripsina (0.05 % tripsina, 0.53 mM EDTA, Corning).



**Figura 10. Líneas celulares empleadas en los ensayos de viabilidad celular.** (a y b): Líneas celulares no cancerosas (MC3T3-E1 y 293T). (c y d): Líneas celulares de cáncer de mama de ratón (4T1 y PyMT-R221A). (e-g): Líneas celulares de cáncer de mama de humano (MDA-MB-231, MCF-7 y T47-D). Barra 400  $\mu$ M.

Las células MC3T3-E1 se cultivaron en *Minimum Essential Medium alpha* ( $\alpha$ -MEM, por sus siglas en inglés, Corning). Las células 293T, MDA-MB-231, MCF-7 y PyMT-R221A se cultivaron en medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, por sus siglas en inglés, Corning), mientras que las células T47-D y 4T1 se cultivaron en medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI, por sus siglas en inglés, Corning). Todos los medios se suplementaron con 10 % de suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés) y 1 % de antibiótico/antimicótico (1 x 10<sup>5</sup> unidades de penicilina, 1 x 10<sup>5</sup>  $\mu$ g de estreptomicina y 25  $\mu$ g de anfotericina B por mililitro; Caisson). Para los ensayos de viabilidad celular, se consideraron como mínimo dos pases antes de realizar los experimentos para estabilizar metabólicamente a las células.

### 2.5.2 Ensayo de viabilidad celular MTT

Los ensayos de viabilidad celular se realizaron con dos objetivos: (1) conocer el efecto de los fucoidanos en la viabilidad de las células cancerosas y no cancerosas en tratamientos de 24 y 48 h de exposición; y (2) evaluar el efecto del fucoidan comercial de *Macrocystis pyrifera* (Sigma) y el ácido zoledrónico (Sigma) solos y en combinación en la viabilidad celular de 4T1 posterior a 24 y 48 h de exposición a los tratamientos. Previamente a los ensayos de viabilidad celular se realizaron curvas de crecimiento desde las 24 hasta las 72 h, para conocer el número de células a sembrar en cada pozo.

El efecto de los tratamientos en la viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo colorimétrico de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Para los ensayos, se sembraron en placas

de 96 pozos: 5 x 10<sup>3</sup> células MC3T3-E1, PyMT-R221A y MCF-7 por pozo; 1 x 10<sup>3</sup> células 293T y 4T1 por pozo; 4.5 x 10<sup>3</sup> células MDA-MB-231 por pozo; y 7.5 x 10<sup>3</sup> células T-47D por pozo. Las células se cultivaron durante 24 h a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, el medio de cultivo se reemplazó con los diferentes tratamientos de los fucoidanos (5 µg mL<sup>-1</sup> hasta 160 µg mL<sup>-1</sup>) y el ácido zoledrónico (5 hasta 100 µM). Después de la incubación por 24, 48 o 72 h, se añadieron 20 µL de la solución MTT (5 mg mL<sup>-1</sup>) y se incubó por 5 h. Para detener la reacción y disolver los cristales de formazán formados, se agregaron 100 µL de la solución de lisis (HCL 0.01 M, SDS 10 % m v<sup>-1</sup>) y se incubó por 20 h. Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro lector de placas (Epoch, *Biotek Instrument Inc.*, Winooski, Vermont, EE. UU.). Para los tratamientos que inhibieron más del 50 % de viabilidad celular, se calculó la viabilidad celular con la ecuación 3:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \left( \frac{\text{promedio de la absorbancia del grupo tratado}}{\text{media de la absorbancia del grupo control}} \right) \times 100 \quad (3)$$

La concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) se determinó con el modelo de inhibidor vs respuesta-pendiente variable (cuatro parámetros) en el software GraphPad Prisma 9.4.1.

Para evaluar el efecto del fucoidan y el ácido zoledrónico en combinación, se evaluaron las concentraciones en las que el fucoidan tuvo mayor efecto inhibitorio a través del tiempo y, en el caso del ácido zoledrónico, se evaluaron las concentraciones de la IC<sub>50</sub> absoluta.

## 2.6 Efecto de los fucoidanos en la remodelación ósea

### 2.6.1 Ensayo de osteoblastogénesis en células de médula ósea y MC3T3-E1

El ensayo de osteoblastogénesis consistió en la diferenciación de células de médula ósea (BMCs, por sus siglas en inglés) o de preosteoblastos de ratón correspondientes a la línea celular MC3T3-E1 a osteoblastos, los cuales, al término de 21 días de exposición a los tratamientos o medio de diferenciación, se tiñeron con rojo de alizarina S (Sigma) para observar los depósitos de calcio.

Para el ensayo de osteoblastogénesis con células de médula ósea se utilizaron ratones Balb/c de 8 semanas de edad que fueron obtenidos a partir de cruces realizadas en el laboratorio del Departamento de

Innovación Biomédica del CICESE. El manejo y cuidado de los ratones se realizó atendiendo lo descrito en la NOM-062-Z00-1999: “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”. Los ratones se mantuvieron en cajas cerradas de policarbonato (34.3 cm largo x 29.2 cm de ancho x 15.5 cm de alto) en un estante Optimice® (Serial 2013-10918, *Animal care system*, Centennial, EE. UU.) con filtros y flujo de aire constante. Las cajas contenían 80 g de aserrín, el cual se renovó cada 15 días en el cambio de caja. Cada 7 días se administró agua y alimento con 18 % de proteínas (LabDiet) *ad libitum*.

Los ratones se sacrificaron por dos métodos de eutanasia: por inhalación de CO<sub>2</sub> seguido de una dislocación cervical. Posteriormente, se colocaron en etanol al 70 % y se procedió con la disección del fémur y tibia en una campana de flujo laminar. Ambos huesos se colocaron en una caja de cultivo de 10 mm con 12 mL de 1X o medio RPMI basal para mantenerlos hidratados.

Para la extracción de las células de médula ósea, se perforaron ambos extremos de los huesos con la aguja de una jeringa de insulina. Se realizó el *flush* de la médula ósea del fémur con 2 mL de medio RPMI (1 mL por lado) seguido del *flush* de la tibia con 1 mL de medio RPMI (solo un lado). Las células se colectaron en hielo y se centrifugaron a 500 x *g* durante 5 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 1 mL de la solución de lisis para glóbulos rojos (NH<sub>4</sub>Cl 155 mM; NaHCO<sub>3</sub> 10 mM; EDTA 0.5 M, pH 7.6 y dH<sub>2</sub>O hasta 100 mL) que se incubó durante 2 min a temperatura ambiente (15-20 °C). La reacción se detuvo con la adición de 5 mL de PBS 1X seguida de centrifugación a 500 x *g* por 5 min a 4 °C. Después se descartó el sobrenadante y el pellet se homogeneizó con 1 mL de medio  $\alpha$ -MEM (+) con L-Glutamina y nucleósidos, pero sin ácido ascórbico, suplementado con 10 % de suero fetal bovino y 1 % de solución antibiótico/antimicótico.

Para determinar los controles a utilizar en los ensayos de osteoblastogénesis, se evaluaron los siguientes grupos: (1) dexametasona 10 nM (Sigma); (2)  $\beta$ -glicerofosfato 5 mM (Sigma); (3) ácido ascórbico 25  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> (Sigma); (4) la combinación de dexametasona 10 nM,  $\beta$ -glicerofosfato 5 mM y ácido ascórbico 25  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>; y (5) control positivo (medio de diferenciación: ácido ascórbico 25  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> y  $\beta$ -glicerofosfato 5 mM). Los controles se evaluaron en células de médula ósea y en células MC3T3-E1. Se sembraron 8 x 10<sup>5</sup> células de médula ósea y 5 x 10<sup>3</sup> células MC3T3-E1 en una placa de 96 pozos. Los medios se renovaron cada 3 días durante 21 días de cultivo y, al finalizar este periodo, se realizó las células se fijaron y se tiñeron con la tinción con rojo de alizarina S (ARS, por sus siglas en inglés; 40 mM pH 4.2).

Para evaluar el efecto de los fucooidanos en la osteoblastogénesis, se sembraron 8 x 10<sup>5</sup> células de médula ósea en una placa de 96 pozos. Se evaluaron los siguientes grupos: (1) control positivo (medio de

diferenciación); (2) control negativo (medio  $\alpha$ -MEM suplementado); y (3) tratamientos con los fucoidanos a 5, 50, 100, 200 y 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Cada condición se realizó por cuadruplicado. El medio de diferenciación consistió en ácido ascórbico 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y  $\beta$ -glicerofosfato 5 mM en medio  $\alpha$ -MEM (+) suplementado con 10 % de suero fetal bovino y 1 % de antibiótico/antimicótico. Cada 72 h se renovaron los tratamientos hasta el día 21. Al concluir este periodo, se realizó la tinción con rojo de alizarina S.

La tinción con rojo de alizarina S consistió en fijar las células con formalina tamponada neutra al 10 % durante 1 h a temperatura ambiente (15-20 °C). Después se realizaron dos lavados con agua destilada, la cual se retiró para agregar 150  $\mu\text{L}$  de rojo de alizarina S. La solución se incubó durante 30 min protegida de la luz solar. Finalmente, se realizaron dos lavados con agua destilada. La placa se dejó secar durante 8 h en la oscuridad, y se tomaron fotografías en el microscopio óptico de campo claro (Axio Scope 1, Zeiss, Oberkochen, Alemania) con los objetivos de 10 y 20X. La cuantificación de la mineralización se realizó mediante el análisis digital de las imágenes teñidas con ARS ( $n = 4$ ). Se utilizó el programa Image J para extraer el canal rojo de las imágenes RGB y medir el área positiva ( $\text{mm}^2$ ), la intensidad media del rojo (0-255) y la densidad integrada (área x intensidad del rojo). De estos parámetros, solo la densidad integrada se reportó como medida representativa de la deposición mineral.

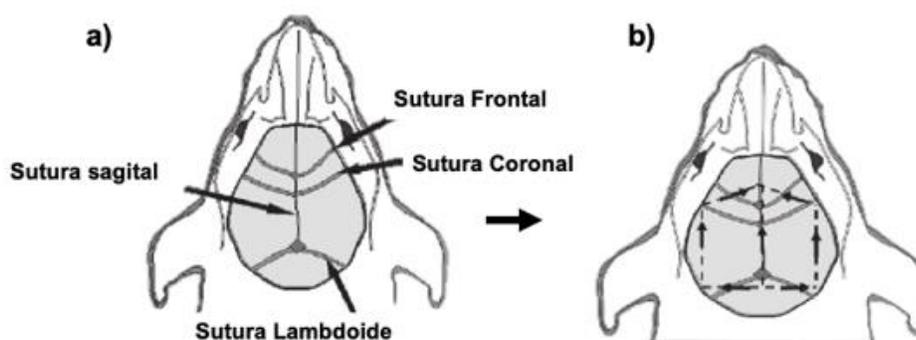
Para el ensayo de osteoblastogénesis con células de preosteoblastos de ratón de la línea celular MC3T3-E1, se sembraron  $5 \times 10^3$  células por pozo en 100  $\mu\text{L}$  de medio  $\alpha$ -MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino y 1 % de antibiótico/antimicótico. Posterior a 24 h de cultivo, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de medio de diferenciación o tratamientos de los fucoidanos (anteriormente descritos). Los grupos que se evaluaron por cuadruplicado fueron: (1) control positivo (medio de diferenciación) y (2) tratamientos de los fucoidanos a 5, 50, 100, 200 y 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  preparados en medio de diferenciación. Las células se incubaron durante 21 días con cambio de medio y tratamientos cada 72 h. Al finalizar el tiempo de incubación, se realizó la tinción con rojo de alizarina S y se cuantificó la densidad integrada. La cuantificación de la mineralización se realizó mediante el análisis de imágenes teñidas con el rojo de alizarina S ( $n=4$ ). Se utilizó Image J (versión IJ 1.46r) para extraer el canal rojo de las imágenes rojo, verde y azul (RBG, por sus siglas en inglés). Se cuantificó el área teñida con rojo de alizarina, la intensidad media del color rojo (umbral de 0-255) y la densidad integrada (área x intensidad del color rojo). De estos parámetros, solo la densidad integrada se reportó como una medida representativa de la mineralización.

## 2.7 Efecto de los fucoidanos en la formación ósea mediante un modelo *ex vivo* de calvaria

Para evaluar el efecto de los fucoidanos en el tejido óseo, se utilizó un modelo *ex vivo* de calvaria (hueso frontal en el cráneo de los ratones) para investigar las respuestas anabólicas o catabólicas en el tejido después de una semana de tratamiento, y puede ser analizado mediante histomorfometría cuantitativa (Mohammad et al., 2008).

### 2.7.1 Extracción de las calvarias de ratones neonatos

Los ratones utilizados en este modelo fueron de la cepa Balb/c con una edad de 4 a 6 días. Para la obtención de las calvarias, los ratones neonatos se limpiaron con etanol al 96 % con papel de seda. Posteriormente, se decapitaron con tijeras estériles. En la cabeza se realizaron diferentes cortes para obtener una forma pentagonal del tejido: primero se realizó un corte en el pliegue del cuero cabelludo; después, un corte sobre la sutura lambdoide seguido de dos cortes perpendiculares a la misma hasta llegar a la sutura coronal. Finalmente, se realizaron cortes diagonales a partir de la sutura coronal hasta la intersección con la sutura sagital (Figura 11). El tejido se dividió en dos partes a partir de la sutura sagital (hemicalvaria) y se depositó en una caja de cultivo de 100 mm previamente preparada con 12 mL de PBS 1X para mantenerlo hidratado.



**Figura 11. Anatomía de la calvaria murina.** Ubicación de las suturas óseas en la calvaria murina. a) Distribución de los cortes realizados sobre la calvaria. b) Modificado de Mohammad et al., (2008).

Para evaluar el efecto de los fucoidanos en el tejido óseo, las hemicalvarias se transfirieron a pozos individuales de una placa de 24 pozos y se adicionó 1 mL de medio DMEM con alta glucosa suplementado con albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) al 10 % y antibiótico/antimicótico al 1 %. Las

calvarias se preincubaron durante 24 horas a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, el medio se retiró de cada pozo y se agregó 1 mL de cada tratamiento a evaluar. Los tratamientos evaluados fueron: (1) insulina 50 µg mL<sup>-1</sup> (control positivo); (2) medio DMEM suplementado con 10 % de albúmina de suero bovino y 1 % antibiótico/antimicótico (control negativo); y (3) tratamientos de los fucoidanos en concentraciones de 25 y 200 µg mL<sup>-1</sup>. Los fucoidanos se prepararon en medio DMEM suplementado con 10 % de BSA y 1 % antibiótico/antimicótico. Los tratamientos se evaluaron por triplicado.

Las hemicalvarias se incubaron a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 7 días con cambios de medio y tratamientos cada 48 horas. Después, se envolvieron en gasas o en toallas de papel y se depositaron en *cassettes* histológicos. Posteriormente, se fijaron en formalina tamponada neutra al 10 % a 4 °C durante 24 h, se lavaron 1 h con agua destilada y se descalcificaron en una solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, por sus siglas en inglés; 0.34 M, pH 8) durante 48 h. Finalmente, los *cassettes* histológicos se almacenaron en etanol al 70 % en envases herméticos hasta su procesamiento.

### 2.7.2 Histología de las calvarias

Los *cassettes* histológicos se depositaron en un procesador automatizado de tejidos (STP120-2, *Thermo scientific*, Walldorf, Alemania) para embeberlos en parafina. Los *cassettes* pasaron por ciclos de etanol al 70, 95 y 100 %, seguidos de 3 ciclos de xileno al 100 % y 2 ciclos de parafina. Al finalizar el procesamiento de las muestras, las hemicalvarias se embebieron en parafina para formar bloques. El proceso consistió en colocar paralelamente una hemicalvaria al lado de la otra con la sutura sagital como base. Los bloques con las hemicalvarias se solidificaron a 4 °C para realizar los cortes histológicos. Los bloques se colocaron en un microtomo (HM355S, *Thermo Scientific*, Walldorf, Alemania) con un ángulo de inclinación de 6°. Se realizaron cortes trimming a 20 µm para eliminar la parafina excedente de las muestras y a 7 µm en el tejido. Los cortes se colocaron en un baño de agua (MH8517X1, *Electrothermal*, Stone, Reino Unido) con agar a 60 °C y se montaron en portaobjetos. Posteriormente, el tejido se dejó secar a temperatura ambiente (15-20 °C). Transcurrido el tiempo de secado, el portaobjetos se colocó en una estufa a 60 °C para derretir la parafina remanente.

Se realizó la tinción hematoxilina y eosina que consistió en dos series inmersión del tejido en limoneno durante 5 min, seguidas de dos inmersiones en etanol al 100 % por 2 min, al 70 % durante 1 min y al 50 % por 1 min. Posteriormente, los tejidos se enjuagaron con agua potable durante 5 min con cambio del agua cada minuto. Se tiñeron con hematoxilina durante 40 s y se lavaron con agua potable hasta asegurar un

cambio en la coloración del agua. Las muestras se sumergieron 10 veces en etanol al 70 % acidificado con HCL al 0.15 % y se lavaron con agua potable 6 veces. Posteriormente, las muestras se introdujeron en una solución saturada de cloruro de litio por 2 min seguido de un lavado con agua potable durante 3 min. Se depositaron en etanol al 96 % durante 1 min y se tiñeron con eosina, floxina y anaranjado G durante 40 s. Finalmente, se incluyeron dos veces en etanol al 96 % durante 1 min, dos veces en etanol al 100 % por 1 min y dos veces en limoneno durante 5 min. Al finalizar el proceso de tinción, las laminillas se secaron a temperatura ambiente (15-20 °C), se agregaron 3 gotas de medio de montaje cyto seal 60 (*Thermo Scientific*) y se cubrieron con cubreobjetos. Las muestras se visualizaron en un microscopio de campo claro (Axio Scope 1, Zeiss, Oberkochen, Alemania) con diferentes aumentos: 50X, 100X y 400X.

El análisis histomorfométrico consistió en la cuantificación del área de formación ósea. Se analizaron un total de 27 fotografías por grupo, divididas por hemicalvaria, número de campo y repeticiones. Finalmente, se realizó el análisis estadístico de ANOVA de una vía con el post-test de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el software GraphPad Prisma 9.4.1.

### **2.7.3 Extracción de ARN de las calvarias**

La extracción del ARN total de las calvarias se realizó con el kit GeneJET RNA (*Thermo Scientific*) y se utilizó el protocolo adaptado para el tejido óseo. Las calvarias se resuspendieron en 600 µL de buffer de lisis suplementado con β-mercaptoetanol y se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento. La disrupción mecánica del tejido óseo se llevó a cabo en un homogeneizador Fast Prep (MP Biomedicals, Fast Prep-24 5G, Montreal, Canadá) con perlas de zirconia. Se realizaron seis ciclos de 30 s a 6 m s<sup>-1</sup>. El ARN obtenido se cuantificó por medio de espectrofotometría (NanoDrop Lite, *Thermo Scientific*, Delaware, EE. UU.) a una longitud de onda de 260 nm y se consideró una pureza entre 1.8 y 2.1.

### **2.7.4 Retrotranscripción del ARN de las calvarias**

A partir del ARN obtenido se realizó la síntesis del ADN complementario. Primeramente, se prepararon dos mezclas: la mezcla 1 consistió en 250 ng del ARN total, 0.5 µL de dNTPs (10 mM) (Promega), 0.5 µL de Oligo dT (500 µg mL<sup>-1</sup>) (*Thermo Scientific*) y agua libre de nucleasas (*Thermo Scientific*) hasta 5.94 µL para obtener un volumen final de 10 µL por reacción. La mezcla 2 consistió en 2 µL de *First- Strand Buffer* (Invitrogen), 1 µL de DTT 0.1 M (Invitrogen) y 0.063 µL de la enzima SuperScript™ II (*Thermo Scientific*).

Los tubos individuales se colocaron en el termociclador a 65 °C durante 5 min con el objetivo de desnaturalizar estructuras secundarias. Terminado el tiempo, los tubos se transfirieron a hielo y se les agregó la mezcla 2. Las muestras se colocaron nuevamente en el termociclador y se realizó la reacción de transcripción reversa a 42 °C por 75 min seguida de la desnaturalización de la enzima a 70 °C por 15 min.

### 2.7.5 Medición de la expresión de los genes óseos mediante RT-qPCR

El ADN complementario se utilizó para medir la expresión de los genes óseos mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Esta técnica se realizó con un sistema de PCR en tiempo real (7500 *Real-Time PCR System*, Applied Biosystems, California, EE. UU.).

Los genes evaluados y sus secuencias se encuentran listados en la Tabla 1. El protocolo de amplificación consistió en 40 ciclos continuos a 95 °C por 15 min, 95 °C por 15 min (desnaturalización), 58 °C por 30 s (alineamiento), 72 °C por 30 s (elongación y etapa de medición de la fluorescencia del SYBR *green*), 95 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 80 ciclos de 55 + 0.5 °C por 10 s y 12 °C por 2 h (*melt curve*).

El programa utilizado para visualizar los resultados fue el 7500 v2.0.6 (*Applied Biosystems*). El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía con post-test de Dunnett en el programa estadístico GraphPad Prisma 9.4.1. Se consideró un valor de  $p < 0.05$  como una diferencia estadísticamente significativa. Los genes se normalizaron con el gen constitutivo *Rpl32* correspondiente a la proteína ribosomal 32 presente en los mamíferos.

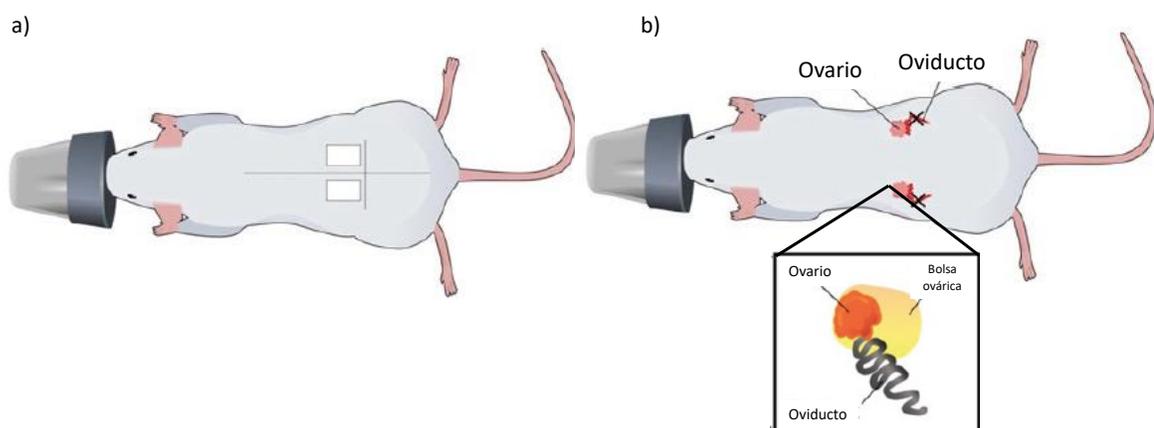
**Tabla 1. Lista de genes y primers utilizados para medir los genes de remodelación ósea.**

Gen	Orientación	Secuencia 5' a 3'
<i>Runx2</i>	Forward	GGCACAGACAGAAGCTTGATGA
	Reverse	GAATGCGCCCTAAATCACTGA
<i>Sost</i>	Forward	AGCCTTCAGGAATGATGCCAC
	Reverse	CTTGCGTCATAGGGATGGT
<i>Ctsk</i>	Forward	GAGGGCCAACTCAAGAAGAA
	Reverse	GCCGTGGCGTTATACATACA
<i>Rankl</i>	Forward	CCAGATCTTAACATGACG
	Reverse	CACCATCAGCTGAAGATAGT
<i>Opg</i>	Forward	AGAGCAAACCTTCCAGCTGC
	Reverse	CTGCTCTGTGGTGAGGTTCCG
<i>Rpl32</i>	Forward	CAGGGTTCGTAGAAGATCAAGGG
	Reverse	CTTGAGAAACATGTGAGCGATC

## 2.8 Evaluación del efecto del fucoidan en la pérdida ósea inducida por ovariectomía (OVX)

La ovariectomía (OVX) es una técnica quirúrgica que consiste en la remoción de los ovarios de los ratones (Souza et al., 2019). Se realizó la ovariectomía bilateral con el objetivo de provocar una pérdida ósea en los ratones por la ausencia de estrógenos como modelo de menopausia y probar el efecto de diferentes dosis de fucoidan de *U. pinnatifida* y del ácido zoledrónico.

Un día previo a la cirugía, los ratones se pesaron para determinar el volumen de la anestesia a administrar. Dos horas antes de la cirugía se les administró una dosis del analgésico opioide buprenorfina ( $0.05 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Pisa) vía subcutánea (s.c.) en la cabeza con una proporción de  $5 \mu\text{L}$  por gramo de ratón. Posteriormente, los ratones se anestesiaron con un *coktail* de ketamina ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) /xilazina ( $7.5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Pisa) vía intraperitoneal (i.p) con una proporción de  $5 \mu\text{L}$  por gramo de ratón. A continuación, se procedió al rasurado y depilación, seguido de la aplicación de una crema lubricante ocular (Soothe). Durante la cirugía se realizaron dos cortes en los flancos como se muestra en la Figura 12a, y se abrió la cavidad dorsal para ubicar el oviducto, que se retiró de su cavidad. Posteriormente, se localizaron los ovarios, se suturaron ambos oviductos con una sutura absorbible del calibre 3 (Catgut) y se cortaron los ovarios a partir del nudo de la sutura (Figura 12b). Después, se reintrodujo el oviducto y se cerró la piel por contacto con una sutura cutánea adhesiva (3M). Cada 12 h posteriores a la cirugía, y durante 48 h, se les administraron analgésicos y antiinflamatorios de acuerdo con la Tabla 2.



**Figura 12. Ovariectomía en los ratones.** Sitios de incisión para acceder a la cavidad abdominal mediante doble incisión dorsolateral. a) Escisión de los ovarios. b) X denota corte. Modificado de Souza et al., (2019).

Tabla 2. Esquema de analgesia y antiinflamatorios postoperatorios.

Hora post OVX	Régimen de administración
11 h	Buprenorfina (dosis: 0.05 mg kg <sup>-1</sup> ) vía s.c.
23 h	Buprenorfina (dosis: 0.05 mg kg <sup>-1</sup> ) + carprofeno (Rimadyl) (dosis: 5 mg kg <sup>-1</sup> ) vía s.c.
35 h	Buprenorfina (dosis: 0.05 mg kg <sup>-1</sup> ) vía s.c.
47 h	Carprofeno (dosis: 5 mg kg <sup>-1</sup> ) vía s.c.

### 2.8.1 Experimento piloto: fucoïdan y ácido zoledrónico en la pérdida ósea por OVX

Para conocer el efecto del fucoïdan comercial de *U. pinnatifida* y del ácido zoledrónico en la pérdida ósea, se realizaron ovariectomías o cirugías simuladas (*sham*) en los flancos dorsales de ratones hembra de 16 semanas de edad de la cepa Balb/c. Lo anterior se realizó con el objetivo de mimetizar la osteoporosis. Un mes después y hasta la semana ocho después de la cirugía, se administraron los tratamientos a cada uno de los grupos. Los tratamientos y regímenes evaluados se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Grupos y dosis evaluados en el experimento piloto de OVX.

Grupo	Dosis y vía de administración	Régimen
Control: OVX + solución salina 0.9%, n=5	Volumen según el peso, vía i.p	3 veces por semana por cuatro semanas
Control <i>sham</i> : Cirugía simulada + solución salina 0.9%, n=3	Volumen según el peso, vía i.p	3 veces por semana por cuatro semanas
OVX + fucoïdan comercial de <i>U. pinnatifida</i> , n=5	100 mg kg <sup>-1</sup> , vía i.p	3 veces por semana por cuatro semanas
OVX + ácido zoledrónico, n=4	1.25 mg kg <sup>-1</sup> , vía s.c.	3 veces por semana por cuatro semanas

Para la eutanasia, en la semana ocho del experimento, a los ratones se les administró pentobarbital sódico (Aranda) a una dosis letal de 180 mg kg<sup>-1</sup> y se inocularon 200 µL por 20 gramos de peso del ratón para inducir la eutanasia. Los órganos que se colectaron y sus pruebas se encuentran listados en la Tabla 4. Se colectaron los úteros y diferentes huesos. Para confirmar la atrofia de los úteros, estos se disectaron y se pesaron. El peso de los úteros se calculó de acuerdo con la ecuación 4:

$$R = \left( \frac{\text{Peso del útero}}{\text{Peso del ratón}} \right)$$

(4)

Donde:

R = peso del útero expresado en mg por gramo de ratón

**Tabla 4. Órganos disectados de los ratones ovariectomizados.**

Órgano	Prueba	Determinación
Útero	Pesado	Atrofia en el tejido
Fémur y tibia derecho	$\mu$ CT	Medición de los parámetros del hueso cortical y trabecular de los fémures

Para determinar los parámetros del huesos cortical y trabecular en los fémures y tibias mediante  $\mu$ CT, los huesos se fijaron con formalina tamponada 10 % a 4 °C, se lavaron con agua destilada por 2 h y se etiquetaron con diferentes colores de hilo de poliéster (Seralon) para identificar a cada ratón. Posteriormente, los huesos se colocaron en un tubo cónico de 50 mL con torundas con etanol al 50 %. Finalmente, los huesos se enviaron al laboratorio de la unidad de investigación mixta 1033 (UMR 1033) INSERM- Université de Lyon (Francia). Los parámetros del hueso trabecular que se reportaron fueron la fracción del volumen óseo (BV/TV), el espesor trabecular (Tb.Th), el número trabecular (Tb.N), la separación trabecular (Tb. Sp), la superficie específica ósea (BS/BV), la densidad mineral ósea (BMD) y la densidad de conectividad (Conn. Den.).

### 2.8.2 Efecto del fucoidan extracto de *Undaria pinnatifida* en la pérdida ósea por OVX

De acuerdo con los resultados del experimento piloto anterior, se decidió utilizar otra fuente de fucoidan, dos diferentes dosis y cambiar la cepa de los ratones para las cirugías. De esta manera, se realizaron ovariectomías bilaterales o simuladas (*sham*) a ratones hembra de 8 semanas de edad de la cepa C57BL/6. Los grupos y tratamientos se encuentran listados en la Tabla 5.

**Tabla 5. Grupos y dosis evaluados en el experimento de OVX.**

Grupo	Dosis y vía de administración	Régimen
Control: OVX + 1X, n=9	Volumen según el peso, vía i.p	Tres veces por semana por 7 semanas
Control <i>sham</i> : Cirugía simulada + PBS 1X, n=4	Volumen según el peso, vía i.p	Tres veces por semana por 7 semanas
OVX + fucoidan extraído de <i>Undaria pinnatifida</i> , n=8	10 mg kg <sup>-1</sup> , vía i.p	Tres veces por semana por 7 semanas
OVX + fucoidan extraído de <i>Undaria pinnatifida</i> , n=7	100 mg kg <sup>-1</sup> , vía i.p	Tres veces por semana por 7 semanas

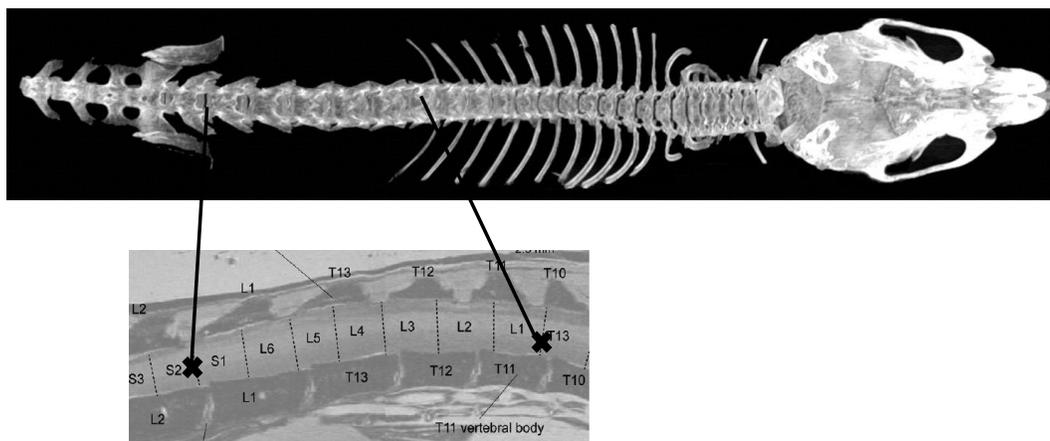
Los tratamientos comenzaron una semana posterior a la cirugía y terminaron ocho semanas después. Al

finalizar el periodo de tratamientos, se colectaron los órganos descritos en la Tabla 6.

**Tabla 6. Órganos disectados de los ratones ovariectomizados.**

Órgano	Prueba	Determinación
Útero	Pesado	Atrofia en el tejido
Columna	Absorciometría dual de rayos X (Vértebrae lumbares 1-4, L1-L4)	Medición de la densitometría ósea
Células del húmero izquierdo y derecho	Extracción de ARN	Medición de la expresión de los genes óseos
Fémur y tibia derecho	1) $\mu$ CT 2) DXA	1) Medición de los parámetros de los huesos cortical y trabecular de los fémures 2) Medición de la densitometría ósea

Para realizar los análisis de imagenología, se colectaron las columnas de los ratones a partir de las últimas dos vértebras torácicas (T 12-13) hasta la cadera (sacro 1) como se muestra en la Figura 13. Las muestras se fijaron en formalina tamponada al 10 % durante 24 h a 4 °C, se lavaron con agua destilada por 1 h y se colocaron en etanol al 70 % hasta su procesamiento en la Universidad de Indiana en Indianápolis, EE. UU.



**Figura 13. Región de corte entre la lumbar 1 y el sacro 1.** La imagen superior muestra una tomografía computarizada, y la imagen inferior muestra una resonancia magnética del esqueleto axial de un ratón. X denota corte. Tomado y modificado de Harrison et al. (2013).

### 2.8.2.1 Efecto de los fucoidanos en la densidad mineral ósea en ratones ovariectomizados

Para conocer la densidad mineral ósea (BMD, por sus siglas en inglés), las vértebras lumbares L1-L4 y los fémures derechos fueron analizados mediante Absorciometría Dual de Rayos X (DXA, por sus siglas en inglés) (Piximus 2 X2608, GE Lunar Healthcare., Madison, EE. UU.). Los fémures y las vértebras se colocaron

sobre una placa de polipropileno de 1.5 cm de grosor y se permitió la medición con los rayos X. Los resultados de la BMD se obtuvieron en  $\text{g cm}^{-2}$ .

### **2.8.2.2 Evaluación del efecto de los fucoidanos mediante microtomografía computarizada ( $\mu\text{CT}$ )**

Los fémures se escanearon en un sistema de microtomografía computarizada de escritorio (Scanco  $\mu\text{CT}$  35, Scanco *Medical AG*, Brüttisellen, Suiza) con los siguientes parámetros: tamaño de vóxel de 10  $\mu\text{m}$ , 55 kV, 120 mA e integración de 151 ms. El análisis del hueso trabecular y total en el fémur se llevó a cabo a 9.4 mm del extremo distal y a 2.6 mm de la metáfisis femoral. En el caso del hueso trabecular, la región de interés comenzó 1 mm proximal a la placa de crecimiento y se extendió 1 mm en dirección proximal (aproximadamente 100 cortes) dentro de la región de la metáfisis. En los casos en que los fémures estaban incompletos (i.e. sin la epífisis con la unión a la cadera), se consideró un promedio de la diáfisis media de cada grupo. Para el análisis del hueso cortical, se seleccionó una región de interés de 1 mm centrada en la diáfisis media del fémur.

## **2.9 Efecto de los fucoidanos en el cáncer de mama**

### **2.9.1 Efecto del fucoidan de *U. pinnatifida* en la migración celular de 4T1**

El ensayo de reparación de heridas se realizó para conocer el efecto en la migración celular de células de cáncer metastásico 4T1. Para el ensayo de migración celular, se sembraron  $4.5 \times 10^5$  células por pozo en una placa de 24 pozos. Las células se mantuvieron en medio RPMI suplementado con FBS al 10 % y antibiótico/antimicótico al 1 % hasta la generación de una monocapa celular. Veinticuatro horas después del sembrado, se realizó un cambio de medio con una disminución de la concentración del suero fetal bovino que consistió en medio RPMI suplementado con FBS al 2 % y antibiótico/antimicótico al 1 %. Doce horas después del *starving*, se realizó una herida sobre la monocapa celular con una punta de 200  $\mu\text{L}$ , y se trataron a las células con el fucoidan comercial y el extraído de *U. pinnatifida* (UPC y UPE  $160 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Los tratamientos se realizaron por triplicado y se prepararon en medio RPMI con FBS al 2 % y antibiótico/antimicótico al 1 %. El control positivo consistió en medio RPMI con FBS al 2 % y

antibiótico/antimicótico al 1 %, y el control negativo consistió en medio RPMI sin FBS y 1 % antibiótico/antimicótico.

El cierre de la herida se monitoreó por medio de fotografías tomadas en el mismo punto durante 30 h. Finalmente, se cuantificó el área sin células en la herida con el programa Image J (versión IJ 1.46r) y el análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prisma 9.4.1.

## 2.10 Evaluación del efecto del fucoïdan en un modelo ortotópico de cáncer de mama

Con el objetivo de conocer el efecto de una terapia preventiva contra un tratamiento terapéutico en un estadio temprano del cáncer de mama, se administró el fucoïdan extraído de *U. pinnatifida* a ratones hembra Balb/c de 4-6 semanas de edad.

El modelo de cáncer consistió en inyectar  $1 \times 10^5$  células 4T1 en ambas cuartas glándulas mamarias de los ratones. Las células 4T1 se activaron de criopreservación en una caja de cultivo de 150 mm y se tripsinizaron cuando alcanzaron un 80 % de confluencia. Posterior a la tripsinización, las células se transfirieron a un tubo cónico de 50 mL donde se lavaron con 40 mL de PBS 1X, seguido de un centrifugado a  $400 \times g$  por 10 min a 4 °C. Este procedimiento se realizó dos veces y se finalizó con el conteo celular para determinar el número de células a inyectar por ratón. Se inocularon  $1 \times 10^5$  células resuspendidas en 25  $\mu$ L de PBS 1X por vía subcutánea en la cuarta glándula mamaria de los ratones. Los grupos y tratamientos que se evaluaron están listados en la Tabla 7. Los tratamientos comenzaron dos días previos a la inoculación de las células de cáncer y terminaron 29 días después.

**Tabla 7. Grupos y dosis evaluados en el modelo ortotópico de cáncer de mama.**

Grupo	Dosis y vía de administración	Régimen
Control: PBS 1X, n=5	Volumen según el peso, vía i.p	3 veces por semana por 31 días
Fucoïdan extracto de <i>U. pinnatifida</i> (Preventivo), n=5	10 mg kg <sup>-1</sup> , vía i.p	48 h previas a la inoculación de las células, con una frecuencia de 3 veces por semana por 31 días
Fucoïdan extracto de <i>U. pinnatifida</i> (Terapéutico), n=5	10 mg kg <sup>-1</sup> , vía i.p	Nueve días post inoculación de las células, con una frecuencia de 3 veces por semana durante 22 días

El tratamiento terapéutico y la medición de los tumores se comenzaron cuando los tumores fueron palpables en el día nueve post-inoculación.

El volumen del tumor se monitoreó tres veces por semana y se calculó de acuerdo con la ecuación 5:

$$V = \left( \frac{L \cdot A^2}{2} \right) \quad (5)$$

Donde:

V = volumen del tumor,

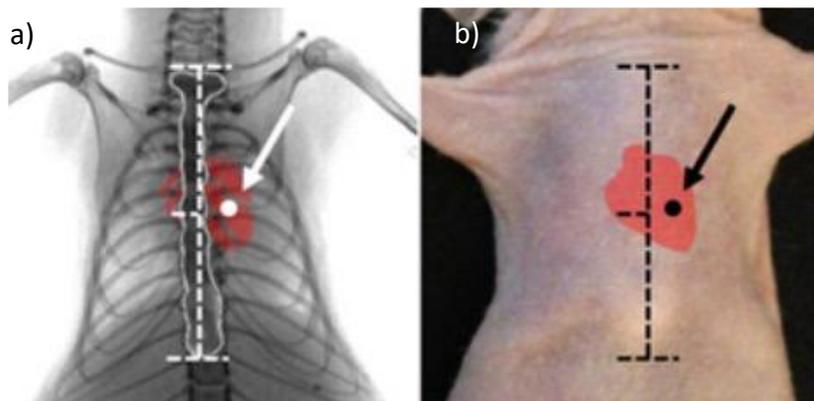
L = largo del tumor y

A = ancho del tumor

Al finalizar el régimen de tratamientos, los ratones se eutanizaron con una sobredosis de pentobarbital sódico y por dislocación cervical. Se disectaron los tumores, se pesaron y se dividieron por la mitad para los análisis de expresión de genes e histológicos.

## 2.11 Evaluación de la pérdida ósea en la metástasis ósea del cáncer de mama

Para evaluar el efecto de los fucoidanos en la progresión del cáncer de mama, se utilizó un modelo de metástasis ósea. Para inducir la metástasis se utilizaron ratones de cuatro semanas de edad de la cepa Balb/c que fueron inoculados con células 4T1 por vía intracardiaca (Figura 14).



**Figura 14. Inoculación intracardiaca en el ventrículo izquierdo del corazón.** a) Vista radiográfica del tórax de un ratón adulto que muestra la zona adecuada para la inoculación intracardiaca. b) La muesca esternal y el apéndice xifoides (línea horizontal punteada superior e inferior, respectivamente) sirven como puntos de referencia anatómicos para la inoculación intracardiaca. Obtenido y modificado de Campbell et al. (2012).

Las células que se inocularon se prepararon como se describió en el modelo ortotópico. Se inocularon  $1 \times 10^5$  células en 100  $\mu\text{L}$  de PBS 1X. Por otro lado, los ratones se anestesiaron con una solución de ketamina ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y xilazina ( $7.5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) por vía intraperitoneal (i.p) con una proporción de 5  $\mu\text{L}$  por gramo de ratón. También se rasuraron en la parte ventral superior para la inoculación de las células en el ventrículo izquierdo del corazón (Campbell et al., 2012). Una vez inoculados, se realizaron marcas en las orejas para su identificación.

### 2.11.1 Experimento piloto: Efecto del fucoïdan de *M. pyrifera* en la metástasis ósea

Posterior a la inoculación intracardiaca de las células de cáncer 4T1, los ratones se asignaron aleatoriamente a su respectiva caja y al día siguiente comenzaron los tratamientos según la Tabla 8.

**Tabla 8. Grupos y dosis evaluados en el experimento piloto del modelo de metástasis ósea.**

Grupo	Dosis y vía de administración	Régimen de tratamiento
Control: PBS 1X n=5	Volumen según el peso, vía i.p	Diario por 9 días
Fucoïdan comercial de <i>M. pyrifera</i> n=5	$100 \text{ mg kg}^{-1}$ , vía i.p	Diario por 9 días
Preventivo: Fucoïdan comercial de <i>M. pyrifera</i> n=6	$100 \text{ mg kg}^{-1}$ , vía i.p	Diario. El tratamiento comenzó 48 h antes de la inoculación de las células de cáncer 4T1 y se administró por nueve días

Los ratones se eutanizaron 10 días posteriores a la inoculación intracardiaca de las células 4T1. Se disectaron ambas patas para sus análisis por rayos X e histomorfometría.

### 2.11.2 Efecto del fucoïdan de *U. pinnatifida* en la metástasis ósea

En el segundo experimento de metástasis ósea se comparó el efecto del fucoïdan comercial y del extracto de *U. pinnatifida* en la pérdida ósea inducida por la metástasis del cáncer de mama. Los tratamientos comenzaron 48 h previas a la inoculación intracardiaca y se evaluaron las mismas dosis de fucoïdan ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Asimismo, se realizó un monitoreo diario del peso de los ratones. Los grupos experimentales se enlistan en la Tabla 9.

**Tabla 9. Grupos y dosis evaluados en el modelo de metástasis ósea.**

Grupo	Dosis y vía de administración	Régimen de tratamiento
Control: PBS 1X, n=10	Volumen según el peso, vía i.p	Diario por 9 días
Fucoidan extracto de <i>U. pinnatifida</i> , n=9	10 mg kg <sup>-1</sup> , vía i.p	Diario por 11 días
Fucoidan comercial de <i>U. pinnatifida</i> , n=10	10 mg kg <sup>-1</sup> , vía i.p	Diario por 11 días

Al finalizar el régimen de tratamiento, los ratones se eutanizaron con una sobredosis de pentobarbital sódico y por dislocación cervical. Se colectaron los órganos listados en la siguiente tabla para sus futuros análisis (Tabla 10).

**Tabla 10. Lista de órganos y células colectadas a partir del experimento de metástasis ósea.**

Órgano	Prueba	Determinación
Bazos	Pesado	Visualización del tamaño de los órganos
Patas derecha e izquierda	1) Microtomografía computarizada ( $\mu$ CT) (fémur izquierdo) 2) Rayos X (fémures y tibias ambas patas) 3) Histología estática (fémur derecho)	1) Medición de los parámetros de los huesos cortical y trabecular de las vértebras 2) Medición de las áreas de osteólisis 3) Comprobación de la carga tumoral
Húmero izquierdo y derecho	Extracción de ARN	Medición de la expresión de los genes

## 2.12 Análisis estadístico

Todos los experimentos se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) o desviación estándar, según se indica en cada figura. El tamaño de muestra para cada experimento se determinó con base en la literatura o en experimentos previos.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) y pruebas de comparaciones múltiples, de la siguiente manera: prueba de Dunnett para comparaciones de los grupos de tratamiento contra el control, prueba de Bonferroni para comparaciones por pares y prueba post-test de Tukey para todas las comparaciones entre pares de grupos.

Los resultados se presentan como gráficos de barras o diagramas de caja con la media o todos los puntos de datos, y el valor de  $p \leq 0.05$  se consideró estadísticamente significativo. Los datos fueron analizados con GraphPad Prism versión 9.4.1 o superior.

## Capítulo 3. Resultados

---

### 3.1 Extracción y caracterización del fucoïdan de *M. pyrifera*, *S. muticum* y *U. pinnatifida*

Las muestras de *M. pyrifera*, *S. muticum* y *U. pinnatifida* recolectadas en la zona submareal de la Isla Todos Santos, Baja California, México, fueron procesadas para extraer fucoïdan, el cual se caracterizó químicamente para determinar el contenido de fucosa, sulfato, ácidos urónicos y carbohidratos totales. Los rendimientos obtenidos a partir de 1 g de alga seca se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11. Contenido de fucoïdan a partir de 1 g de alga de cada especie en las extracciones realizadas.**

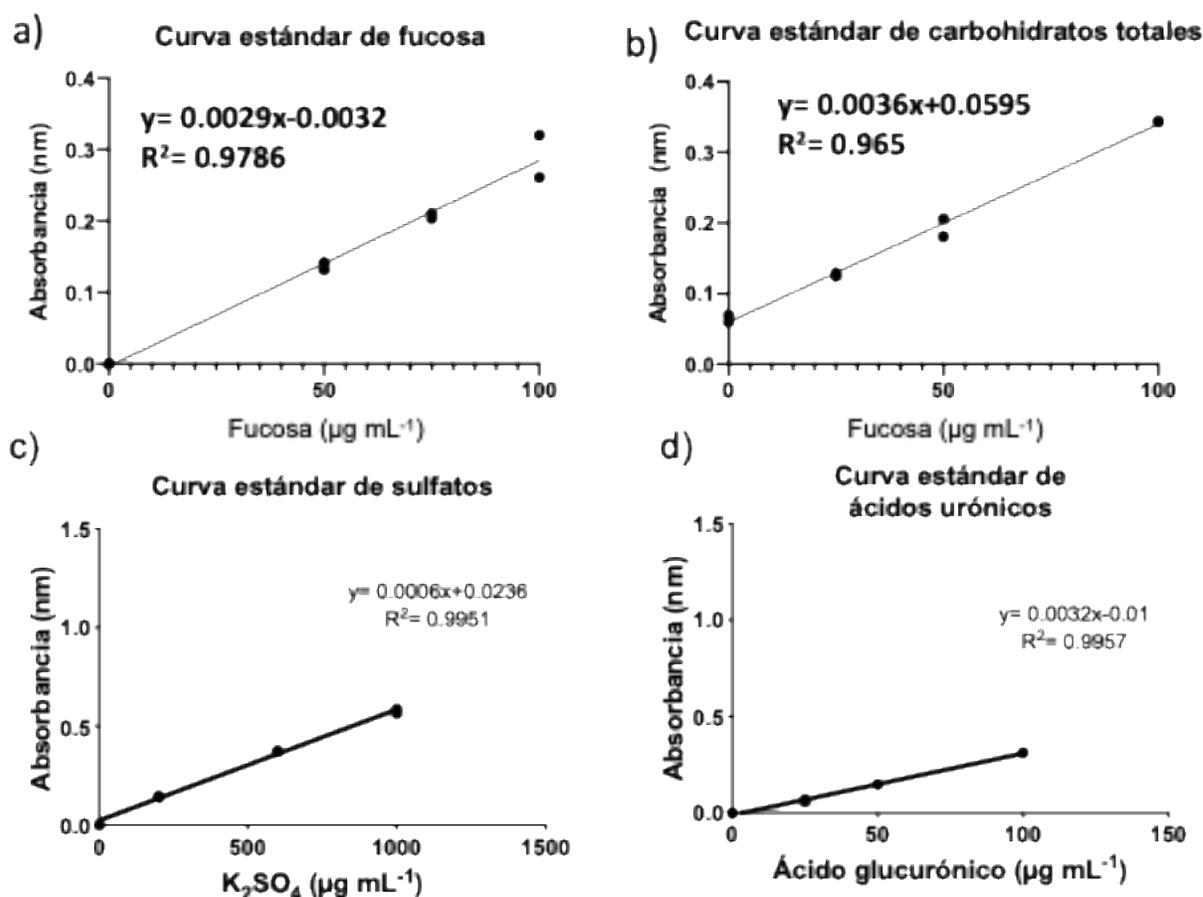
Especies	Masa de fucoïdan obtenida (%)
<i>Macrocystis pyrifera</i>	4.8 ± 1.17
<i>Sargassum muticum</i>	2.14 ± 0.24
<i>Undaria pinnatifida</i>	1.74 ± 0.76

Como puede observarse, el rendimiento del fucoïdan por gramo de alga fue mayor para *M. pyrifera*.

#### 3.1.1 Caracterización química de los fucoïdanos

Para cada especie de alga se realizaron curvas estándar con puntos de medición en diferentes concentraciones (Figura 15). A partir del coeficiente de extinción de cada curva estándar se calcularon los porcentajes de fucosa, hemiéster sulfato y ácido glucurónico contenidos en los extractos y en los fucoïdanos comerciales (Tabla 12).

Para la caracterización de carbohidratos totales y de fucosa, se utilizaron los métodos de fenol-ácido sulfúrico y de cisteína, respectivamente. Los carbohidratos totales representaron el 41.8% del peso seco del extracto de *M. pyrifera*, el 46.9% para *S. muticum* y el 35.7% para *U. pinnatifida*. El fucoïdan aislado de *U. pinnatifida* presentó los niveles más bajos de carbohidratos. El contenido promedio de fucosa fue del 19.7 % para *M. pyrifera*, del 17.0 % para *S. muticum* y del 10.6 % para *U. pinnatifida*. El contenido de carbohidratos totales varió entre especies, pero se encontraron resultados similares entre los fucoïdanos extraídos de *M. pyrifera* y *S. muticum*.



**Figura 15.** Curvas estándar para la caracterización química de los extractos de fucoidan. a) Curva estándar de fucosa, b) curva estándar de carbohidratos totales, c) curva estándar de sulfatos y d) curva estándar de ácidos urónicos.

Entre las especies de los fucoidanos, el extracto de *M. pyrifera* presentó la mayor cantidad de ácidos urónicos. La identificación de estas moléculas es crucial para diferenciar los componentes de los fucoidanos de posibles impurezas, como los ácidos algínicos (Zayed et al., 2020). El contenido de sulfato en el extracto seco de *M. pyrifera* fue en promedio de 19.0 %, 21.3 % para *S. muticum* y 35.2 % para *U. pinnatifida*. El fucoidan de *U. pinnatifida* presentó el mayor contenido de sulfatos, mientras que el de *M. pyrifera* presentó el menor. Estos resultados indican que los niveles de sulfatos en los fucoidanos varían y podrían estar influenciados por la especie del alga, lo que podría afectar la bioactividad debido a la estructura resultante del fucoidan.

**Tabla 12. Composición porcentual del contenido de carbohidratos totales, fucosa, ácidos urónicos y sulfatos.**

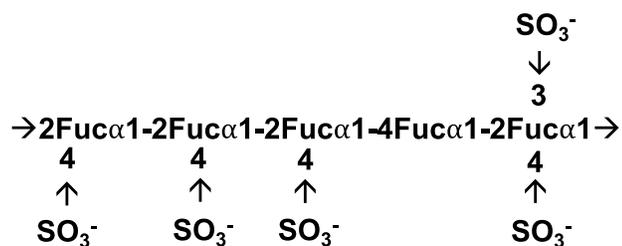
Fucoidan	CHOs	Fucosa	Ácidos urónicos	Grupos sulfato
<i>M. pyrifera</i> comercial	38.68 ± 1.27	35.03 ± 4.1	37.1 ± 3.0	18.17 ± 7.1
<i>M. pyrifera</i>	41.80 ± 0.3	19.71 ± 0.1	19.48 ± 0.2	19.01 ± 0.1
<i>S. muticum</i>	46.92 ± 1.4	16.99 ± 0.2	14.96 ± 0.1	21.13 ± 0.1
<i>U. pinnatifida</i>	35.67 ± 0.3	10.57 ± 0.2	18.61 ± 0.5	35.15 ± 0.2
<i>U. pinnatifida</i> comercial	64.7 ± 3.8	29.0 ± 2.4	12.50 ± 1.2	27.7 ± 0.3

Por otro lado, se calcularon las razones molares a partir de los porcentajes de rendimiento anteriores. Las razones molares obtenidas (Tabla 13) con relación a la fucosa (fucosa: sulfatos: ácidos urónicos) mostraron que los fucoidanos extraídos de *M. pyrifera* y *S. muticum* estaban compuestos de una molécula de ácidos urónicos por molécula de fucosa y uno o dos grupos sulfato por molécula de fucosa, respectivamente. Por otro lado, el fucoidan extraído de *U. pinnatifida* estaba compuesto por más de cuatro grupos sulfato y más de una molécula de ácidos urónicos. Los fucoidanos comerciales de *M. pyrifera* y de *U. pinnatifida* mostraron menor contenido de sulfatos que los extractos de las mismas especies, lo que sugiere que esta variabilidad se debe al método de extracción y de purificación.

**Tabla 13. Razones molares de los fucoidanos.**

Fucoidan	Fucosa	Sulfatos	Ácido glucurónico
<i>M. pyrifera</i> comercial	1	0.74	1.28
<i>M. pyrifera</i>	1	1.37	0.74
<i>S. muticum</i>	1	1.76	0.74
<i>U. pinnatifida</i>	1	4.72	1.46
<i>U. pinnatifida</i> comercial	1	0.36	1.35

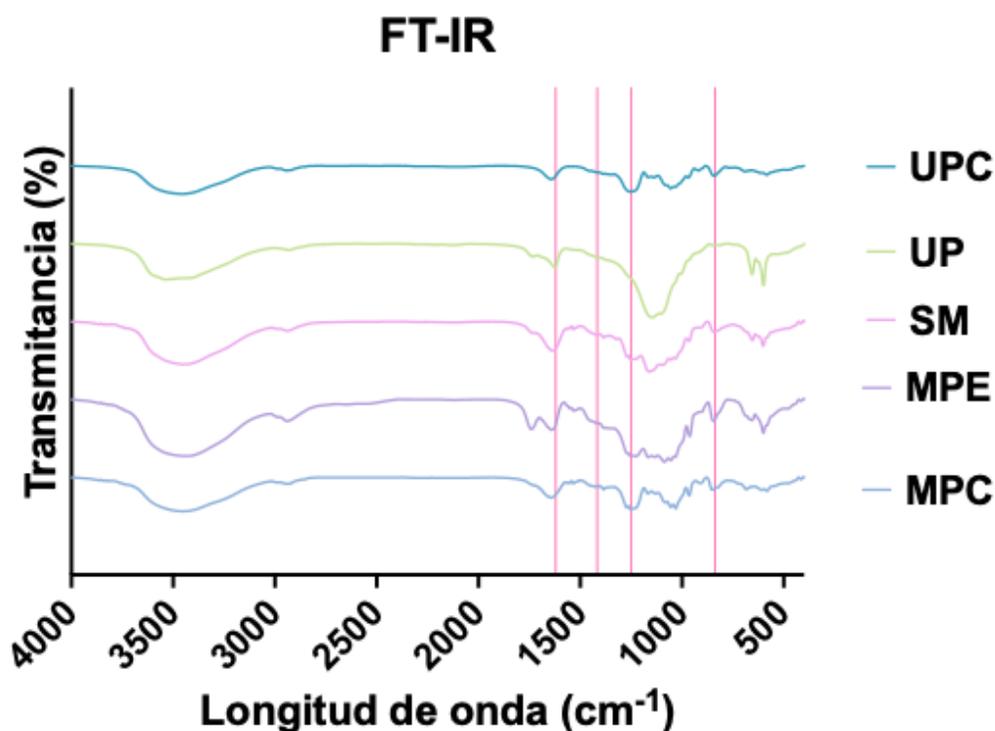
Los datos anteriores sugieren que los fucoidanos podrían presentar una conformación estructural similar al modelo I descrito por Patankar et al. (1993). En la siguiente figura (Figura 16) se muestra una estructura del fucoidan en la que se ubica un grupo sulfato en el carbono 4, dos grupos sulfato en los carbonos 3 y 4, y estos se encuentran enlazados a la cadena principal de fucosa.



**Figura 16. Modelo ramificado de Percival.** Estructura que muestra los grupos sulfatos que se encuentran enlazados a la molécula principal de fucosa en los carbonos número 3 y 4.

### 3.1.2 Caracterización de los fucoidanos por FT-IR

Los picos característicos en FT-IR del fucoidano son: un pico en  $840\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a grupos sulfatos en posición axial en el carbono 4 (C-4), un doblete de picos en  $1620$  y  $1410\text{ cm}^{-1}$  asociada a la vibración de los ácidos urónicos y un pico entre  $1240$ - $1250\text{ cm}^{-1}$  atribuido a los sulfatos totales (Hernández-Garibay et al., 2019; Vaamonde-García et al., 2021). Todos los fucoidanos presentaron un pico alrededor de  $840\text{ cm}^{-1}$ . En cuanto a los ácidos urónicos, *U. pinnatifida* mostró un pico menos intenso en  $1417\text{ cm}^{-1}$  en comparación con los otros fucoidanos. Además, todos ellos exhibieron un pico entre  $1600$  y  $1700\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente al enlace hemiacetal de los ácidos urónicos. El análisis por FT-IR también reveló diferencias estructurales entre los fucoidanos, las cuales se relacionan con su grado de sulfatación. En *U. pinnatifida* se observaron picos intensos cercanos a  $1250$  y  $840\text{ cm}^{-1}$ , lo que confirma un alto nivel de sulfatación. Por el contrario, los fucoidanos de *M. pyrifera* y *S. muticum* mostraron señales de menor intensidad, lo que indica una menor proporción de grupos sulfato. Estas variaciones sugieren que los fucoidanos poseen composiciones moleculares diferentes, lo que probablemente influye en su actividad biológica (Figura 17).

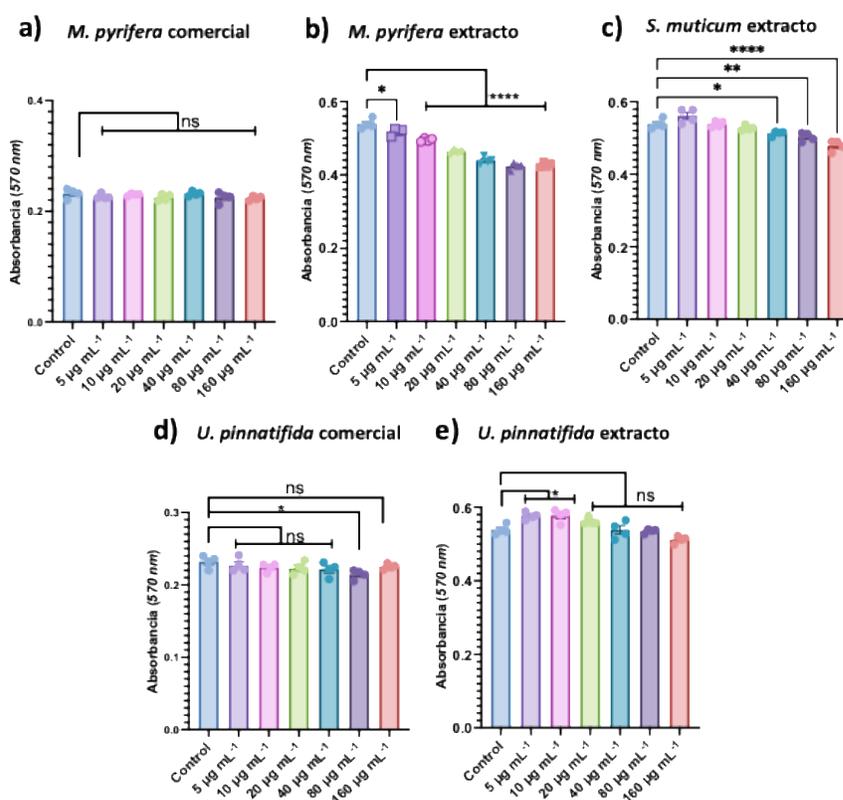


**Figura 17. Espectros de FT-IR de los fucoidanos.** Las líneas verticales en rosado señalan los picos característicos del fucoidano:  $1,620\text{ cm}^{-1}$  (C=O, ácidos urónicos);  $1,417\text{ cm}^{-1}$  (CH<sub>3</sub>, grupos carboxilos de los ácidos urónicos);  $1,250\text{ cm}^{-1}$  (S=O, vibración de estiramiento de los grupos sulfato) y  $840\text{ cm}^{-1}$  (C-4 axial de los grupos sulfato). UPC= *U. pinnatifida* comercial, UP= *U. pinnatifida* extracto, SM= *S. muticum* extracto, MPE= *M. pyrifera* extracto y MPC= *M. pyrifera* comercial.

## 3.2 Efecto del fucoidan en el proceso de remodelación ósea

### 3.2.1 Efecto de los fucoidanos en la viabilidad de las células MC3T3-E1

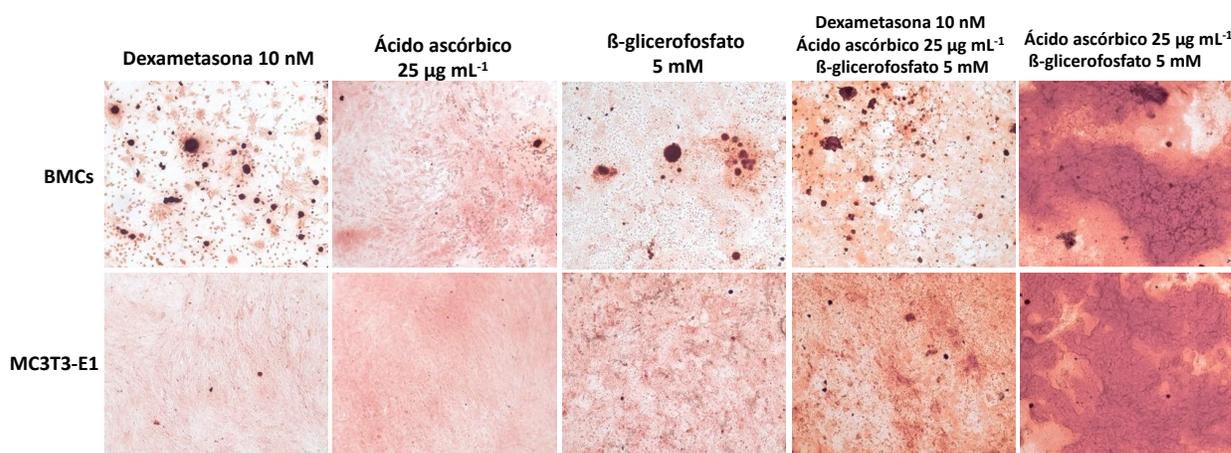
Para evaluar el efecto de los fucoidanos en la viabilidad de los preosteoblastos de ratón, se trataron las células MC3T3-E1 con concentraciones de 5-160  $\mu\text{g mL}^{-1}$  durante 24 h y se utilizó el ensayo colorimétrico MTT. El tratamiento con los fucoidanos comerciales de *M. pyrifera* y de *U. pinnatifida* no tuvo efecto en la viabilidad; sin embargo, el fucoidan extraído de *U. pinnatifida* la promovió con bajas concentraciones (5 y 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Por otro lado, los extractos de *M. pyrifera* y de *S. muticum* inhibieron significativamente la viabilidad y su efecto fue dependiente de la concentración (Figura 18). Lo anterior sugiere que los fucoidanos tienen diferente efecto de acuerdo con la especie.



**Figura 18. Efecto de los fucoidanos en la viabilidad de los preosteoblastos de ratón MC3T3-E1.** (a y d) Las células MC3T3-E1 se trataron con diferentes concentraciones de cada fucoidan (5-160  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) por 24 h. (b y c) Los fucoidanos comerciales no tuvieron efecto en la viabilidad celular, pero los fucoidanos extraídos de *M. pyrifera* y *S. muticum* la inhibieron significativamente. e) Solo el fucoidano extraído de *U. pinnatifida* promovió el aumento en la viabilidad de las células con bajas concentraciones. Los resultados se presentan como gráficas de barras con todos los valores individuales ( $n=4$  replicados biológicos) y el error sobre la media ( $\pm\text{SEM}$ ). ANOVA de una vía seguido del *post test* de Dunnett. El valor  $P<0.05$  se consideró como estadísticamente significativo. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$  y ns como no significativo.

### 3.2.2 Determinación de los controles para osteoblastogénesis

En la determinación del control para los ensayos de osteoblastogénesis (ver apartado 2.6.1), todos los grupos promovieron la mineralización de las células de médula ósea y de las células MC3T3-E1, sin embargo, lo hicieron en diferente medida. Los resultados muestran imágenes representativas de las células teñidas con rojo de alizarina S correspondiente a cada grupo evaluado (Figura 19). El grupo que combinó el ácido ascórbico  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  y el  $\beta$ -glicerofosfato  $5 \text{ mM}$  (grupo 5) mostró mayor aumento en la mineralización. Esta combinación fue la más efectiva entre todas las evaluadas en los ensayos. Debido a su eficacia, se seleccionó este medio como estándar para los experimentos posteriores.



**Figura 19. Panel de selección de controles para la osteoblastogénesis.** Imágenes representativas de la tinción con rojo de alizarina S que muestran la mineralización formada posterior a 21 días de cultivo. De izquierda a derecha se muestra el control de dexametasona  $10 \text{ nM}$ ; ácido ascórbico  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $\beta$ -glicerofosfato  $5 \text{ mM}$ ; la combinación de dexametasona  $10 \text{ nM}$ , ácido ascórbico  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $\beta$ -glicerofosfato  $5 \text{ mM}$ ; y la combinación de ácido ascórbico  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $\beta$ -glicerofosfato  $5 \text{ mM}$ . De arriba a abajo se muestra el efecto en la mineralización de las células de médula ósea y de las células MC3T3-E1, respectivamente. Aumento 200X.

### 3.2.3 Efecto de los fucoidanos en la osteoblastogénesis

Para determinar si los fucoidanos extraídos afectan la deposición de calcio, las células de médula ósea (Figura 20) y las células MC3T3-E1 (Figura 21) fueron expuestas a diferentes concentraciones de los fucoidanos ( $5\text{-}400 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). La adición de bajas concentraciones de los fucoidanos ( $5\text{-}50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) disminuyó la mineralización, mientras que altas concentraciones ( $100\text{-}400 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) la promovieron significativamente cuando se compararon con el medio de diferenciación (C+) solo. Nuestros datos sugieren que los fucoidanos tienen un efecto anabólico dependiendo de la concentración sin importar la fuente celular (células BMC o MC3T3-E1).

### 3.2.4 Efecto de los fucoïdanos en la formación ósea mediante un modelo *ex vivo* de calvaria

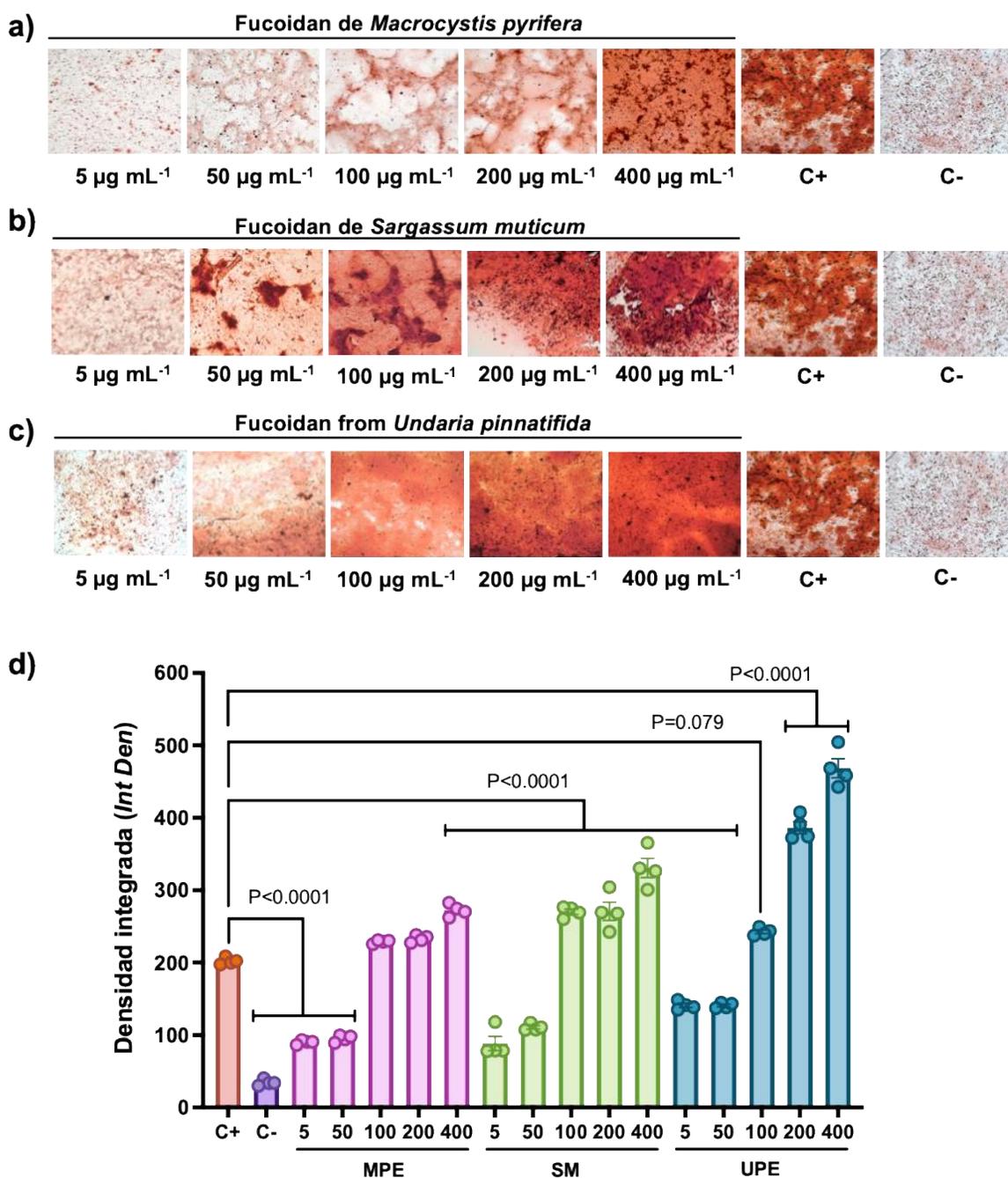
Para evaluar el efecto de los fucoïdanos en una etapa temprana de formación ósea directamente sobre el hueso, se utilizó un modelo *ex vivo* de calvaria de ratón neonato. Los tejidos se cultivaron durante una semana con los fucoïdanos extraídos de *M. pyrifera*, *S. muticum* y *U. pinnatifida*, y se evaluaron las concentraciones de 25 y 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Posteriormente los tejidos se fijaron, se descalcificaron y se depositaron en cassettes histológicos para su procesamiento. Finalmente, se cortaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E).

El análisis histológico de las secciones teñidas con H&E después de siete días de cultivo no reveló formación de osteoide evidente en el control negativo. Por el contrario, las calvarias tratadas con insulina (control positivo) mostraron una evidente formación de hueso nuevo visible como áreas teñidas de rosa, lo que confirma la respuesta osteogénica del modelo (Figura 22 a-c). Por su parte, los tres fucoïdanos aumentaron significativamente la formación de hueso nuevo a 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Sin embargo, la respuesta a concentraciones más altas varió entre especies. Los fucoïdanos de *M. pyrifera* y de *S. muticum* no promovieron una mayor formación de hueso a 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 22 d y e), lo que sugiere una posible saturación del sistema. Por el contrario, el fucoïdan de *U. pinnatifida* promovió la formación de hueso nuevo dependiente de la concentración (Figura 22 f).

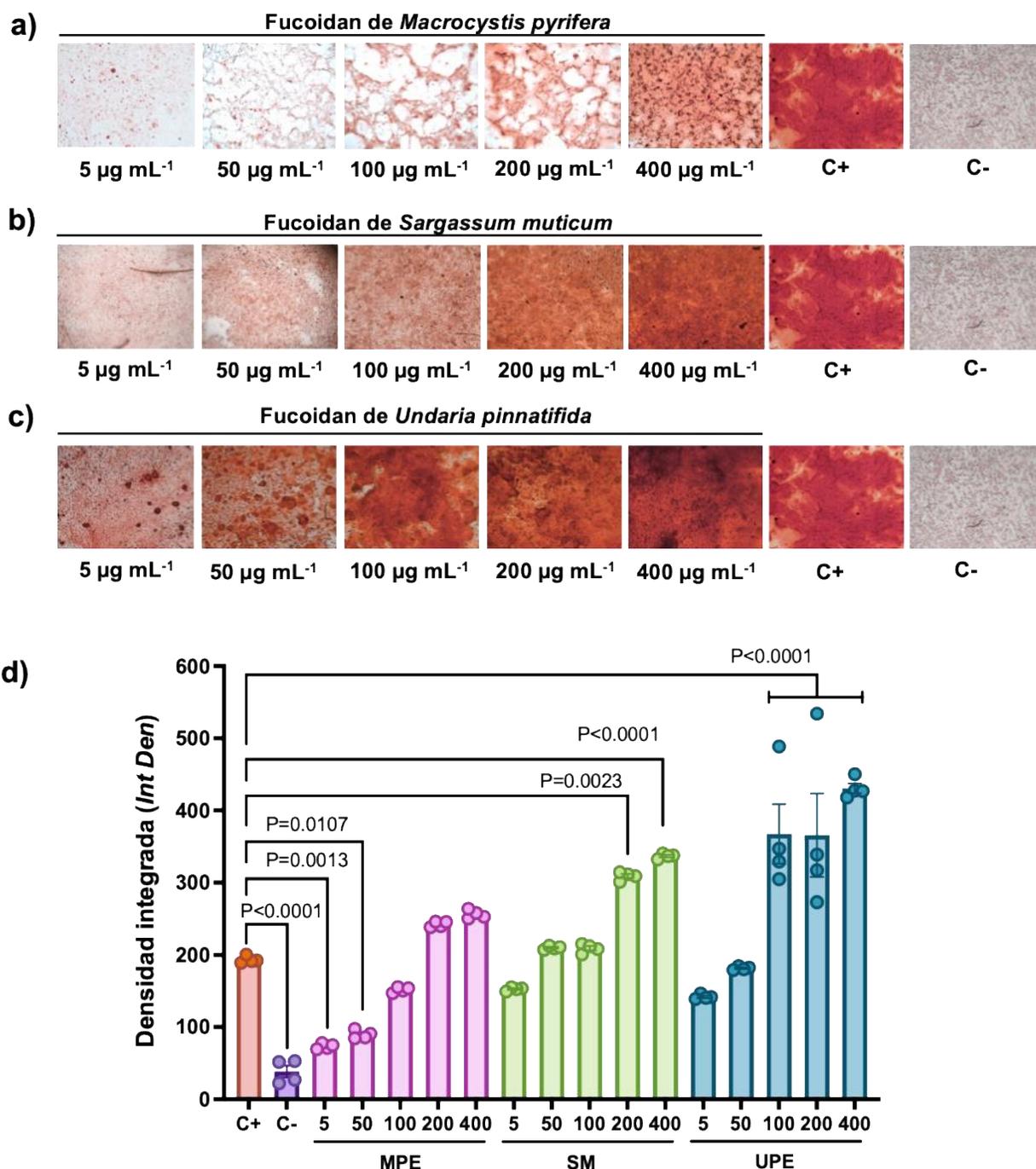
### 3.2.5 Efecto de los fucoïdanos en los genes de remodelación ósea

Los genes óseos de las calvarias tratadas con 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de los fucoïdanos mostraron un aumento significativo en la expresión de *Runx2*, un gen clave en la diferenciación de los osteoblastos, y el mayor aumento se observó con *U. pinnatifida*. La expresión de *Sost*, un regulador negativo de la formación ósea secretado por los osteocitos, solo aumentó con *U. pinnatifida* y se mantuvo sin cambios entre los demás tratamientos. En cuanto a los marcadores de reabsorción ósea, el tratamiento con 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de los fucoïdanos aumentaron de manera significativa la expresión de *Ctsk* en todos los grupos, lo que indica una modulación en los osteoclastos. La expresión de *Rankl* se elevó en todos los grupos, y la relación *Rankl/Opg*, un indicador clave del potencial osteoclástico, se redujo significativamente en el grupo de *U. pinnatifida*. Esto sugiere un efecto antirresortivo selectivo a través de la inhibición de la señalización de *Rankl* mediada por *Opg* (Figura 23). En conjunto, estos resultados confirman que el fucoïdano de *U. pinnatifida* no solo promueve la formación ósea a nivel estructural, sino que también modula una vía

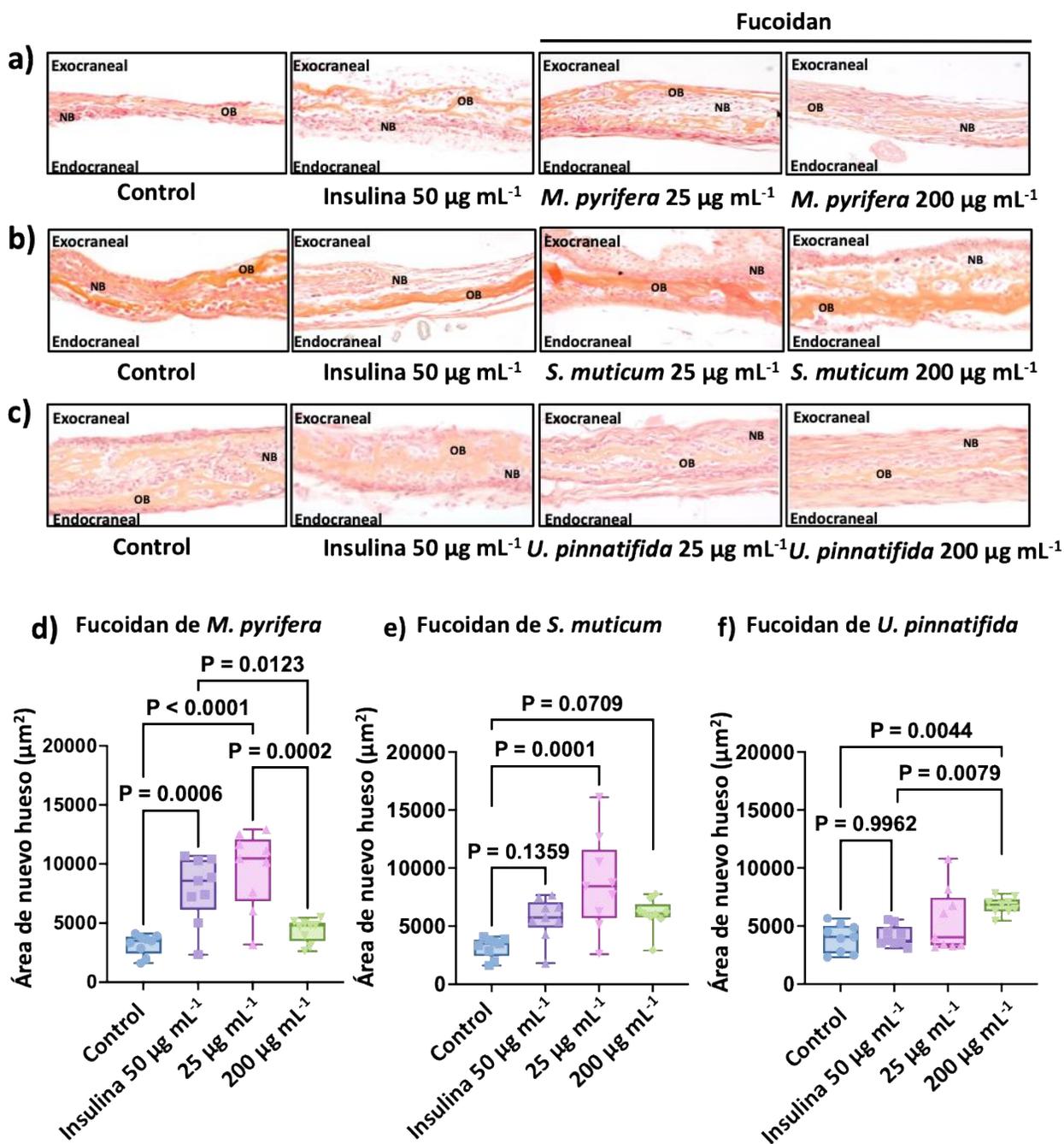
molecular clave involucrada en la remodelación ósea.



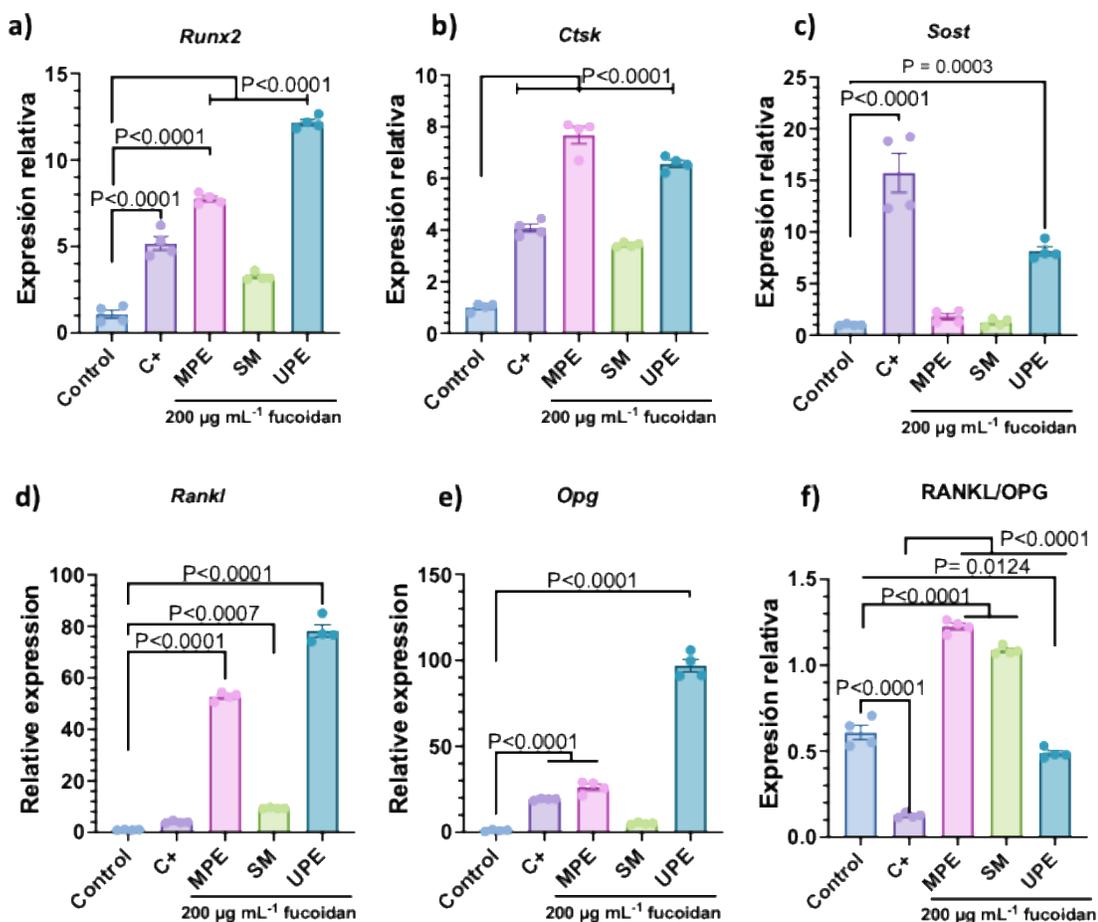
**Figura 20. El fucoïdan modula la osteoblastogénesis en las células de médula ósea.** a) Efecto de los fucoïdanos aislados de *M. pyrifera*, b) *S. muticum* y c) *U. pinnatifida*. Imágenes representativas de los depósitos de calcio producidos por las células de médula ósea después de 21 días de exposición a los fucoïdanos. Control positivo (C<sup>+</sup>): medio completo  $\alpha$ -MEM con ácido ascórbico y  $\beta$ -glicerofosfato sin fucoïdan. Control negativo (C<sup>-</sup>): medio completo  $\alpha$ -MEM. Aumento 100 X. Las imágenes mostradas son representativas de tres experimentos independientes, cada uno con cuadruplicados (n=4). d) Evaluación cuantitativa de las imágenes de ARS por medio de la densidad integrada (área x intensidad de rojo). ANOVA de una vía seguida del *post test* de Tukey. Para todas las comparaciones  $p < 0.05$  se consideró significativo.



**Figura 21. Los fucoidanos aumentan los depósitos de calcio con altas concentraciones durante la diferenciación de las células MC3T3-E1.** Imágenes representativas de la tinción con rojo alizarina S de células MC3T3-E1 que muestran depósitos de fosfato de calcio (rojo) tras 21 días de tratamiento con fucoidan a 5, 50, 100, 200 y 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Los fucoidanos se aislaron de a) *M. pyrifera*, b) *S. muticum* y c) *U. pinnatifida*. Control positivo (C+): medio  $\alpha$ -MEM completo con ácido ascórbico y  $\beta$ -glicerofosfato sin fucoidan. Control negativo (C-): medio  $\alpha$ -MEM completo. Aumento 100 $\times$ . Imágenes representativas de tres experimentos independientes con cuadruplicados ( $n=4$ ). d) La mineralización se evaluó cuantitativamente por medio de la densidad integrada de las imágenes teñidas con ARS. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba *post test* de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con  $p<0.05$ .



**Figura 22. Efecto de los fucoidanos en el tejido de calvaria.** Secciones del tejido de las calvarias teñidas con H&E correspondientes a a) *M. pyrifera*, b) *S. muticum* y c) *U. pinnatifida* (aumento 400X). Los fucoidanos promovieron de manera diferente el área de nuevo hueso (d-f). Análisis histomorfométrico del área de formación ósea. Los resultados se expresan como diagramas de cajas con bigotes con valores individuales de los datos (n = 9). ANOVA de una vía con *post test* de Dunnett. Los resultados de la cuantificación se expresaron con sus respectivos valores de p. OB: *old bone* (viejo hueso) y NB: *new bone* (hueso nuevo).



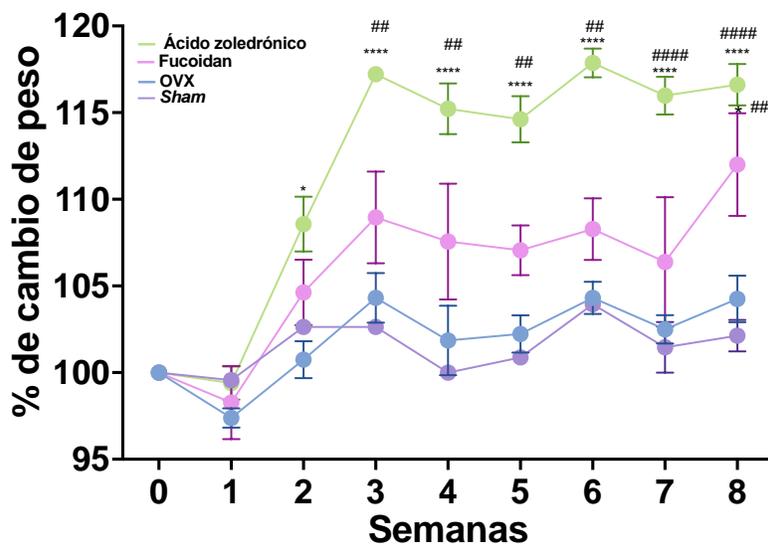
**Figura 23. Efecto de los fucoidanos en los genes de remodelación ósea.** (a-e) Expresión génica de los marcadores de formación y reabsorción ósea en calvarias de ratón neonato tratadas con  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada fucoidan. f) La relación *Rankl/Opg* muestra que solo el fucoidan extraído de *U. pinnatifida* redujo significativamente la capacidad osteoclástica. Los resultados se presentan como gráficos de barras con valores individuales de los datos ( $n = 4$ ). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con la prueba *post hoc* de Tukey. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró significativo. Control: medio completo, C+: insulina  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , MPE: *M. pyrifera* extracto, SM: *S. muticum* extracto, UPE: *U. pinnatifida* extracto.

### 3.3 Efecto del fucoidan en la pérdida ósea por ovariectomía (OVX)

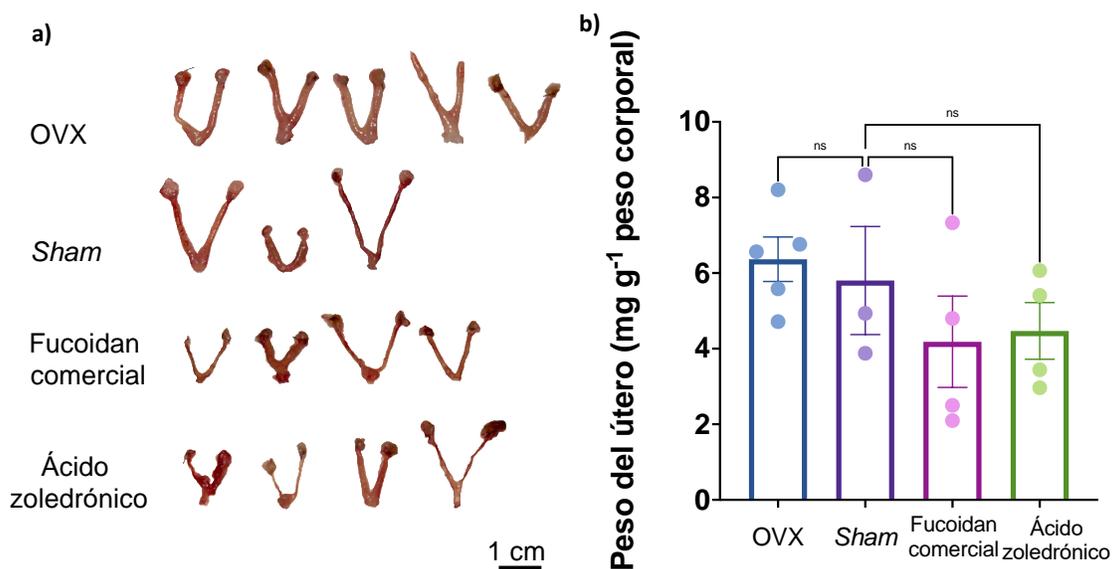
#### 3.3.1 Determinación de las dosis del fucoidan en el modelo de OVX

Los pesos de los ratones se midieron semanalmente para confirmar el cambio en el peso posterior a la ovariectomía. No hubo cambios significativos de los pesos iniciales entre los cuatro grupos; sin embargo, el peso de los ratones del grupo del ácido zoledrónico aumentó significativamente comparado con el control OVX o *Sham* a partir de la segunda semana (Figura 24). Además, el peso del grupo tratado con el

fucoïdan comercial aumentó significativamente en la octava semana posterior a la cirugía cuando se comparó con el control OVX o *Sham*.

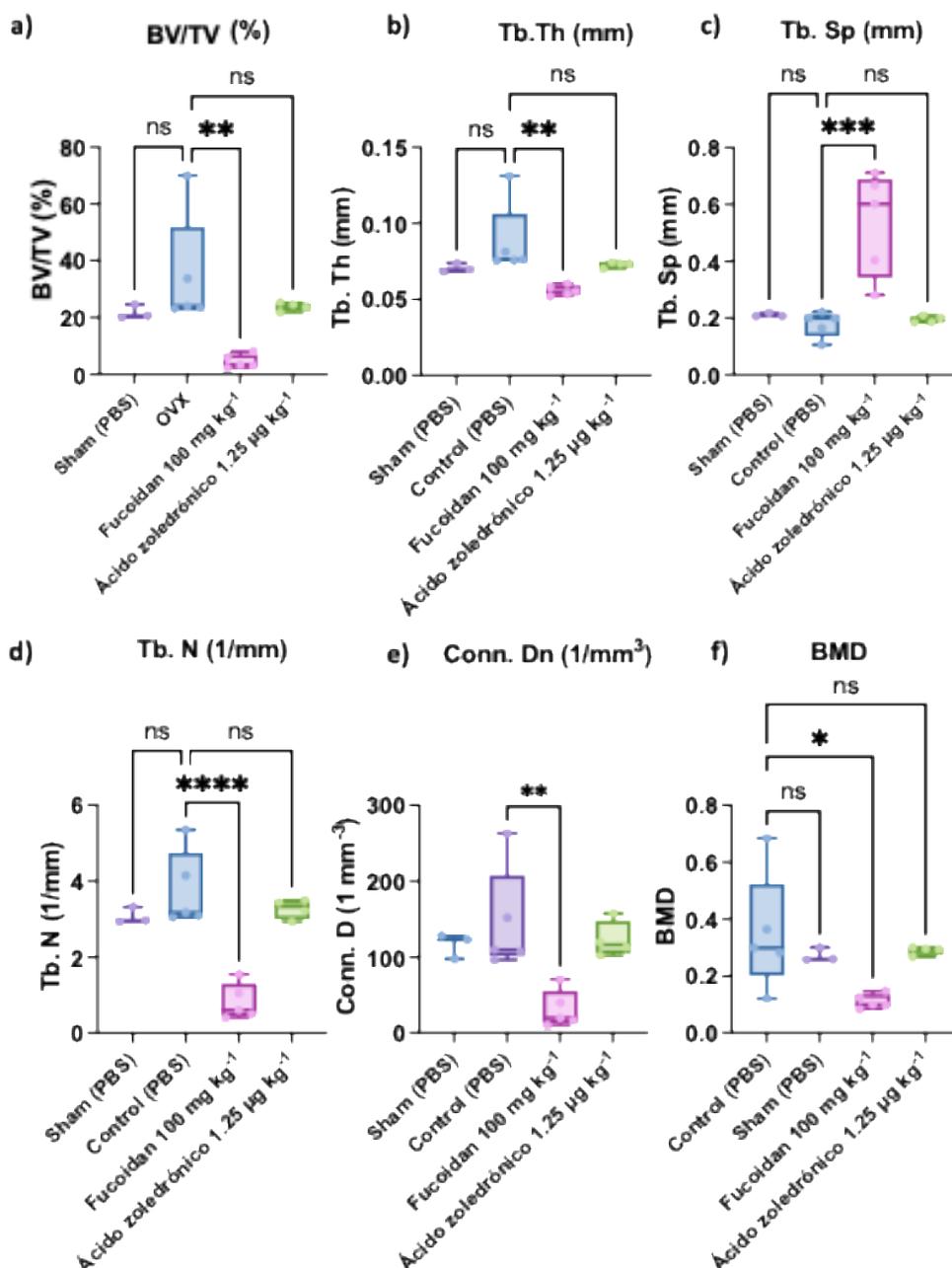


**Figura 24. Efecto del fucoïdan comercial y del ácido zoledrónico en los pesos de los ratones.** Los ratones Balb/c se pesaron una vez por semana durante ocho semanas. Análisis de modelos mixtos con *post test* de Sidak. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  y ns como no significativo cuando se compararon contra el control OVX. Los resultados se expresaron como # $P < 0.05$ ; ## $P < 0.01$ ; ### $P < 0.001$ ; #### $P < 0.0001$  y ns como no significativo cuando se compararon contra el control *sham*.



**Figura 25. Efecto del fucoïdan y del ácido zoledrónico en el peso del útero.** Los ratones Balb/C fueron tratados con fucoïdan ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) o ácido zoledrónico ( $1.25 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) durante cuatro semanas. Los úteros se disectaron 48 h después del último tratamiento. Úteros disectados (a). Pesos de los úteros en relación con el peso corporal de los ratones (b). ANOVA de una vía con *post test* de Dunnett. Los resultados de la cuantificación se expresaron como la media  $\pm$  SEM \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$  y ns como no significativo.

Por otro lado, los úteros se pesaron y se fotografiaron. Como se aprecia en la Figura 25, los úteros correspondientes al grupo OVX no mostraron atrofia. En cambio, los ratones del grupo del fucoidan y del ácido zoledrónico mostraron una disminución en el tamaño del útero. Con respecto a las patas, se realizó  $\mu$ CT para conocer el efecto de los fucoidanos en la microarquitectura del hueso (Figura 26).



**Figura 26. Efecto del fucoidan y del ácido zoledrónico en el hueso trabecular de ratones ovariectomizados tratados con el fucoidan de *U. pinnatifida*.** a) Fracción del volumen óseo (% BV/TV), b) espesor trabecular (Tb. Th), c) separación trabecular (Tb. Sp), d) número trabecular (Tb. N), e) densidad de conectividad (Conn.D) y f) Densidad Mineral ósea (BMD). ANOVA de una vía con *post test* de Dunnett. Los resultados cuantificados se expresaron como la media  $\pm$  SEM \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$  y ns como no significativo.

El análisis de la región trabecular de las tibias de los grupos control OVX y *sham* no mostró diferencias significativas, lo que sugiere que el modelo no generó pérdida ósea (Figura 26). Por otro lado, los resultados de los animales tratados con el fucoïdan comercial de *U. pinnatifida* mostraron que la fracción del volumen óseo (BV/TV) disminuyó significativamente en comparación con el control OVX y que la dosis del ácido zoledrónico no tuvo efecto en la formación ósea cuando se le comparó con el control OVX. Estos resultados fueron consistentes con otros parámetros trabeculares, como el grosor trabecular (Tb.Th), el número trabecular (Tb.N.), la densidad de conectividad (Conn.D) y la densidad mineral ósea (BMD). Lo anterior sugiere que el modelo de pérdida ósea por OVX, así como las dosis empleadas del fucoïdan y del ácido zoledrónico, no fueron las más adecuadas para evidenciar la formación ósea, por lo que fue necesario realizar ajustes en el diseño experimental.

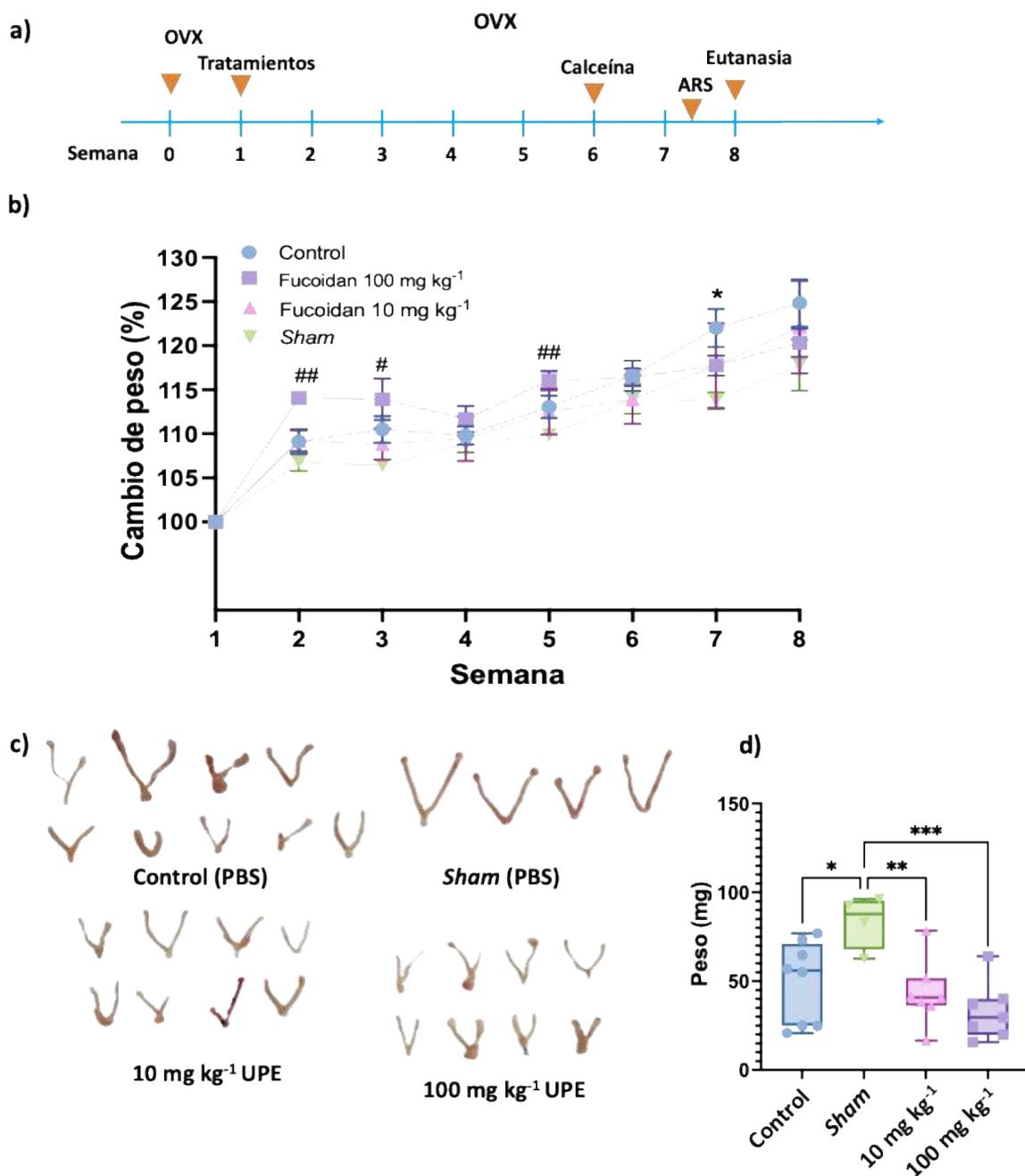
### **3.3.2 Efecto del fucoïdan de *U. pinnatifida* en la pérdida ósea inducida por OVX**

A partir del experimento anterior se decidió cambiar las dosis, el régimen de administración del fucoïdan, la edad y la cepa de los ratones.

Los ratones C57BL/6, de ocho semanas de edad, recibieron una cirugía bilateral o simulada. Los ratones se trataron una semana después de la cirugía durante siete semanas con dos dosis de fucoïdan extraído de *U. pinnatifida* (10 y 100 mg kg<sup>-1</sup>). Al finalizar el periodo de tratamiento, se disectaron los úteros, las patas, los húmeros y la columna de cada ratón.

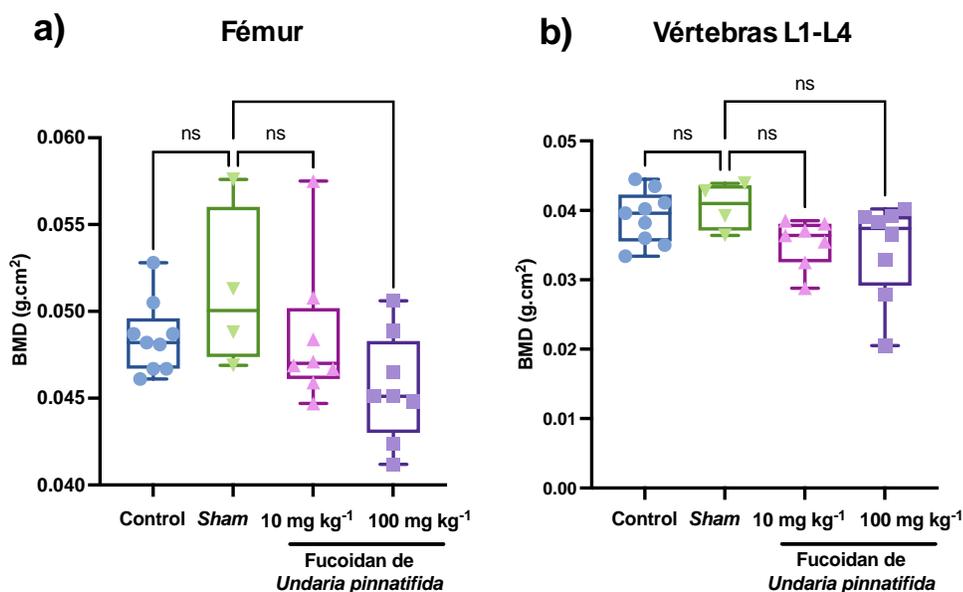
Los pesos de los ratones se monitorearon una vez por semana durante ocho semanas. El aumento de peso fue notorio en el grupo control (OVX) y en los ratones tratados con fucoïdan 100 mg kg<sup>-1</sup> comparado con el grupo *sham*. Los ratones que recibieron el tratamiento del fucoïdan de 10 mg kg<sup>-1</sup> se comportaron de manera similar a los del grupo *sham*.

Por su parte, los úteros de los ratones OVX mostraron atrofia y los que recibieron la cirugía simulada mantuvieron su morfología normal. Los pesos de úteros de los ratones tratados con el fucoïdan disminuyeron significativamente cuando se compararon con el control OVX. Lo anterior sugiere que la ovariectomía fue exitosa y que el tratamiento con el fucoïdan no evitó la atrofia del útero (Figura 27).



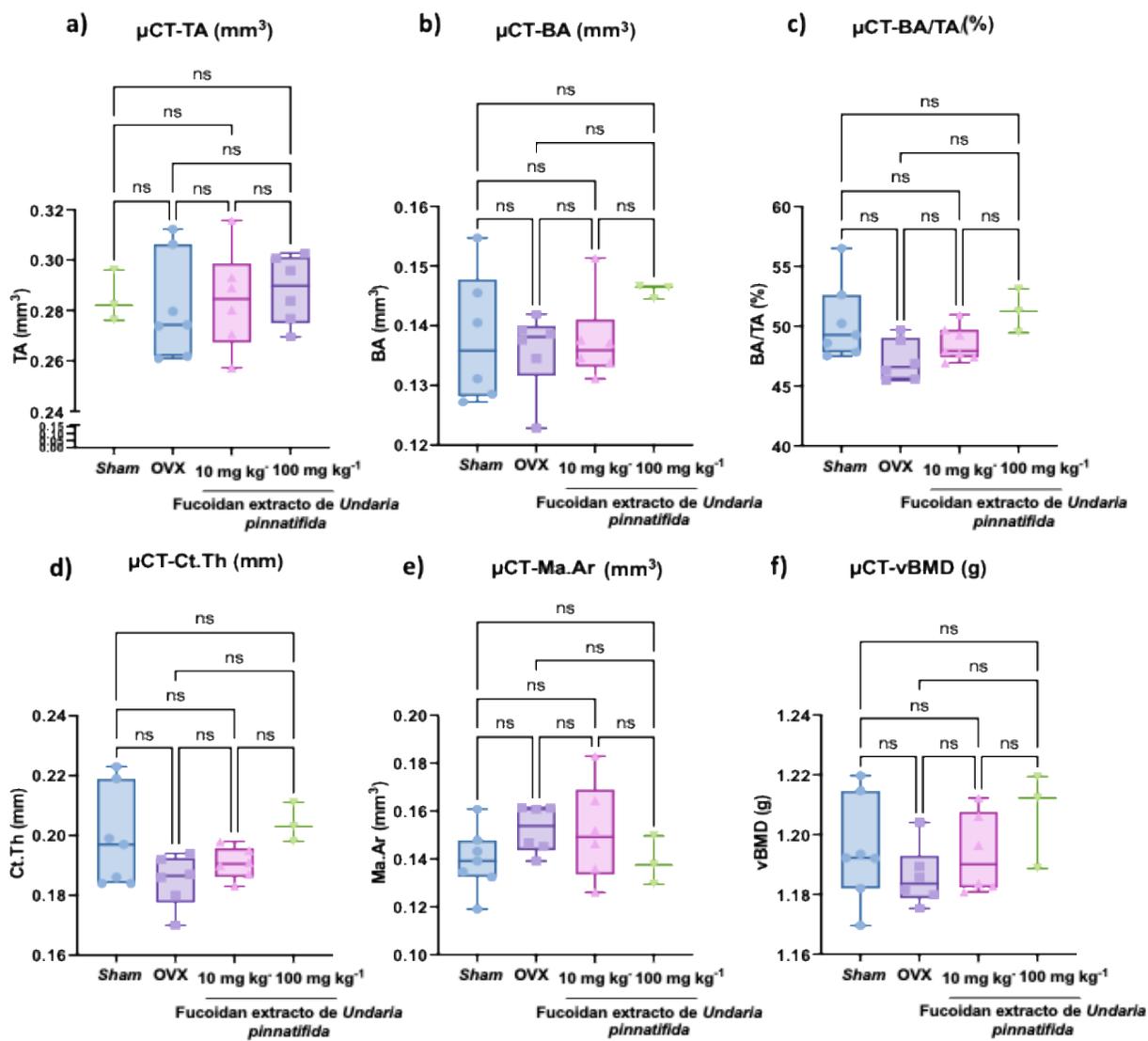
**Figura 27.** Efecto del fucoïdan extraído de *U. pinnatifida* en la morfología y el peso de los úteros de los ratones C57BL/6 ovariectomizados. a) Diseño experimental. b) Porcentaje de cambio de peso a partir del peso inicial de cada ratón. Análisis de modelos mixtos con *post test* de Sidak. Los resultados se expresaron como # $P < 0.05$ ; ## $P < 0.01$ ; ### $P < 0.001$ ; #### $P < 0.0001$  y ns como no significativo cuando se compararon contra el control sham. c) Imágenes que muestran la morfología de los úteros que recibieron la ovariectomía bilateral o la cirugía simulada. Nótese que los grupos control (OVX) y los tratados con 100 y 10 mg kg<sup>-1</sup> de fucoïdan provocaron el adelgazamiento de los úteros. d) Cuantificación de los pesos de los úteros. ANOVA de una vía con *post test* de Dunnet.

Por otro lado, se evaluó la densidad mineral ósea mediante la absorciometría dual de rayos X (DXA, por sus siglas en inglés) (Figura 28). Los resultados mostraron que la dosis de 10 mg kg<sup>-1</sup> del fucoidan no tuvo efecto significativo y la dosis de 100 mg kg<sup>-1</sup> indujo la pérdida ósea significativamente cuando se la comparó con el control OVX. Además, en las vértebras los resultados de la densitometría ósea señalaron que no hubo diferencias significativas entre los grupos.



**Figura 28. Efecto del fucoidan extraído de *Undaria pinnatifida* en la densitometría ósea de los fémures y vértebras de los ratones ovariectomizados.** a) DXA de los fémures. b) DXA de las vértebras lumbares L1-L4. ANOVA de una vía con post test de Dunnet. Los resultados se expresaron como gráfica de cajas con bigotes con todos los puntos. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001 y ns como no significativo cuando se compararon con el control OVX o sham.

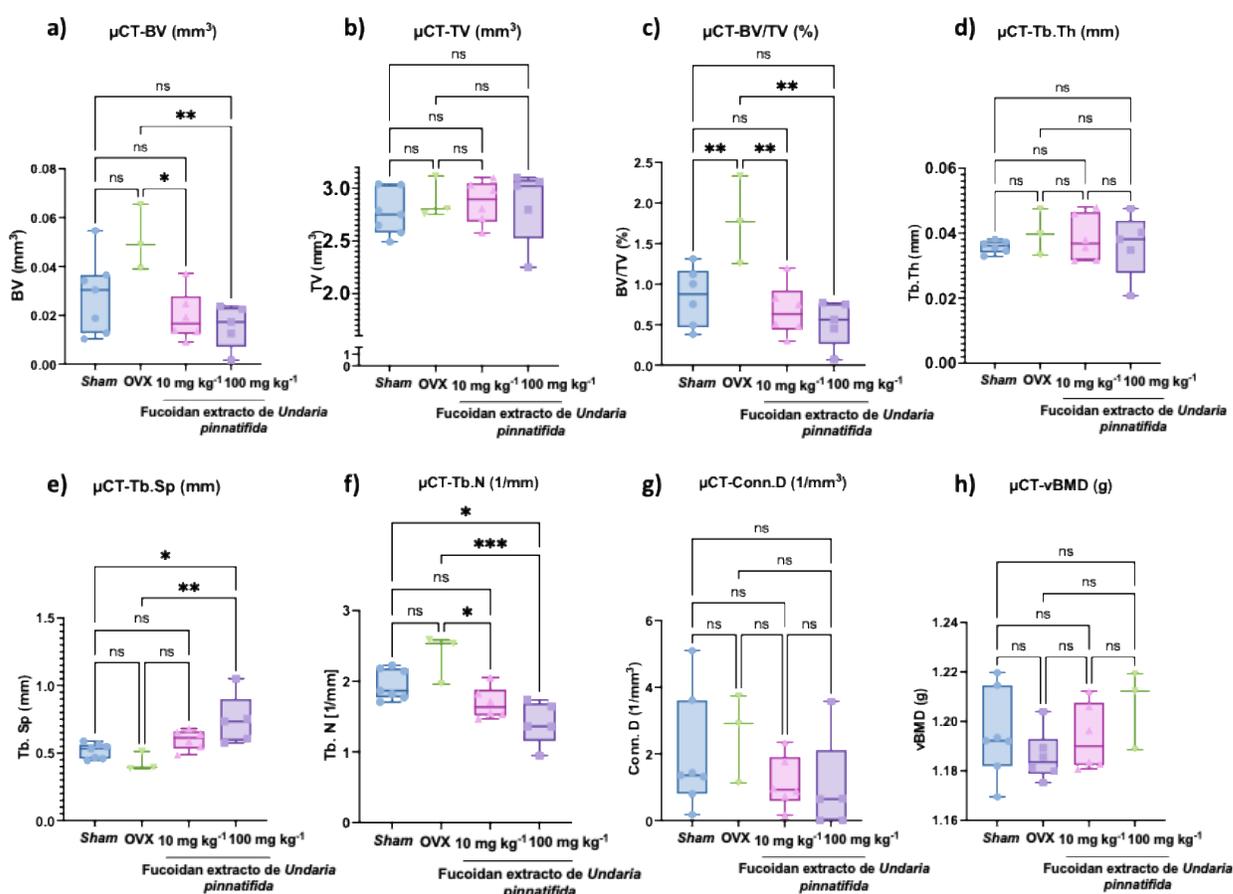
Con referencia al hueso cortical, los resultados indicaron que las áreas totales (TA, por sus siglas en inglés) de los fémures no se alteraron en ningún grupo (Figura 29a); tampoco se observaron cambios significativos en el área del hueso (BA, por sus siglas en inglés) (Figura 29b), y por consiguiente, tampoco hubo cambios significativos en la proporción del área transversal total ocupada por tejido óseo (relación BA/TA) (Figura 29c). Lo anterior indica que, ni los tratamientos, ni la cirugía alteraron la microarquitectura ósea del hueso cortical. Por otro lado, el área de médula ósea (Ma.Ar, por sus siglas en inglés) no se vio afectada por los tratamientos de fucoidan (Figura 29d). Finalmente, el grosor cortical (Ct.Th., por sus siglas en inglés) y la densidad mineral ósea (BMD, por sus siglas en inglés) tuvieron una tendencia a disminuir de acuerdo con la dosis utilizada (Figura 29 e y f).



**Figura 29. Efecto de los tratamientos del fucoidan de *Undaria pinnatifida* en el hueso cortical de los ratones ovariectomizados.** El hueso cortical de los fémures de los ratones ovariectomizados se midió y se determinó que ningún tratamiento con fucoidan alteró los parámetros del hueso cortical. a) Área total (TA), b) área de hueso (BA), c) relación del área transversal total ocupada por tejido óseo (BA/TA), d) área de médula ósea (Ma. Ar), e) grosor cortical (Ct. Th.) y f) densidad mineral ósea (BMD). ANOVA de una vía con *post test* de Dunnett. Los resultados se expresaron como gráfica de cajas con bigotes con todos los puntos y ns significa no significativo cuando se compararon con los controles.

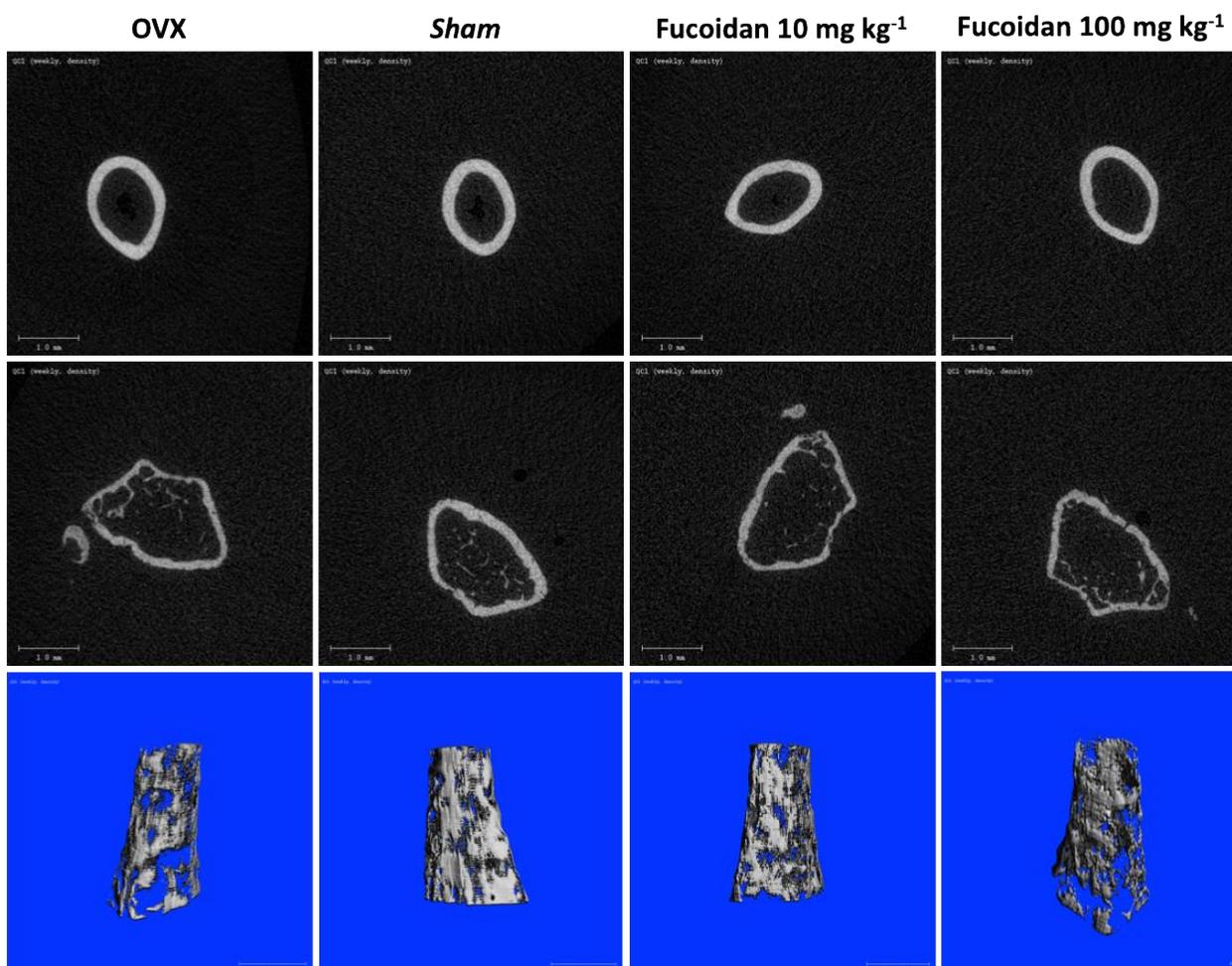
Por otro lado, los resultados correspondientes al hueso trabecular se observan en la siguiente figura (Figura 30). El tratamiento con las dos dosis del fucoidan de *U. pinnatifida* disminuyó significativamente el volumen del hueso (BV, por sus siglas en inglés) cuando se le comparó con los ratones con cirugía simulada (Figura 30a). No se encontraron diferencias significativas en el volumen total del hueso (TV, por sus siglas

en inglés) (Figura 30b) ni en la fracción del volumen óseo (BV/TV). Además, los resultados fueron consistentes con la medición del grosor trabecular (Tb.Th., por sus siglas en inglés) (Figura 30d). Solo los parámetros de la separación trabecular (Tb.Sp., por sus siglas en inglés) y el número trabecular del tratamiento 100 mg kg<sup>-1</sup> de fucoidan aumentaron de manera significativa (Figura 30e y f). La densidad de conectividad entre las trabéculas (Conn.D., por sus siglas en inglés) no fue significativa para ningún grupo, lo que sugiere que el tratamiento no tuvo el efecto deseado sobre este parámetro cuando se le comparó con el control (Figura 30g). Finalmente, se concluyó que la densidad mineral ósea no presentó cambios estadísticamente significativos en ningún grupo de tratamiento, lo que sugiere que los fucoidanos no promovieron la formación ósea en los ratones ovariectomizados.



**Figura 30. Efecto de los tratamientos del fucoidan de *U. pinnatifida* en el hueso trabecular de los ratones ovariectomizados.** Se midieron los parámetros relacionados con el hueso trabecular en los fémures de los ratones ovariectomizados. a) Volumen óseo (BV), b) volumen total (TV), c) fracción del volumen óseo por volumen total (BV/TV), d) grosor trabecular (Tb. Th.), e) separación trabecular (Tb. Sp.), f) número trabecular (Tb. N.), g) densidad de conectividad (Conn. D) y h) densidad mineral ósea. ANOVA de una vía con *post test* de Dunnet. Los resultados se expresaron como gráfica de cajas con bigotes con todos los puntos. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  y ns como no significativo cuando se compararon contra el control OVX o sham .

Además, se tomaron imágenes provenientes de los escaneos por  $\mu$ CT para ejemplificar los efectos de los fucoïdanos en los huesos cortical y trabecular. Con respecto al hueso cortical, no se observaron diferencias estructurales entre los grupos de estudio ya que la BA/TA del hueso cortical permaneció similar en todos los grupos (Figura 31, panel superior). Por otro lado, en el hueso trabecular se logra ver la pérdida de las trabéculas en los grupos tratados con el fucoïdan (Figura 31, panel medio). El tratamiento con  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  de fucoïdan redujo el número de trabéculas, y este efecto se aumentó con la dosis de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  al compararse con el control OVX. Esto confirma el impacto de las dosis evaluadas de fucoïdan en el aumento de la pérdida ósea. Finalmente, se realizaron reconstrucciones tridimensionales de los fémures analizados (Figura 31, panel inferior). Se logran apreciar los efectos de los tratamientos en la estructura de los fémures y cómo una mayor dosis de fucoïdan ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) aumenta la pérdida ósea.

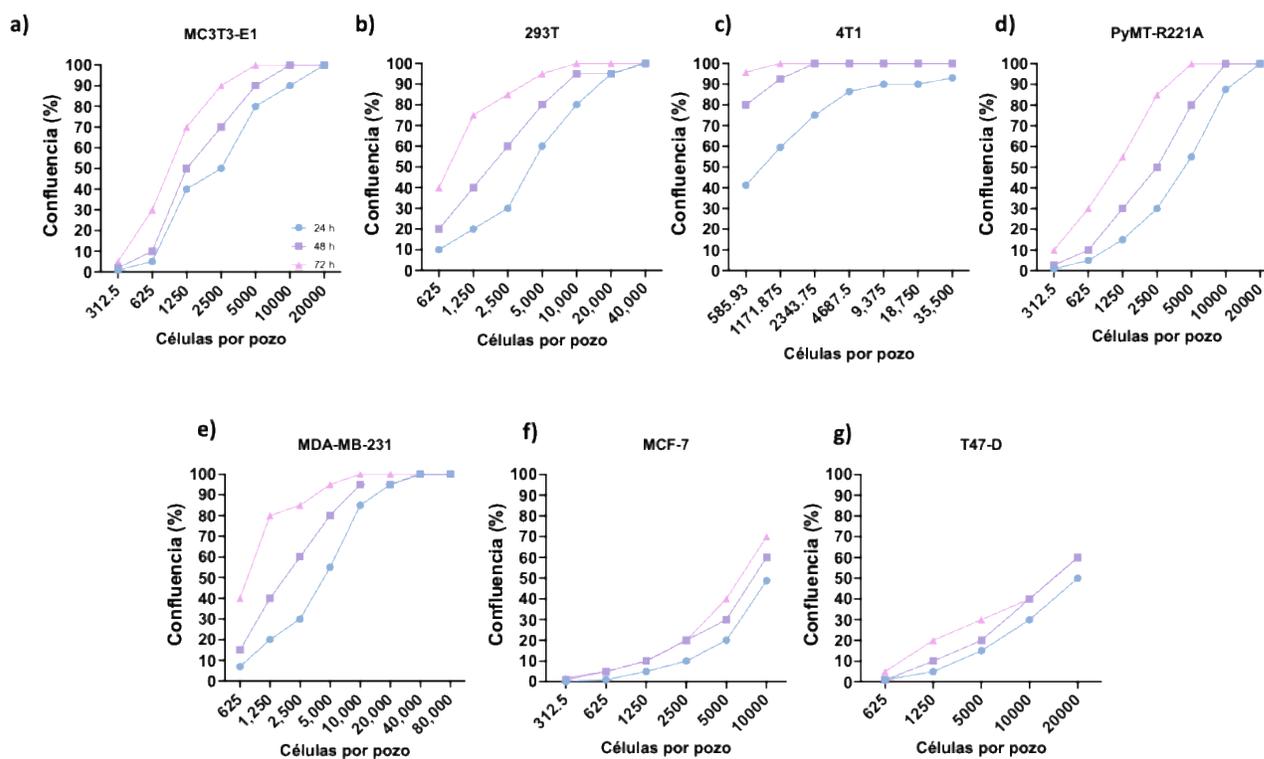


**Figura 31.** Efecto del fucoïdan extraído de *U. pinnatifida* en la pérdida ósea inducida por OVX. El panel superior muestra imágenes representativas del hueso cortical (vistas como discos blancos) de los fémures de los ratones ovariectomizados y tratados con el fucoïdan de *U. pinnatifida*. En el panel central se muestran imágenes representativas del hueso trabecular de los grupos de estudio. Nótese las áreas de pérdida ósea en los grupos OVX y de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  del fucoïdan. En el panel inferior se observan imágenes representativas de las reconstrucciones de los fémures de los grupos de estudio. Barra 1 mm.

### 3.4 Efecto de los fucoidanos en la viabilidad de células de cáncer de mama

#### 3.4.1 Curvas de crecimiento celular

Para conocer el efecto de los fucoidanos en la viabilidad celular, se realizaron curvas de crecimiento para cada línea celular. En la Figura 32, se muestran las gráficas del crecimiento celular para MC3T3-E1, 293T, 4T1, PyMT-R221A, MDA-MB-231, MCF-7 y T47-D.



**Figura 32. Curvas de crecimiento en las células de cáncer de mama y no cancerosas.** Panel de gráficas de crecimiento celular para a) MC3T3-E1, b) 293T, c) 4T1, d) PyMT-R221A, e) MDA-MB-231, f) MCF-7 y g) T47-D.

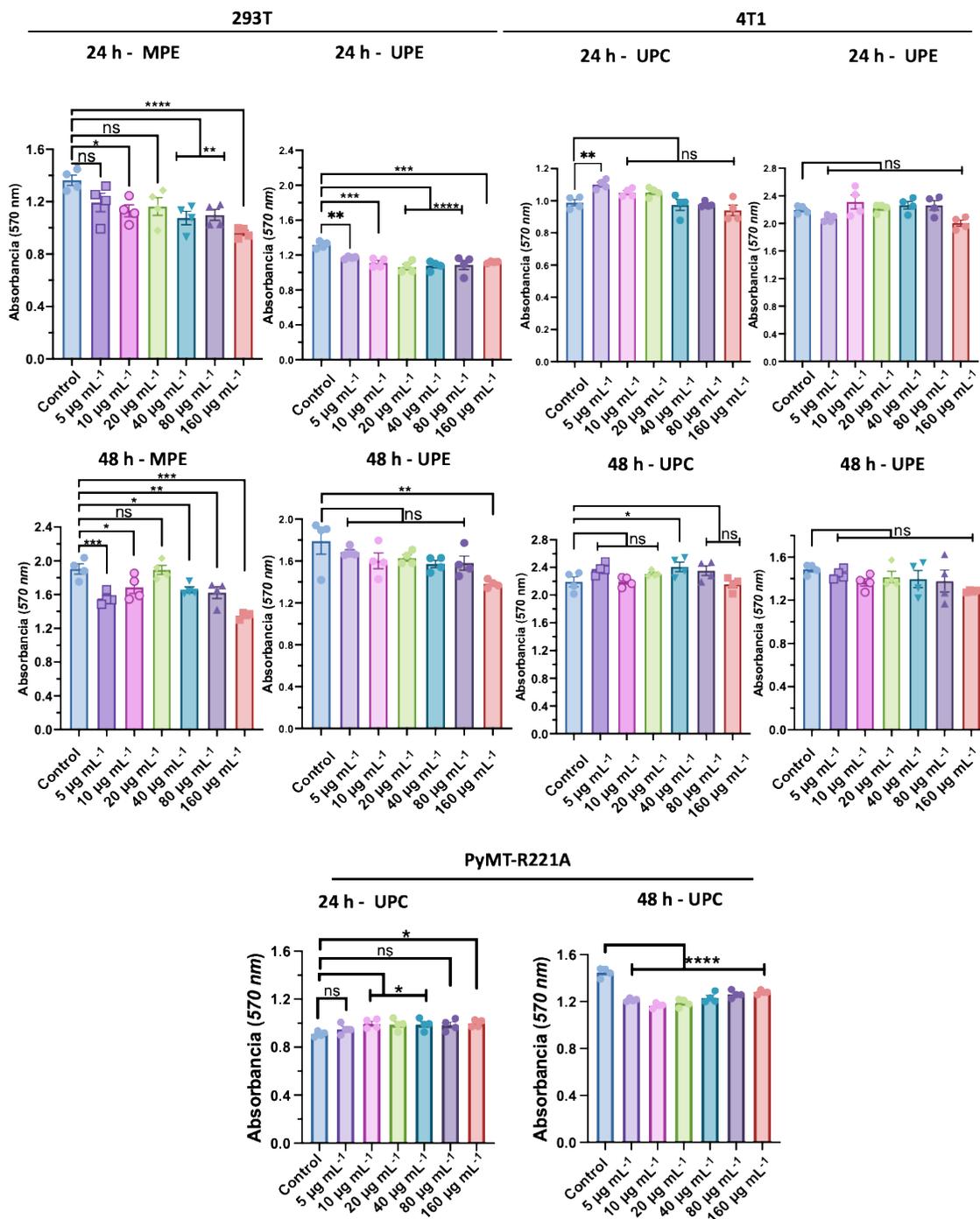
Se estableció el número de células a sembrar para los ensayos de viabilidad celular con base en dos criterios: 1) en los experimentos con 24 h de exposición a los tratamientos, la confluencia inicial debía alcanzar aproximadamente el 80 %; y 2) en los experimentos con tiempos de exposición de 48 y 72 h, las células debían iniciar con una confluencia de entre 60 y 70 %.

### 3.4.2 Efecto de los fucoidanos en células de cáncer de mama y no cancerosas

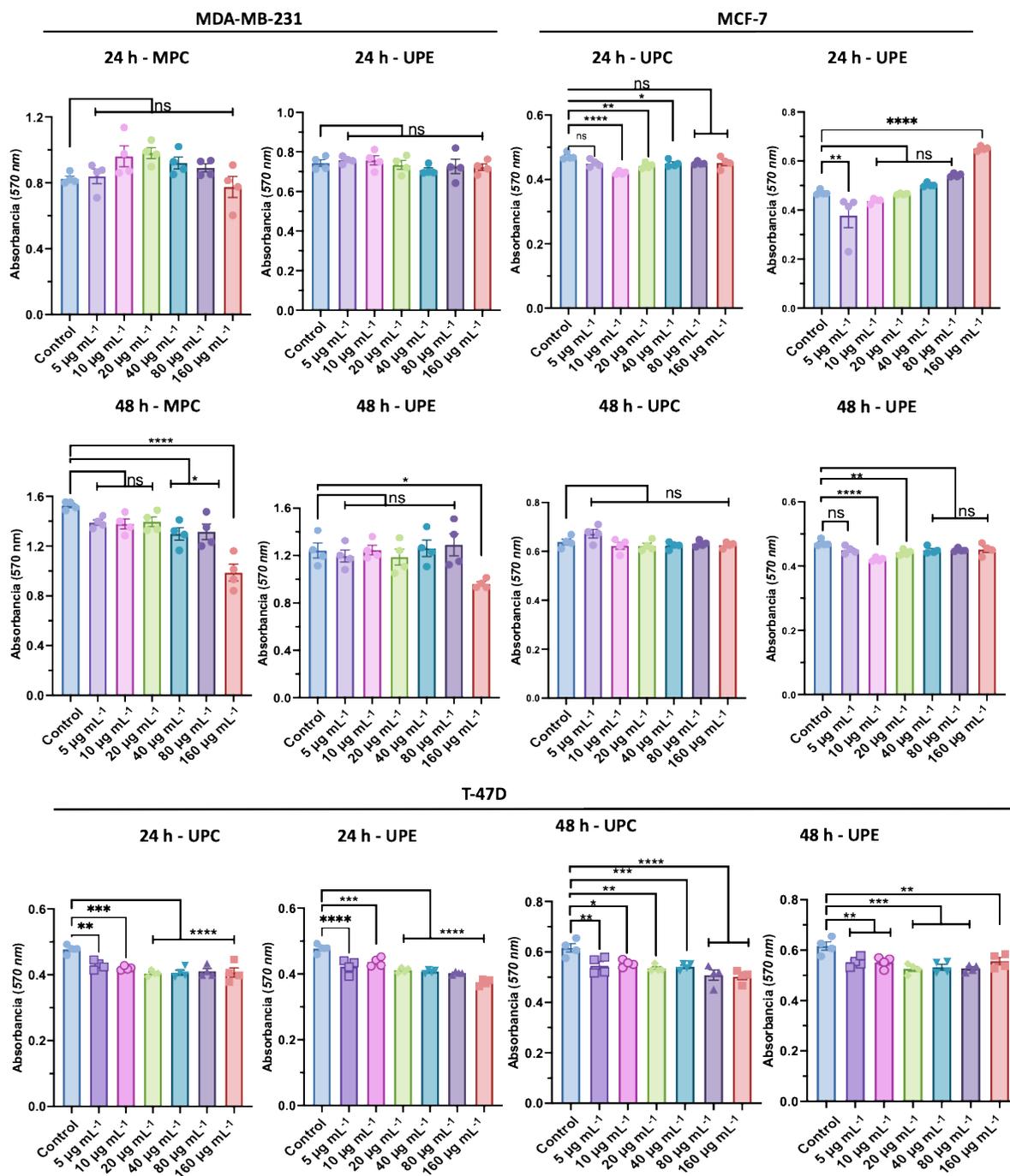
Con el objetivo de determinar el efecto de los fucoidanos en la viabilidad de las células de cáncer de mama de ratón y de humano, se realizaron ensayos de MTT. Asimismo, se utilizó una línea celular de riñón (293T) para evaluar el efecto de los fucoidanos en ausencia de cáncer. Los resultados obtenidos (Figura 33) mostraron una reducción significativa a partir de  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  del fucoidan comercial de *M. pyrifera* a partir de las 24 h de tratamiento, y este efecto se mantuvo hasta las 48 h. En el caso del fucoidan extraído de *U. pinnatifida* la viabilidad celular se inhibió a partir de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , sin embargo, este efecto se detuvo con el paso del tiempo, ya que a partir de las 48 h no hubo efecto significativo con las concentraciones de  $5\text{-}80 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Por otro lado, en las células de cáncer de mama de ratón 4T1, los fucoidanos de *U. pinnatifida* no inhibieron la viabilidad celular, sin embargo, en la línea celular PyMT-R221A sí hubo inhibición significativa posterior a 48 h del tratamiento con el fucoidan comercial de *U. pinnatifida*. Con respecto a las células de cáncer de mama humano, solo las concentraciones elevadas ( $160 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) de los fucoidanos de *M. pyrifera* y *U. pinnatifida* inhibieron la viabilidad de las células MDA-MB-231 después de 48 h de exposición (Figura 34). Las bajas concentraciones del fucoidan comercial de *U. pinnatifida* disminuyeron la viabilidad de las células MCF-7, mientras que las altas concentraciones no mostraron efecto significativo. En el caso del fucoidan extraído de *U. pinnatifida*, se observó la inhibición de la viabilidad a bajas concentraciones después de 24 h de tratamiento, y este efecto se mantuvo hasta las 48 h. Estos resultados sugieren que las diferencias en la composición química entre el fucoidan comercial y el extraído de *U. pinnatifida* se reflejan también en su actividad biológica sobre las células de cáncer de mama. Por otra parte, los fucoidanos de *U. pinnatifida* inhibieron significativamente la viabilidad de las células T-47 D, un modelo de cáncer de mama con receptores hormonales. El efecto se mantuvo hasta las 48 h evaluadas. En conclusión, los resultados sugieren que la respuesta a los tratamientos de los fucoidanos en las células de cáncer de mama depende de la concentración, del tiempo de exposición y de la línea celular evaluada.

### 3.4.3 Efecto del fucoidan de *M. pyrifera* y ácido zoledrónico en células cáncer 4T1

Con el fin de contar con una base experimental sólida antes de proceder con el modelo murino, se decidió evaluar *in vitro* el efecto del fucoidan comercial de *M. pyrifera* y del ácido zoledrónico, tanto de forma individual como en combinación. Estos resultados permitieron explorar posibles interacciones entre ambos compuestos, identificar sinergias o efectos antagónicos y, de esta manera, sustentar el diseño de los experimentos *in vivo*.



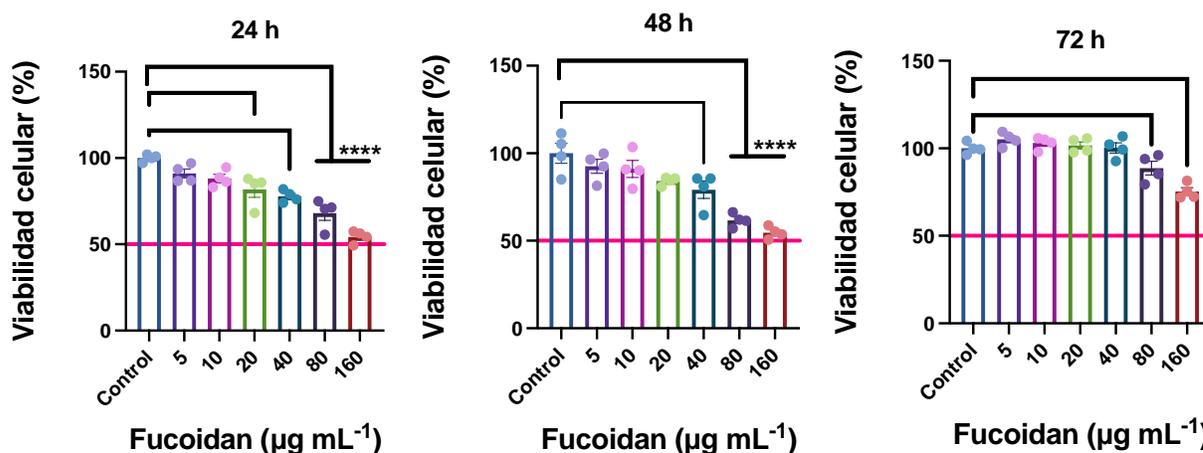
**Figura 33. Efecto de los fucoidanos en la viabilidad celular de distintas líneas celulares de cáncer de mama y no cancerosas.** Gráficas de barras que muestran el efecto de los fucoidanos en la viabilidad de diferentes células de cáncer comparadas con las células normales 293T. Los resultados se presentan como gráficas de barras con todos los valores individuales (n=4 replicados biológicos) y el error sobre la media ( $\pm$ SEM). ANOVA de una vía seguido del *post test* de Dunnett. El valor  $P < 0.05$  se consideró como estadísticamente significativo. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  y ns como no significativo.



**Figura 34. Efecto de los fucoidanos en la viabilidad celular de distintas líneas celulares de cáncer de mama humano.** Gráficas de barras que muestran el efecto de los fucoidanos en la viabilidad de diferentes células de cáncer de mama humano a 24 y 48 h de exposición. Los resultados se presentan como gráficas de barras con todos los valores individuales ( $n=4$  replicados biológicos) y el error sobre la media ( $\pm$ SEM). ANOVA de una vía seguido del *post test* de Dunnett. El valor  $p<0.05$  se consideró como estadísticamente significativo. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$  y ns como no significativo.

Primeramente, las células 4T1 se cultivaron en presencia o ausencia del fucoidan comercial y se determinó su viabilidad celular después de 24, 48 y 72 h de tratamiento mediante el ensayo colorimétrico MTT. Como

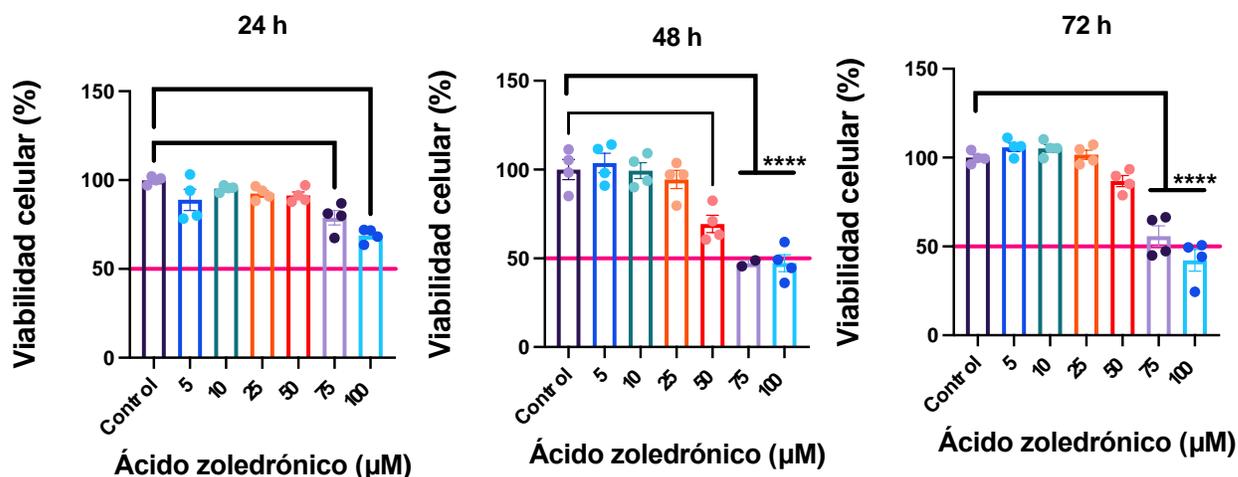
se muestra en la Figura 35, las concentraciones elevadas de fucoidan ( $\geq 40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) redujeron de manera significativa la viabilidad celular, y este efecto se mantuvo a lo largo del tiempo. No obstante, solo las concentraciones de 80 y 160  $\mu\text{g mL}^{-1}$  conservaron la inhibición después de 72 h de exposición al fucoidan de *M. pyrifera*.



**Figura 35. Efecto del fucoïdan comercial de *M. pyrifera* en la viabilidad celular de 4T1.** Las células 4T1 se cultivaron en presencia o ausencia del fucoïdan por 24, 48 y 72 h antes de la medición de la viabilidad celular. Las concentraciones de 80 y 160  $\mu\text{g mL}^{-1}$  mantuvieron su efecto inhibitorio hasta las 72 h. Cada condición se evaluó por cuadruplicado y la absorbancia se midió a 570 nm. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; y \*\*\*\* $P < 0.0001$ . ANOVA de una vía con el *post test* de Bonferroni.

Por otro lado, se evaluó el efecto del ácido zoledrónico en la viabilidad de la línea celular 4T1 (Figura 36). Las células se cultivaron en presencia o ausencia del ácido zoledrónico (5-100  $\mu\text{M}$ ) durante 24, 48 y 72 h. Los resultados indicaron que el ácido zoledrónico inhibió la viabilidad celular a partir de las 24 h con las concentraciones de 75 y 100  $\mu\text{M}$  y su efecto se mantuvo hasta las 72 h cuando inhibió más del 50% de la viabilidad celular.

En consecuencia, se procedió a determinar la concentración inhibitoria 50 ( $\text{IC}_{50}$ ), que fue de 73.62  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y 86.42  $\mu\text{g mL}^{-1}$  después de 48 y 72 h, respectivamente. Los resultados anteriores nos mostraron que el ácido zoledrónico ejerce un efecto citotóxico dependiente del tiempo y de la concentración sobre las células evaluadas.

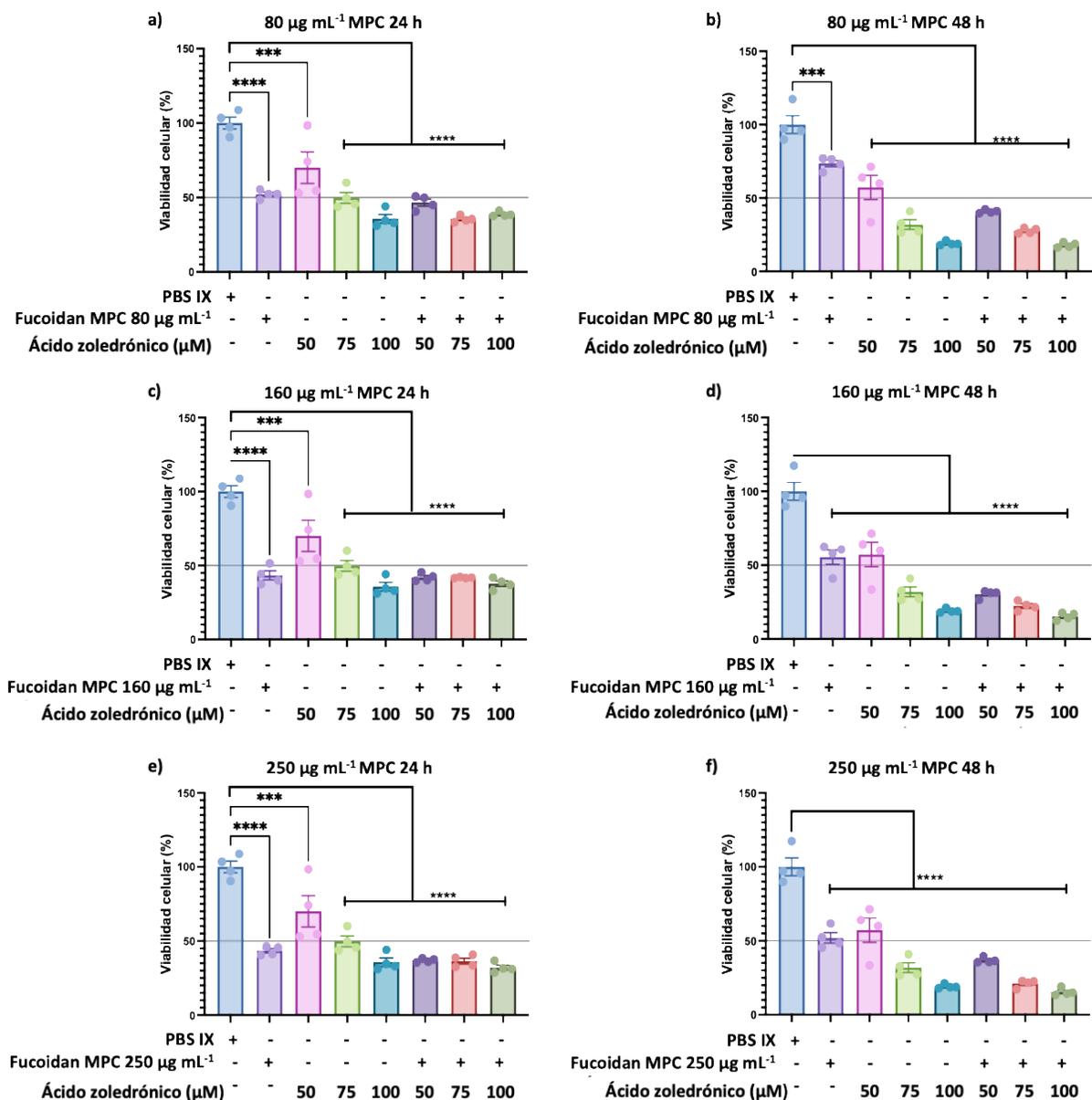


**Figura 36. Efecto del ácido zoledrónico en la viabilidad celular de 4T1.** Las concentraciones de 75 y 100 µM inhibieron más del 50 % de la viabilidad celular a partir de 48 h de exposición a los tratamientos. El efecto inhibitorio se mantuvo hasta las 72 h en la concentración de 100 µM. Cada condición se evaluó por cuadruplicado y la absorbancia se midió a 570 nm. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; y \*\*\*\* $P < 0.0001$ . ANOVA de una vía con el *post test* de Bonferroni.

#### 3.4.4 Efecto combinado del fucoídano de *M. pyrifera* y ácido zoledrónico en células cancerosas

Con base en los resultados anteriores para el fucoídano comercial y en los cálculos de la  $IC_{50}$  absoluta para el ácido zoledrónico, se realizaron ensayos de viabilidad celular para determinar su efecto combinado en las células 4T1. Se evaluaron las concentraciones de 80, 160 y 250 µg mL<sup>-1</sup> para el fucoídano comercial de *M. pyrifera* y 50, 75 y 100 µM del ácido zoledrónico. Los resultados indicaron que todos los tratamientos inhibieron significativamente la viabilidad celular, pero de manera distinta. Los tratamientos con 80 µg mL<sup>-1</sup> del fucoídano y con 50 µM del ácido zoledrónico inhibieron significativamente la viabilidad celular (50 y 30 %, respectivamente) cuando se administraron por separado. Al combinar ambos tratamientos, se observó una inhibición del 55 %, lo que sugiere un efecto independiente. Por otro lado, cuando la concentración del ácido zoledrónico se aumentó a 75 y 100 µM, se observó un efecto sinérgico que se mantuvo hasta las 48 h, con una inhibición del 64 y 61 %, respectivamente (Figura 37a y b). El tratamiento con el fucoídano comercial de *M. pyrifera* a una concentración de 80 µg mL<sup>-1</sup> redujo la viabilidad celular hasta en 45 %. Por otro lado, el ácido zoledrónico a una concentración de 50 µM disminuyó la viabilidad hasta en 75 %, lo que indica que ambos compuestos poseen actividad citotóxica. El efecto del ácido zoledrónico mostró ser dependiente de la concentración, caracterizado por la disminución progresiva de la viabilidad conforme al aumento de la concentración. Cuando se aplicaron los tratamientos combinados (160 µg mL<sup>-1</sup> del fucoídano con 75 o 100 µM del ácido zoledrónico), se observó inicialmente un efecto

independiente, ya que no se potencia la acción de ambos cuando se combinan. No obstante, a las 48 h de exposición, la viabilidad celular disminuyó de forma más pronunciada, lo que indica un efecto sinérgico en estas condiciones (Figura 37c y d).



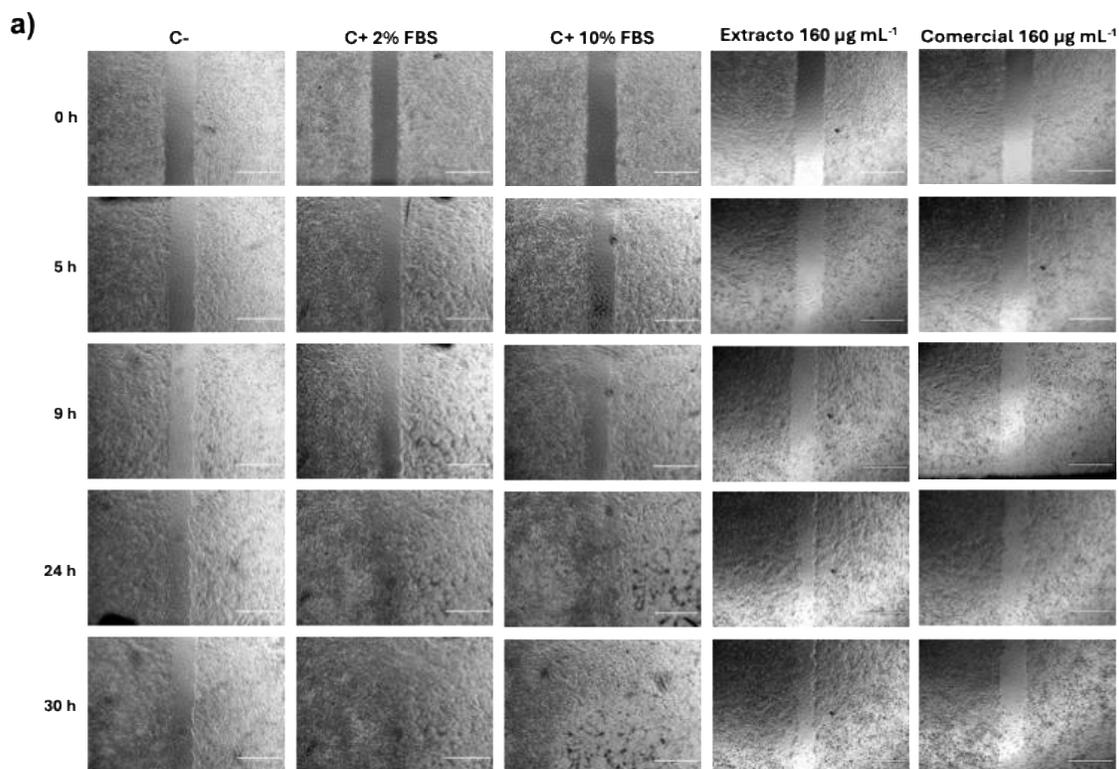
**Figura 37. Efecto combinado del fucoïdan y del ácido zoledrónico en la viabilidad de células de cáncer 4T1.** Las células 4T1 se trataron en presencia o ausencia del fucoïdan y ácido zoledrónico por 24 y 48 h. MPC = fucoïdan comercial de *M. pyrifera*. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; y \*\*\*\* $P < 0.0001$ . ANOVA de una vía con el post test de Bonferroni.

Finalmente, el tratamiento con la concentración de  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  inhibió la viabilidad de las células 4T1 en aproximadamente 55%, lo que confirma su actividad citotóxica. La combinación del fucoïdan ( $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) con  $50 \mu\text{M}$  del ácido zoledrónico mostró inicialmente un efecto independiente, aun cuando se aumentaron las concentraciones del bisfosfonato. Esto sugiere que, en las primeras horas de exposición, la interacción entre ambos compuestos no supera la suma de sus efectos individuales. Sin embargo, cuando la viabilidad celular se evaluó a las 48 h, se encontró un cambio significativo en la respuesta. Las combinaciones de fucoïdan con 50, 75 o  $100 \mu\text{M}$  del ácido zoledrónico con el fucoïdan generaron un efecto sinérgico dependiente del tiempo de exposición (Figura 37e y f). En resumen, estos resultados señalan, en primer lugar, que el efecto combinado del fucoïdan con el ácido zoledrónico sobre las células 4T1 depende del tiempo de tratamiento. En segundo lugar, se identificó una combinación particularmente eficaz:  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$  de fucoïdan con  $75 \mu\text{M}$  de ácido zoledrónico.

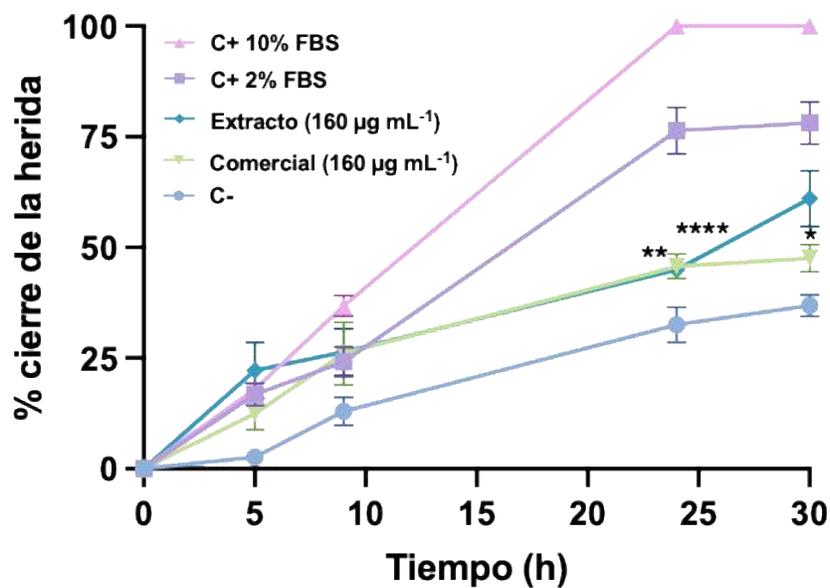
### 3.5 Efecto del fucoïdan de *U. pinnatifida* en la migración de células 4T1

La migración celular es un proceso importante para el establecimiento de las metástasis óseas, ya que las células de cáncer adquieren propiedades que les permiten migrar a órganos distantes como el hueso. A pesar de que el fucoïdan de *M. pyrifera* tuvo efecto inhibitorio en la viabilidad celular en combinación con el ácido zoledrónico, fue el fucoïdan de *U. pinnatifida* el que tuvo mayor efecto osteogénico y también mostró efecto sobre las células de cáncer de mama. Por tal motivo, se decidió evaluar el efecto del fucoïdan de *U. pinnatifida* en la migración de las células 4T1. Se realizó un ensayo de migración celular en el que se trataron células 4T1 durante hasta por 30 h con los fucoïdanos de *U. pinnatifida* y se tomaron fotografías en determinados tiempos (Figura 38).

Los resultados mostraron que los fucoïdanos de *U. pinnatifida* (el extraído y el comercial) retrasaron significativamente el cierre de la herida después de 24 h de exposición en células 4T1. Lo anterior sugiere que estos compuestos podrían interferir con las vías de señalización implicadas en la migración celular, un proceso clave dentro de la cadena metastásica del cáncer. La inhibición de la migración celular por los fucoïdanos podría asociarse a la modulación de proteínas reguladoras de la motilidad y la adhesión celular, lo que potencialmente limita la capacidad invasiva de las células tumorales.



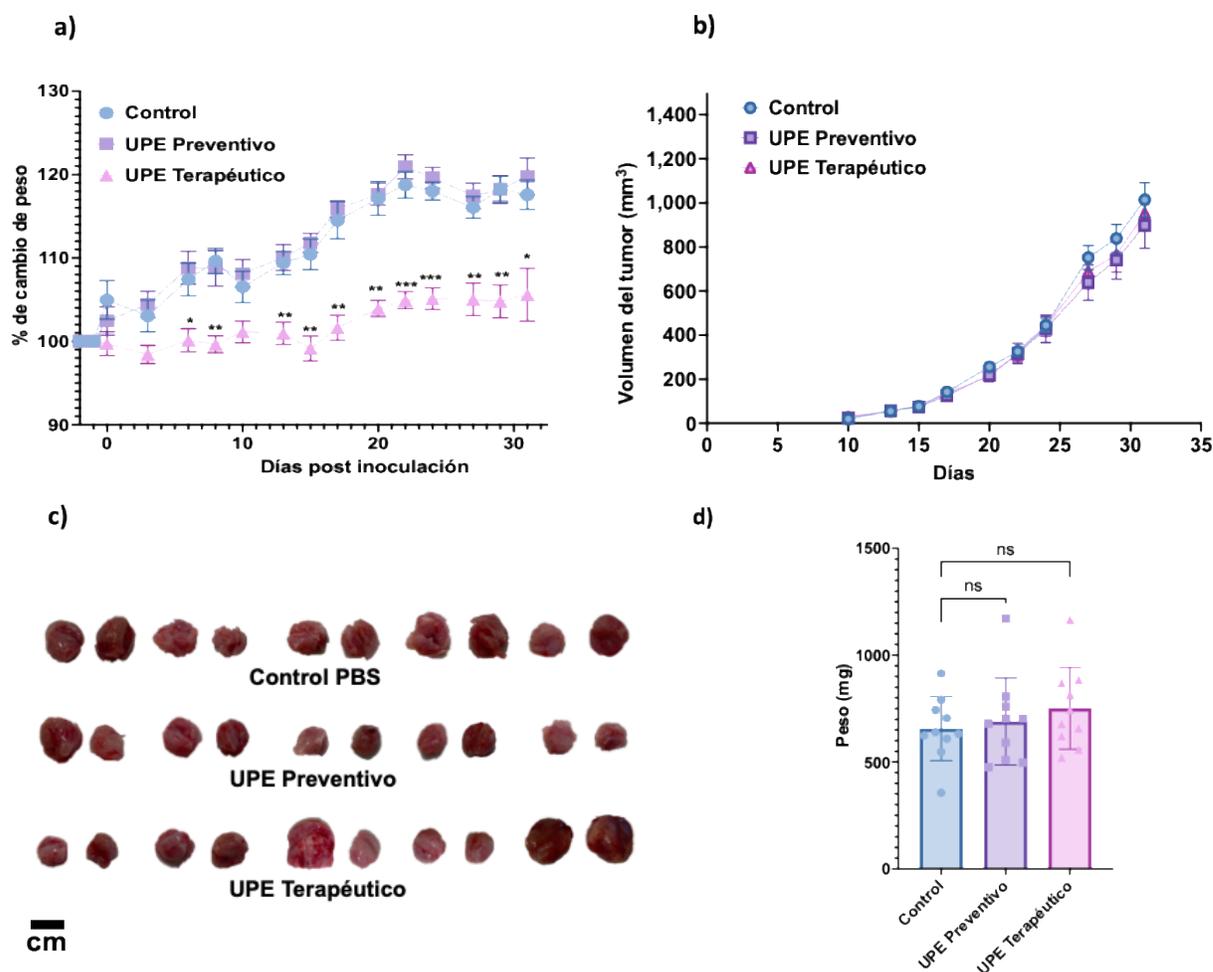
b)



**Figura 38.** El fucoidan de *U. pinnatifida* inhibe la migración de las células 4T1. a) Ensayo de la herida realizado en células 4T1 tratadas con  $160 \mu\text{g mL}^{-1}$  de los fucoidanos. Panel de imágenes representativas que muestra la trayectoria del cierre de la herida a través del tiempo. Nótese que en las últimas dos columnas no hay un cierre de la herida. b) Gráfica de líneas que muestra la cuantificación del porcentaje del cierre de la herida en diferentes tiempos. ANOVA de dos vías con post test de Tukey. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  y \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

### 3.6 Efecto del fucoïdan de *U. pinnatifida* en la formación de tumores de cáncer de mama

Para conocer el efecto del fucoïdan extraído de *U. pinnatifida* en el cáncer de mama se empleó un modelo ortotópico del cáncer de mama (ver sección 2.10). En la siguiente figura (Figura 39 a) se observa el porcentaje de aumento de peso de los ratones tratados con fucoïdan. Se puede ver que los ratones que comenzaron a tratarse nueve días después de la inoculación de las células de cáncer (modelo terapéutico) disminuyeron su peso significativamente. Sin embargo, los ratones que comenzaron a tratarse antes de la inoculación de las células de cáncer (modelo preventivo), se comportaron como el grupo control.



**Figura 39.** Efecto del tratamiento del fucoïdan de *Undaria pinnatifida* en un modelo ortotópico de cáncer de mama. a) Los ratones Balb/c se pesaron tres veces por semana durante un mes. Se determinó el porcentaje de cambio de peso de los ratones con tumores primarios. b) Volumen de los tumores. c) Morfología de los tumores al finalizar el régimen de tratamiento. d) Peso de los tumores. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  y \*\*\*\* $P < 0.0001$  cuando se compararon con el control PBS 1X. UPE: *U. pinnatifida* extracto.

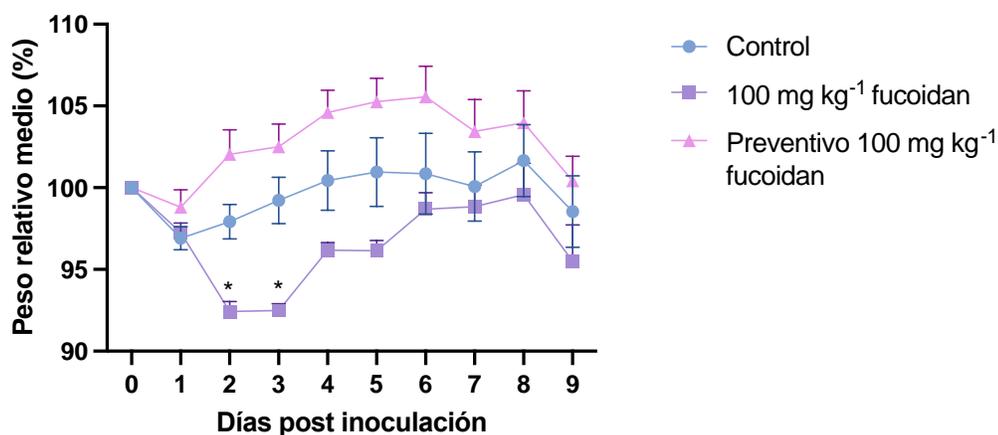
Por otro lado, los fucoidanos no disminuyeron el tamaño ni el volumen de los tumores con la dosis de 10 mg kg<sup>-1</sup> (Figura 39 b y c). Cuando se separaron y pesaron los tumores, se encontró una ligera disminución en ellos, sin embargo, el efecto del fucoidan no fue significativo. Lo anterior sugiere que los tratamientos preventivo y terapéutico no tuvieron efecto en el cáncer de mama en un estadio temprano.

### 3.7 Efecto del fucoidan comercial de *Macrocystis pyrifera* en la metástasis ósea

Para conocer el efecto del fucoidan comercial de *M. pyrifera* en la pérdida ósea inducida por la metástasis ósea, se inocularon células de cáncer 4T1 vía intracardiaca a ratones de la cepa Balb/c de 4-6 semanas de edad. Al finalizar el régimen de tratamientos, los ratones se eutanizaron, se separaron las patas y se realizaron los rayos X. Posteriormente, las patas se escanearon con un sistema para  $\mu$ CT y se les evaluó el estado de la microarquitectura ósea.

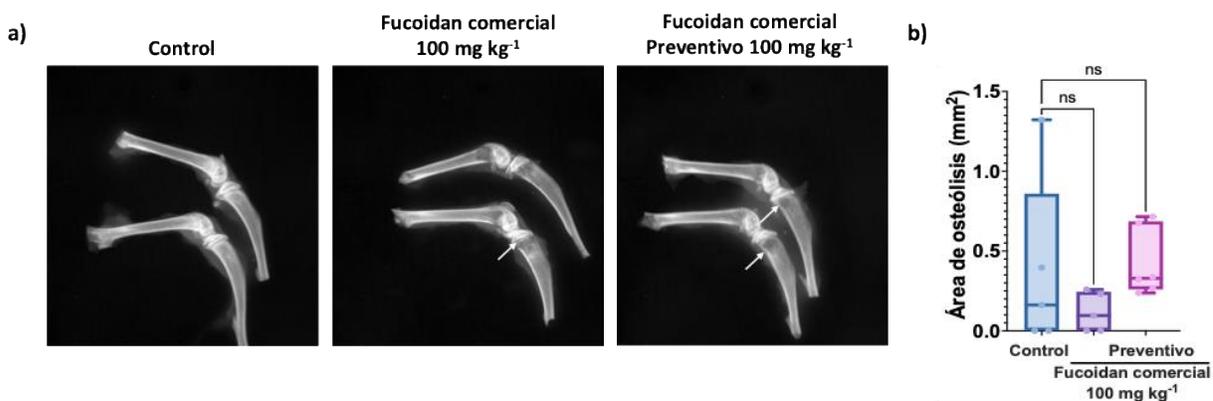
#### 3.7.1 Efecto del fucoidan de *M. pyrifera* en la metástasis ósea *in vivo*

El tratamiento que comenzó 48 h antes de la inoculación intracardiaca (preventivo) aumentó el peso de los ratones. Sin embargo, el tratamiento posterior a la inoculación lo disminuyó significativamente (Figura 40).



**Figura 40. Variación del peso de los ratones en el experimento de metástasis ósea.** Se determinó el peso relativo medio de los ratones con metástasis ósea tratados con fucoidan (100 mg kg<sup>-1</sup>) y se comparó con ratones que recibieron PBS 1X como control. Análisis de modelos mixtos con *post test* de Sidak. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001 y ns como no significativo cuando se compararon con el control PBS 1X.

Por su parte, las radiografías muestran que los tratamientos con  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  del fucoïdan aumentaron las áreas de osteólisis en comparación con el control PBS (Figura 41).



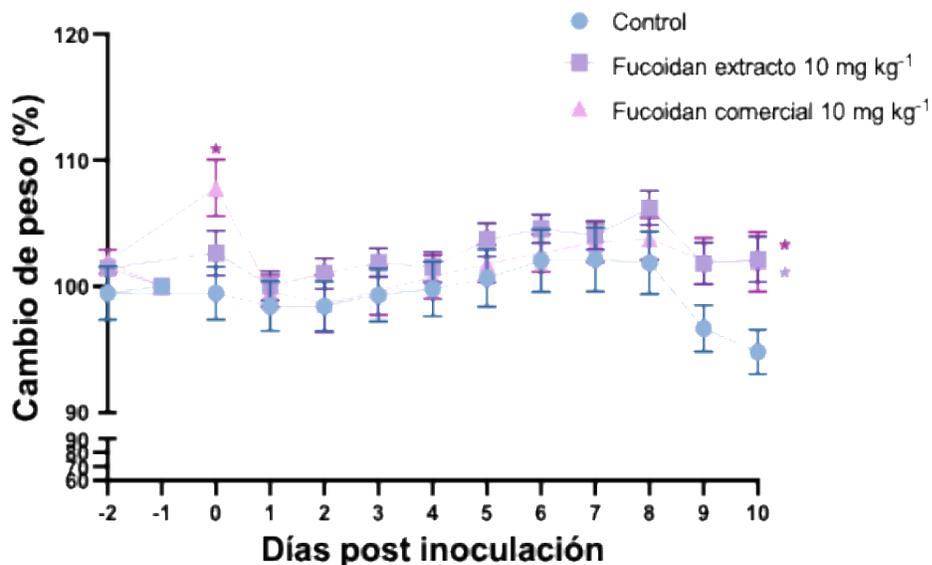
**Figura 41. Radiografías de los fémures y tibias en el tratamiento de la metástasis ósea.** a) Imágenes representativas de los ratones tratados con el fucoïdan de *U. pinnatifida*. Las flechas blancas muestran las áreas de osteólisis. b) Cuantificación de las áreas de osteólisis. ANOVA de una vía con *post test* de Dunnet. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. ns significa no significativo cuando se compararon con el control.

### 3.7.2 Efecto del fucoïdan de *U. pinnatifida* en la metástasis ósea

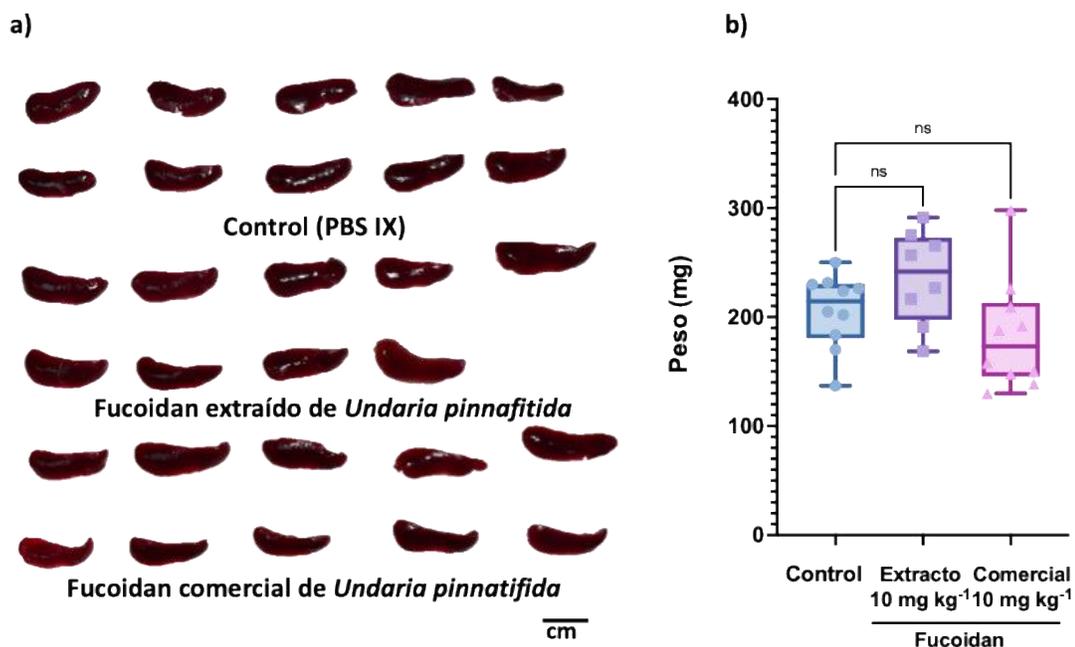
Los resultados del efecto del fucoïdan con una dosis de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  mostraron pérdida ósea. Por tal motivo, se decidió disminuir la dosis a  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  y cambiar las especies del fucoïdan. Por consiguiente, se compararon los fucoïdanos de *U. pinnatifida*. Todos los tratamientos se administraron 48 h previas y finalizaron nueve días después de la inoculación intracardiaca de las células de cáncer 4T1.

En la Figura 42 se muestra el porcentaje de cambio de peso en los ratones tratados con fucoïdan en la metástasis ósea. Se puede notar que los ratones tratados con los fucoïdanos aumentaron su peso significativamente al final de la segunda semana de tratamientos en comparación con el control.

La esplenomegalia puede ser provocada por la progresión del cáncer. En la Figura 43 se muestran la morfología (Figura 43a) y el peso de los bazo (Figura 43b) de los ratones tratados con diferentes tipos de fucoïdan. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados en comparación con el control.

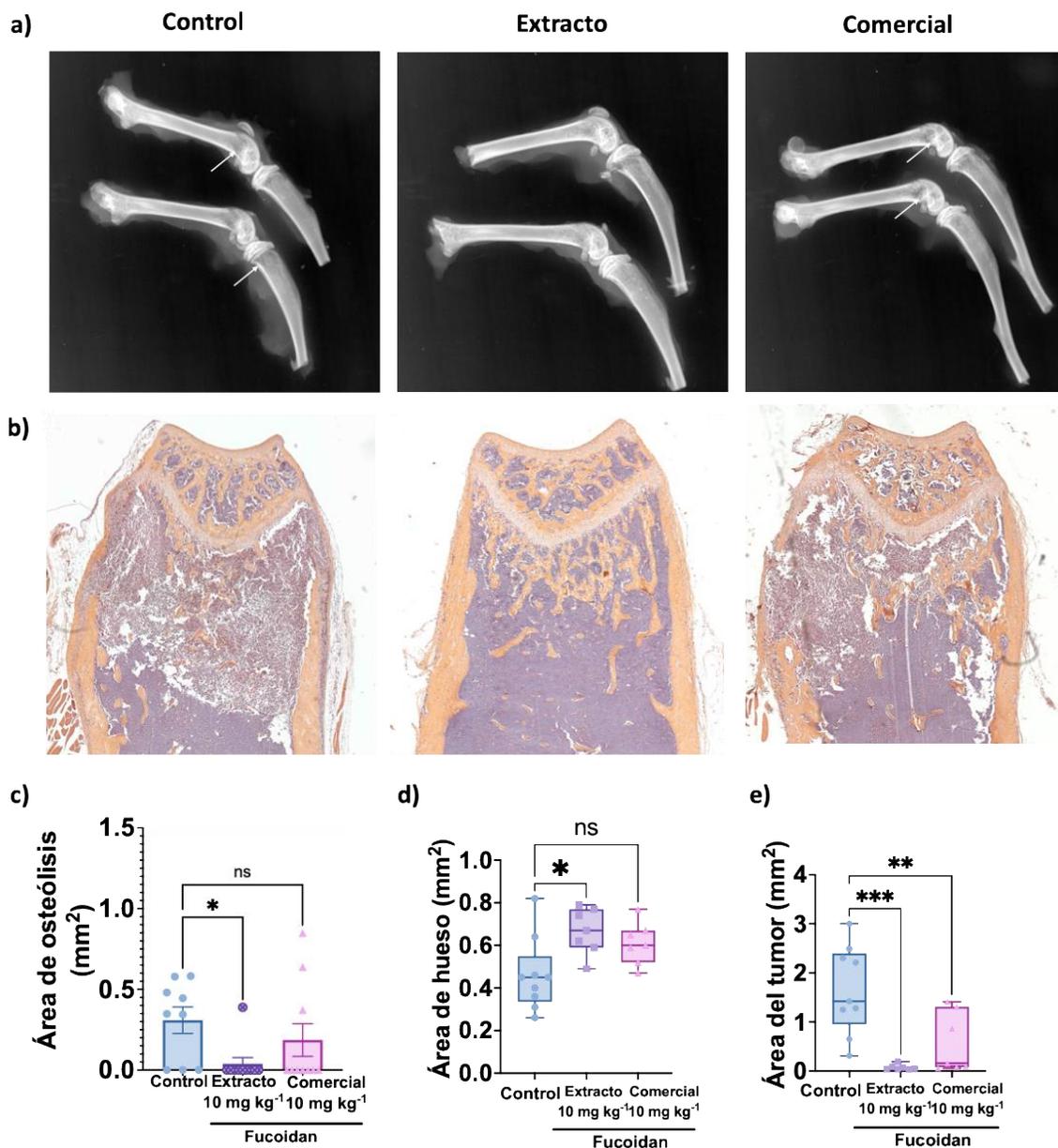


**Figura 42. Efecto del tratamiento del fucoïdan en el peso de los ratones con metástasis ósea.** Los ratones Balb/c se pesaron diariamente durante doce días. Se determinó el porcentaje del cambio de peso de los ratones con metástasis ósea. Nótese que los grupos que recibieron el tratamiento con el fucoïdan de *U. pinnatifida* evitaron la pérdida de peso significativamente. Análisis de modelos mixtos con *post test* de Sidak. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  y ns como no significativo cuando se compararon con el control PBS 1X.



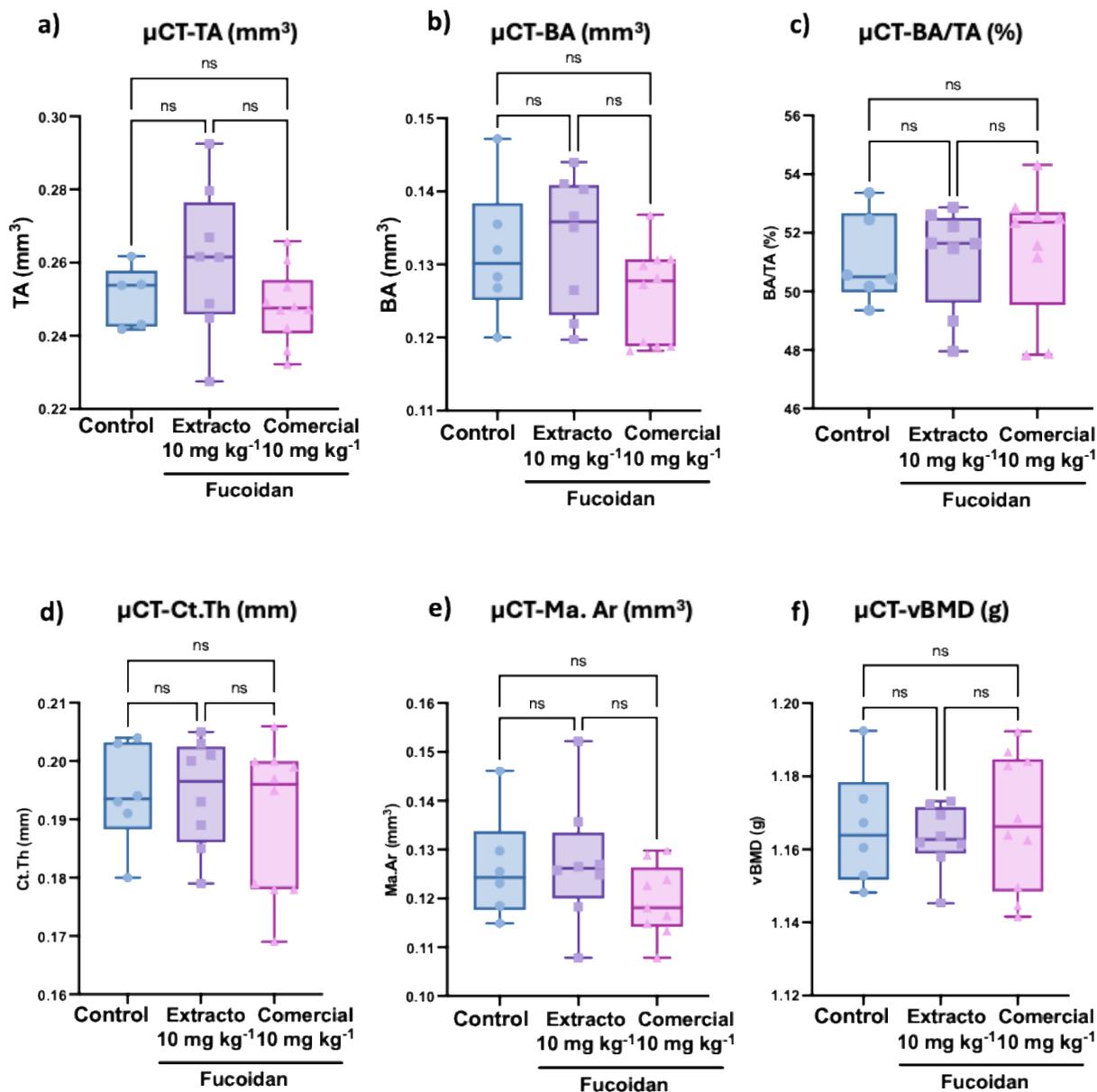
**Figura 43. Morfología y peso de los bazo de los ratones con metástasis ósea tratados con el fucoïdan de *U. pinnatifida*.** Los ratones Balb/c se trataron con dos fuentes de fucoïdan de *Undaria pinnatifida*: un extracto y uno comercial. a) Morfología de los bazo. b) Pesos de los bazo. ANOVA de una vía con *post test* de Dunnett. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.000$  y ns como no significativo cuando se compararon con el control PBS 1X.

Por otro lado, los tratamientos con ambas fuentes de fucoidan disminuyeron las lesiones osteolíticas presentes en las radiografías de los fémures y tibias (Figura 44 a y c). Los resultados de la carga tumoral confirmaron que el fucoidan extraído aumentó significativamente el área de hueso e inhibió significativamente el área del tumor, respectivamente (Figura 44 b, d y e). Con referencia al fucoidan comercial, solo se inhibió el área del tumor.



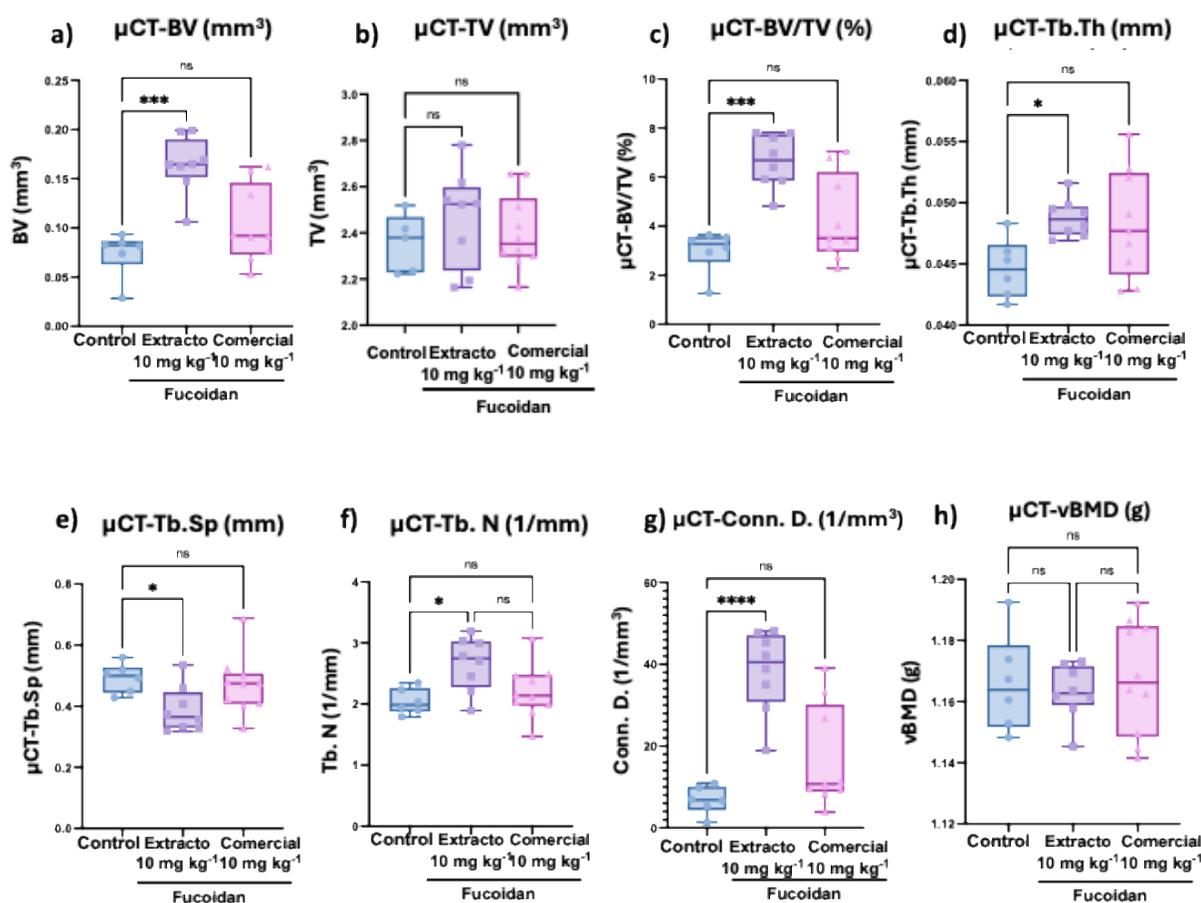
**Figura 44. Efecto del fucoidan de *U. pinnatifida* en la metástasis ósea del cáncer de mama.** a) Imágenes representativas de radiografías correspondientes a los fémures y tibias de los ratones con metástasis ósea. b) Fémures tratados con el fucoidan de *U. pinnatifida*. (c) Cuantificación de las áreas de osteólisis (d) Cuantificación del área de hueso y del tumor en los cortes histológicos. Aumento 100X. Los resultados se expresaron como gráfica de cajas con bigotes con todos los puntos. ANOVA de una vía con *post test* de Dunnet. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  y ns como no significativo cuando se compararon con el control PBS.

Los datos anteriores, se comprobaron por microtomografía computarizada. Ningún tratamiento con el fucoidan afectó significativamente algún parámetro relacionado con el hueso cortical (Figura 45 a-f). Lo anterior sugiere que el efecto podría estar limitado al hueso trabecular.



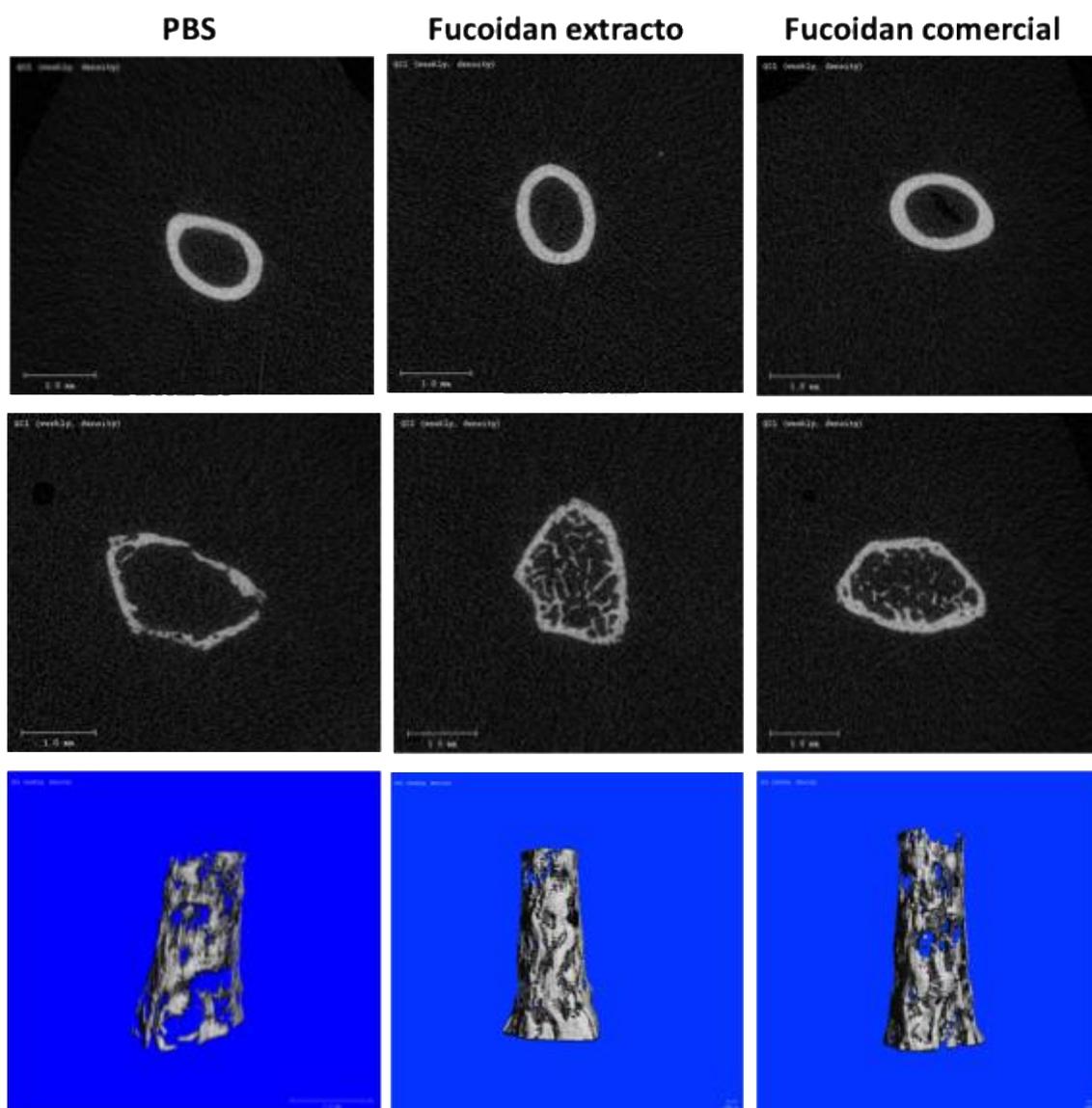
**Figura 45. Efecto de los tratamientos del fucoidan de *U. pinnatifida* en el hueso cortical de los ratones con metástasis ósea.** El hueso cortical de los fémures de los ratones con metástasis se midió y se determinó que ningún tratamiento con fucoidan alteró los parámetros del hueso cortical. a) Área total (TA), b) área de hueso (BA), c) relación del área transversal total ocupada por tejido óseo (BA/TA), d) área de médula ósea (Ma. Ar), e) grosor cortical (Ct. Th.) y f) densidad mineral ósea (BMD). ANOVA de una vía con post test de Dunnet. Los resultados se expresaron como gráfica de cajas con bigotes con todos los puntos. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  y ns como no significativo cuando se compararon con el control PBS y entre grupos.

Los resultados obtenidos sobre el hueso trabecular se encuentran en la Figura 46. El tratamiento con la dosis de  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  del fucoidan extraído aumentó significativamente el volumen óseo (BV). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en el volumen total del hueso (TV), sin embargo, cuando se realizó la evaluación de la fracción del volumen óseo por el volumen total (BV/TV), se encontraron diferencias significativas solo en el grupo con el fucoidan extracto. Los datos anteriores se confirmaron con la disminución significativa de la separación trabecular (Tb. Sp.) y el consiguiente aumento significativo en el número trabecular y en la densidad de conectividad. Finalmente, no existieron diferencias significativas en la densidad mineral ósea.



**Figura 46. Efecto de los tratamientos del fucoidan de *Undaria pinnatifida* en el hueso trabecular de los ratones con metástasis ósea.** Se midieron los parámetros relacionados con el hueso trabecular en los fémures de los ratones con metástasis ósea. a) Volumen óseo (BV), b) volumen total (TV), c) fracción del volumen óseo por volumen total (BV/TV), d) grosor trabecular (Tb. Th.), e) separación trabecular (Tb. Sp.), f) número trabecular (Tb. N.), g) densidad de conectividad (Conn. D) y h) densidad mineral ósea. ANOVA de una vía con post test de Dunnett. Los resultados se expresaron como gráfica de cajas con bigotes con todos los puntos. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  y ns como no significativo cuando se compararon contra el control PBS.

Finalmente, se tomaron imágenes provenientes de los parámetros de la  $\mu$ CT para ejemplificar los efectos de los fucoïdanos en los huesos cortical y trabecular. Con respecto al hueso cortical, no se observaron diferencias estructurales entre los grupos de estudio (Figura 47, panel superior). Por otro lado, se logró ver cómo se preservó la microarquitectura del hueso trabecular en el grupo tratado con el fucoïdan extraído (Figura 47, panel medio). Esto confirma el impacto de las dosis evaluadas de fucoïdan en el aumento de la pérdida ósea. Además, se realizaron reconstrucciones tridimensionales de los fémures analizados (Figura 47, panel inferior) donde se logran apreciar los efectos de los tratamientos en la estructura de los fémures y cómo estos afectan la estructura del hueso.



**Figura 47. Efecto del fucoïdan de *U. pinnatifida* en la pérdida ósea inducida por la metástasis ósea del cáncer de mama.** En el panel superior se muestran imágenes del hueso cortical de los fémures de los ratones con metástasis ósea. En el panel central se muestran imágenes del hueso trabecular de los grupos de estudio. El panel inferior muestra imágenes representativas de las reconstrucciones de los fémures en 3D. Barra 1 mm.

## Capítulo 4. Discusión

---

### 4.1 Obtención y caracterización de los fucoïdanos

El océano es una fuente de organismos marinos que producen compuestos bioactivos, entre ellos el fucoïdan, un polisacárido sulfatado presente en las algas pardas con diversas propiedades (Cao et al., 2021; Han et al., 2015; Kim et al., 2015; Xue et al., 2013). En este trabajo se evaluaron los efectos de los fucoïdanos aislados de las macroalgas *Macrocystis pyrifera*, *Sargassum muticum* y *Undaria pinnatifida* en la remodelación ósea así como en dos modelos de pérdida ósea *in vivo*.

La composición de los fucoïdanos depende de las especies (Usov et al., 2001) y otros residuos de monosacáridos como la galactosa, xilosa, manosa, ramnosa y ácidos urónicos pueden estar presentes en la molécula de fucoïdan. La determinación de los carbohidratos totales de los fucoïdanos fue del 41.8 % en *M. pyrifera*, 46.9 % en *S. muticum* y 35.7 % en *U. pinnatifida*. Estos resultados fueron consistentes con Lee y Hayashi (Lee et al., 2004) quienes obtuvieron 37.9 % de azúcares totales de esporófilos de *U. pinnatifida*. Un análisis realizado por Ponce and Stortz (2020) mostró resultados similares con los grupos sulfatos de *M. pyrifera*, *S. muticum* y *U. pinnatifida*. A pesar de que sus métodos de extracción fueron diferentes a los nuestros, obtuvimos resultados similares a los previamente reportados. En este aspecto, el contenido de sulfatos de *M. pyrifera* fue similar al reportado por Ahmad et al. (2022) y por Schweiger (1962) que reportaron 19.7 % en el extracto comercial despirogenado y 18.02 % en el fucoïdan crudo, respectivamente.

El análisis de FT-IR se realizó para identificar los picos característicos del fucoïdan y comparar las similitudes entre las muestras. Los resultados obtenidos mostraron grupos funcionales correspondientes a carbohidratos y sulfatos característicos del fucoïdan (Lutfia et al., 2020). En todas las muestras de fucoïdan se observaron picos cerca de  $3435\text{ cm}^{-1}$  que se atribuyen al estiramiento O-H de los grupos hidroxilo unidos al hidrógeno. Se encontraron picos cerca de  $2935\text{ cm}^{-1}$  correspondientes al estiramiento vibracional C-H del anillo de la piranosa (Gómez-Ordóñez y Rupérez, 2011). Además, se encontró una señal entre  $1620$  y  $1416\text{ cm}^{-1}$  que mostró las vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas del carboxilato ( $\text{RCOO}^-$ ), respectivamente, lo que indica la presencia de residuos de ácidos urónicos (Peniche-Pavía et al., 2024). También se encontró un grupo éster sulfato alrededor de  $1240$ - $1250\text{ cm}^{-1}$ , característico de los sulfatos totales (vibración de estiramiento S=O)(Kim et al., 2010). Se obtuvieron señales en  $840\text{ cm}^{-1}$  en todas las muestras que corresponden a la vibración de flexión de los sustituyentes sulfato unidos en la

posición del C-4 (Koh et al., 2019). Por otro lado, el análisis del FT-IR reveló diferencias en la composición química de los grupos funcionales de los tres fucoïdanos que se deben principalmente a las variaciones en su composición química y a sus grupos funcionales. El extracto de *S. muticum* mostró un mayor contenido relativo de polisacáridos sulfatados, proteínas y grupos hidroxilo, lo que sugiere que puede estar más especializado en la retención de agua y el soporte estructural. Esto se refleja en sus picos intensos en las regiones S=O, amida I y O-H. Por el contrario, el extracto de *M. pyrifera* mostró intensidades intermedias, con un pico distintivo en la región correspondiente a  $900\text{ cm}^{-1}$  lo que indica una presencia significativa de alginatos que son importantes para su integridad estructural (Yan et al., 2024). El fucoïdan de *U. pinnatifida* tuvo las bandas menos intensas, lo que indica un menor contenido de proteínas y de carbonilos (Tohamy et al., 2018). Esto sugiere que tiene menos compuestos estructurales o para la retención de agua (Venkatesan et al., 2014). Estos hallazgos sugieren que los roles funcionales y los perfiles bioquímicos de cada fucoïdan contribuyen a sus distintas actividades biológicas que pueden verse influenciadas por compuestos coextraídos como proteínas u otros azúcares.

## 4.2 Efecto de los fucoïdanos en el proceso de remodelación ósea

Los resultados indicaron que los fucoïdanos de *M. pyrifera* y *S. muticum* tuvieron un efecto inhibitorio dependiente de la concentración. Por el contrario, el fucoïdan de *U. pinnatifida* promovió la viabilidad celular con las concentraciones más bajas. Estos resultados muestran que los fucoïdanos pueden tener diferentes efectos en los procesos biológicos de acuerdo con su composición química, peso molecular, concentración o línea celular (Morya et al., 2012; Santhanam et al., 2022). Por ejemplo, el fucoïdan de bajo peso molecular (cerca de 45 kDa) extraído del del género de *Sargassum* disminuyó la viabilidad de los queratinocitos HaCaT y de los fibroblastos humanos que inducen inflamación en la piel (Fernando et al., 2021; Kirindage et al., 2022). Por otro lado, el fucoïdan crudo de los esporófilos de *U. pinnatifida* (39.24 % de fucosa y 15 % de sulfatos) se relacionó con la inhibición de células no tumorales como los fibroblastos dérmicos, las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y las células epiteliales renales humanas (HEK293) (Mak et al., 2014). Esta variabilidad propone que las propiedades específicas de los fucoïdanos deben ser consideradas cuando se explore su potencial terapéutico.

Para la evaluación de la osteoblastogénesis, observamos un aumento dependiente de la concentración en los depósitos de calcio, como lo demuestra la tinción con rojo de alizarina S. Estos resultados fueron consistentes entre los tres fucoïdanos, pero el fucoïdano de *U. pinnatifida* fue el más eficaz. Si bien las concentraciones elevadas de los fucoïdanos inhibieron la viabilidad de las células MC3T3-E1, su exposición

prolongada favoreció un aumento significativo en la depositación de calcio durante la osteoblastogénesis. Los estudios previos respaldan estos resultados al demostrar que el fucoídano aislado de *Sargassum fusiforme* promueve la diferenciación de osteoblastos, la formación de nódulos minerales óseos en las células MC3T3-E1 y reduce la pérdida ósea causada por la privación de estrógenos *in vivo* (Yizhong et al., 2024). Además, la modulación del fucoídano de *Sargassum hemiphyllum* en la actividad osteoblástica se ha evaluado en preosteoblastos derivados de la línea celular 7F2 donde se obtuvo un aumento en la secreción de osteocalcina y de fosfatasa alcalina (Hwang et al., 2016). Varios estudios que utilizan células madre mesenquimales humanas o células estromales derivadas de tejido adiposo humano (hASC) han reportado respuestas anabólicas similares en las que el fucoídano favoreció la diferenciación osteogénica a través de las vías de señalización BMP2-Smad1/5/8, ERK y JNK, ya que aumentó la actividad de ALP y la depositación de calcio *in vitro* (Kim et al., 2015; Pereira et al., 2014). Curiosamente, otros artículos han descrito efectos inhibitorios. Ohmes descubrió que los fucoídanos de alto peso molecular (110-800 kDa) de *Fucus distichus* (fucosa: 87.8 % y sulfatos: 38.7 %) en sistemas de co-cultivo de células endoteliales primarias y de células similares a osteoblastos influyen negativamente en los procesos angiogénicos y osteogénicos. Este efecto fue más intenso con extractos más puros (Ohmes et al., 2020). Estos hallazgos sugieren que no solo la fuente celular, sino también la purificación del fucoídano, desempeñan un papel fundamental en la determinación de su bioactividad. Además, el efecto anabólico de los fucoídanos en los tejidos puede atribuirse al grado y posición de los grupos sulfatos, ya que las fracciones altamente sulfatadas de fucoídano han mostrado una alta estimulación de la actividad de la fosfatasa alcalina, la producción de colágeno, y la depositación del calcio en los modelos de células humanas y de ratones (Hwang et al., 2016). La cantidad de grupos sulfato aumenta la carga negativa de la molécula del fucoídano y forma complejos con las proteínas que tienen su carga opuesta (Haroun-Bouhedja et al., 2000; Ramos-de-la-Peña et al., 2022). En nuestro estudio, la relación de la fucosa con los grupos sulfato reveló que solo el fucoídano extraído de *U. pinnatifida* tuvo al menos un mol de hemiéster sulfato por mol de fucosa, lo que puede explicar su efecto superior en la osteoblastogénesis y en la relación *Rankl/Opg*.

### **4.3 Efecto de los fucoídanos sobre los genes óseos, la reabsorción y la formación ósea**

Para dilucidar el efecto de los fucoídanos en los genes óseos, medimos la relación *Rankl/Opg*, un regulador clave del metabolismo óseo que equilibra la formación y la reabsorción ósea (Marcadet et al., 2022). En enfermedades relacionadas con los huesos, como la osteoporosis, un exceso de *Rankl* combinado con una

reducción de *Opg* conduce a una reabsorción ósea excesiva (De Leon-Oliva et al., 2023). Por lo tanto, mantener el equilibrio en este sistema es crucial tanto en condiciones patológicas como fisiológicas y representa un objetivo terapéutico potencial para el tratamiento de enfermedades óseas (Zhang et al., 2022). En esta investigación, la relación *Rankl/Opg* disminuyó significativamente con todos los tratamientos. Esta modulación, que varía según la concentración y la fuente de fucoïdan, reduce la actividad osteoclástica. En este contexto, los estudios previos han encontrado un efecto similar con los productos obtenidos a partir de la degradación de los fucoïdanos de *Sargassum thunbergii*, como el glucuronomanano, sus oligómeros y sus formas altamente sulfatadas, que pueden suprimir la diferenciación osteoclástica inducida por *Rankl* (Jin et al., 2023). De acuerdo con nuestros datos de caracterización química de los fucoïdanos de *M. pyrifera*, *S. muticum* y *U. pinnatifida*, el contenido de carbohidratos y sulfatos es crucial para sus actividades biológicas.

Específicamente, el fucoïdano de *U. pinnatifida*, con el mayor contenido de sulfato, mostró los efectos más prometedores en la reducción de la relación *Rankl/Opg*, lo cual se correlaciona con la inhibición de la osteoclastogénesis y el aumento de la osteoblastogénesis. Estos datos sugieren el potencial terapéutico de los fucoïdanos; sin embargo, se requiere investigación adicional para explorar sus mecanismos precisos y sus aplicaciones clínicas.

El efecto de los fucoïdanos en la reabsorción y formación ósea se evaluó con un modelo *3D ex vivo* de calvaria. Este modelo nos permite cuantificar el efecto anabólico o catabólico de las moléculas en la formación ósea después de una semana de tratamiento (Mohammad et al., 2008). Los fucoïdanos derivados de *M. pyrifera* y *S. muticum* promovieron significativamente la formación de hueso nuevo a concentraciones más bajas; sin embargo, este efecto se inhibió a concentraciones más altas, lo que indica que su menor contenido de sulfato conduce a una actividad moduladora ósea menos potente. Un efecto similar lo describió Chen et al. (2021) con la actividad antiinflamatoria del *S. siliquosum*, ya que el aumento del grado de sulfatación aumentó el efecto antiinflamatorio, pero disminuyó la actividad antilipogénica. Lo anterior sugiere que la sulfatación juega un papel crucial en la modulación en diferentes procesos biológicos. Desde una perspectiva clínica, estos resultados son relevantes, ya que la capacidad del fucoïdan para estimular la formación y modular la reabsorción ósea lo posiciona como un candidato prometedor en el tratamiento de enfermedades óseas.

#### 4.4 Efecto de los fucoidanos en la pérdida ósea por OVX

En el presente estudio, los modelos de OVX empleados no reprodujeron los resultados obtenidos *in vitro* y *ex vivo*. En el modelo *ex vivo* de calvarias se observó un claro efecto osteogénico, en el modelo de OVX la dosis de 100 mg kg<sup>-1</sup> del fucoidan de *U. pinnatifida* exacerbó la pérdida ósea trabecular. Este hallazgo contrasta con lo descrito en estudios previos, en los que la administración de 200 y 5 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente de un fucoidan comercial, mostró efectos beneficiosos en la prevención de la pérdida ósea inducida por OVX, lo que preservó los parámetros como la densidad mineral ósea y la microarquitectura trabecular (Jin et al., 2017; Zhao et al., 2023). Estas diferencias resaltan la importancia de la heterogeneidad estructural de los fucoidanos, cuya bioactividad está determinada por su grado de sulfatación y el peso molecular.

Desde un punto de vista fisiológico, la ovariectomía genera un estado de deficiencia estrogénica que altera el proceso de remodelación ósea, lo que favorece la activación de los osteoclastos y la pérdida de trabéculas (Khosla et al., 2012). En este contexto, es posible que las altas dosis de fucoidan activen vías relacionadas con la reabsorción, lo que se reflejó en el aumento de la separación trabecular y en la disminución del número trabecular en el grupo tratado con 100 mg kg<sup>-1</sup>. Aunque previamente se ha descrito que el fucoidan puede inhibir la osteoclastogénesis a través de la modulación de la vía *Rankl/Opg* (Kim et al., 2014), los resultados obtenidos sugieren que este efecto no es uniforme y que depende de la especie de origen, la dosis empleada y el modelo experimental.

En conclusión, aunque los resultados de este modelo no evidenciaron un efecto protector del fucoidan frente a la pérdida ósea, sí aportan información respecto a la compleja interacción entre la dosis, la estructura química y las condiciones fisiológicas en los ratones.

#### 4.5 Efecto de los fucoidanos en la viabilidad de las células de cáncer de mama

La carcinogénesis es un proceso multifacético que incluye la iniciación (transformación celular), la promoción (formación de colonias) y la progresión (metástasis) de las células anormales (Barrett, 1993). En este trabajo investigamos el efecto de los fucoidanos en la viabilidad celular: un aspecto clave para el crecimiento y la diseminación de las células de cáncer. Los resultados demostraron que los fucoidanos de *M. pyrifera* y *U. pinnatifida* tienen diferentes efectos sobre la viabilidad de las células de cáncer de mama en función de la concentración, el tiempo de exposición a los tratamientos y el tipo de línea celular

analizada. En las células MCF-7 y T-47D, ambos modelos con receptores hormonales, se observó una inhibición significativa a bajas concentraciones, lo cual coincide con lo reportado por Yamasaki-Miyamoto et al. (2009) y por Vishchuk et al. (2013) cuyos fucoïdanos inhibieron la viabilidad con 10 y 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Lo anterior sugiere que la presencia de receptores de estrógeno en las células puede aumentar su sensibilidad a los fucoïdanos. En contraste, las células 4T1, que carecen de receptores de estrógeno, mostraron resistencia a los tratamientos con los fucoïdanos de *U. pinnatifida*, lo que podría deberse a diferencias en las vías de señalización asociadas con el fenotipo altamente metastásico de esta línea celular (Cao et al., 2021).

Un aspecto relevante es que el fucoïdan extraído de *U. pinnatifida* presentó efectos inhibitorios en la viabilidad celular a concentraciones menores en comparación con el fucoïdan comercial, lo que sugiere que la variación en la composición química influye directamente en su bioactividad (Yue et al., 2025). Además, la inhibición de la migración en las células 4T1 después de la exposición a los fucoïdanos de *U. pinnatifida* refuerza la idea de que estos compuestos no solo limitan la viabilidad, sino que también pueden afectar procesos clave en la metástasis como en la motilidad y la invasión celular (Lee et al., 2012).

Por otra parte, la combinación del fucoïdan comercial de *M. pyrifera* con el ácido zoledrónico mostró un efecto sinérgico dependiente del tiempo y de la concentración, con una mayor inhibición de la viabilidad celular a partir de las 48 h. Estos resultados son consistentes con lo descrito por Tsai et al. (2025) quienes demostraron que la interacción de los fucoïdanos con el ácido zoledrónico potencia la muerte celular mediante mecanismos asociados con ferroptosis (muerte celular dependiente de hierro). Estos resultados muestran el potencial de los fucoïdanos como agentes antitumorales selectivos y como adyuvantes en las terapias combinadas. No obstante, las diferencias observadas entre las líneas celulares muestran la necesidad de profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares implicados.

#### **4.6 Efectos del fucoïdan de *U. pinnatifida* en la migración celular**

A pesar de que los fucoïdanos no inhibieron la viabilidad celular en la mayoría de las líneas celulares, su efecto en la migración fue diferente. Los fucoïdanos de *U. pinnatifida* retrasaron el cierre de la herida en función del tiempo. Estos resultados pueden vincularse con la capacidad de los fucoïdanos para interferir en mecanismos de adhesión celular mediados por moléculas como las P y L- selectinas, las cuales participan activamente en la migración y extravasación de células tumorales hacia tejidos secundarios (Rouzet et al., 2011). Al unirse competitivamente a estas selectinas, el fucoïdan bloquea interacciones

críticas las células tumorales, endoteliales y plaquetas, lo que reduce tanto la velocidad de migración en ensayos *in vitro* como la capacidad de colonización metastásica *in vivo* (Borsig, 2018; Läubli y Borsig, 2010). Diversos estudios han señalado que las P y L- selectinas participan de manera activa en la migración y diseminación de las células tumorales. La P-selectina, expresada en plaquetas y células endoteliales activadas, favorece la adhesión de células cancerosas al endotelio vascular y la formación de microtrombos tumor-célula, los cuales protegen a las células de cáncer de la vigilancia inmune y facilitan la extravasación hacia otros tejidos. Por su parte, la L-selectina, presente en los leucocitos, contribuye al reclutamiento de células tumorales y a su interacción con el microambiente estromal, lo que potencia la migración y el establecimiento de la metástasis en órganos distantes. En este contexto, el fucoïdan ha sido descrito como un potente inhibidor de selectinas debido a su estructura rica en grupos sulfato, que le permite unirse competitivamente a P y L- selectinas e impedir estas interacciones (Ho et al., 2023; Wang et al., 2022).

#### **4.7 Efecto del fucoïdan de *U. pinnatifida* en la formación de tumores**

En el presente estudio, el tratamiento con el fucoïdan extraído de *U. pinnatifida* a una dosis de 10 mg kg<sup>-1</sup>, en un modelo ortotópico de cáncer de mama, no produjo la reducción significativa en el volumen de los tumores. Por otro lado, se registró una pérdida de peso significativa en el tratamiento terapéutico (una semana después de la inoculación), lo que podría indicar efectos sistémicos no deseados o un impacto metabólico del compuesto. Sin embargo, se necesitan realizar más experimentos para comprobar estas hipótesis. Nuestros resultados contrastan con Xue et al. (2013), quienes observaron que la administración intraperitoneal de 5 y 10 mg kg<sup>-1</sup> del fucoïdan comercial en ratones Balb/c inoculados con las células 4T1 redujo significativamente tanto el volumen como el peso de los tumores, además de inducir la apoptosis y disminuir la angiogénesis. De manera similar, una dosis menor de 5 mg kg<sup>-1</sup> de fucoïdan logró inhibir la formación de tumores derivados de células de colon, a través de la activación de la vía de señalización Akt y la inhibición de la vía Wnt/  $\beta$  catenina, respectivamente (Han et al., 2015; Yun et al., 2016). En un artículo de revisión propuesto por Atashrazm et al. (2015), se mostró que las variaciones en la actividad biológica del fucoïdan pueden atribuirse a las diferencias en su origen, su peso molecular, el grado de sulfatación, la dosis y el régimen de administración, lo cual podría explicar la falta de eficacia observada en este experimento.

Una posible explicación para la ausencia del efecto significativo en el modelo ortotópico puede ser la dosis utilizada, ya que si bien 10 mg kg<sup>-1</sup> ha mostrado resultados positivos en otros modelos, es posible que en este contexto no sea suficiente para alcanzar concentraciones efectivas en el sitio tumoral. Además, el

inicio tardío del tratamiento podría haber limitado la capacidad del fucoïdan para interferir en procesos clave como la angiogénesis o la viabilidad inicial del tumor, etapas en las que el fucoïdan ha demostrado mayor eficacia (Ale et al., 2011; Fitton et al., 2015).

#### **4.8 Efecto del fucoïdan comercial de *M. pyrifera* en la metástasis ósea**

Los resultados obtenidos en el modelo de metástasis ósea con células 4T1 muestran que el fucoïdan tiene diferentes efectos de acuerdo con la dosis y la fuente del fucoïdan. El tratamiento con una dosis alta del fucoïdan comercial de *M. pyrifera* ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) aumentó las áreas osteolíticas en el hueso. Estos resultados sugieren que las dosis elevadas podrían alterar la homeostasis del hueso y favorecer indirectamente la reabsorción ósea mediada por las células tumorales. Algunos artículos señalan que, aunque los fucoïdanos poseen propiedades antitumorales y antiosteoclásticas, su efecto depende de la dosis, el origen del alga y del grado de sulfatación (Ale et al., 2011; Fitton et al., 2015).

La reducción de la dosis a  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  y el cambio de la fuente del fucoïdan, modificaron los resultados. En este caso, tanto el fucoïdan comercial como el extraído disminuyeron la carga tumoral y las lesiones osteolíticas en el hueso trabecular, pero solo el fucoïdan extraído mostró un efecto osteoprotector. En particular, se observó un aumento significativo en la fracción de volumen óseo. Estos resultados son consistentes con los reportes previos que indican que el fucoïdan puede inhibir la diferenciación y actividad de los osteoclastos, al tiempo que promueve la formación del hueso trabecular mediante la modulación de vías como  $\text{NF-}\kappa\beta$  y *Rankl/Opg* (Kim et al., 2015; Kim et al., 2014).

Un aspecto relevante es que ningún tratamiento con fucoïdan modificó de manera significativa los parámetros del hueso cortical ni la densidad mineral ósea. Esto coincide con trabajos que señalan que los efectos de los fucoïdanos sobre el esqueleto se concentran principalmente en la microarquitectura trabecular debido a que esta región es más dinámica y responde más rápidamente a cambios en el remodelado óseo (Pajovich y Banerjee, 2017). La preservación de la estructura trabecular en el grupo tratado con el fucoïdan extraído sugiere un efecto protector contra la pérdida ósea asociada a la metástasis, lo cual es de gran relevancia clínica ya que el hueso trabecular es la principal localización de metástasis osteolíticas en el cáncer de mama (Weilbaecher et al., 2011).

Finalmente, estos resultados muestran que los fucoïdanos son compuestos con potencial en la investigación contra la progresión del cáncer, no solo por sus efectos directos sobre la viabilidad y

migración celular, sino también por su capacidad de modular la remodelación ósea. Aunque aún es necesario profundizar en los mecanismos específicos, los hallazgos son alentadores. El estudio de los polisacáridos sulfatados marinos como el fucoidan abre nuevas perspectivas en el desarrollo de terapias complementarias que en el futuro podrían contribuir a mejorar la calidad de vida de quienes enfrentan enfermedades de pérdida ósea.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

En este estudio se demostró que los fucoidanos aislados de las algas *M. pyrifera*, *S. muticum* y *U. pinnatifida* mostraron diferencias químicas en cuanto al grado de sulfatación y composición, lo cual determinó sus actividades biológicas tanto en el proceso de remodelación ósea como en el cáncer de mama.

En los modelos *in vitro* y *ex vivo* se observaron efectos anabólicos y antirresortivos. El fucoidan de *U. pinnatifida* demostró una capacidad superior para favorecer la diferenciación y reducir la osteoclastogénesis a través de la modulación de la relación *Rankl/Opg*. Lo anterior señala que la acción de los fucoidanos depende de la especie de origen, de la concentración utilizada y de los modelos experimentales.

En los modelos celulares de cáncer de mama, los fucoidanos demostraron efectos antiproliferativos y antimigratorios que dependieron del tipo celular y de la expresión de receptores hormonales. Además se observó un efecto potenciador en combinación con el ácido zoledrónico, lo que sugiere su potencial aplicación como agentes adyuvantes en las terapias dirigidas con el cáncer de mama y sus complicaciones en el hueso.

Por otra parte, los modelos *in vivo* mostraron respuestas contrastantes. En el modelo de ovariectomía, los tratamientos con el fucoidan de *U. pinnatifida* no lograron prevenir la pérdida ósea. Estos resultados sugieren que bajo condiciones de bajos niveles de estrógenos, los fucoidanos en las dosis utilizadas (10 y 100 mg kg<sup>-1</sup>) no alcanzan un efecto protector comparable a lo observado *in vitro*. Lo anterior sugiere explorar dosis alternativas, vías de administración distintas o combinaciones terapéuticas para potenciar su eficacia en el contexto de osteoporosis.

En el modelo de tumores ortotópicos del cáncer de mama, los fucoidanos tampoco mostraron un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento del tumor primario, aunque sí se identificaron indicios de modulación en parámetros asociados al microambiente tumoral. Esto podría implicar que, más que actuar sobre la masa tumoral, los fucoidanos ejercen sus efectos sobre las interacciones celulares y moleculares.

En el modelo de metástasis ósea se observó que la dosis de 10 mg kg<sup>-1</sup> del fucoidan de *U. pinnatifida* tuvo un efecto osteoprotector sobre la microarquitectura trabecular, aunque dicho efecto fue dependiente de la dosis. Este hallazgo es un aspecto importante dada la complejidad del escenario patológico, y sugiere

que los fucoidanos podrían desempeñar un papel diferente en la prevención de la pérdida ósea asociada a la metástasis, probablemente mediante la modulación de la actividad osteoclástica y la preservación de la microarquitectura ósea.

Finalmente, nuestro trabajo ofrece información sobre la caracterización de especies de algas que contienen compuestos bioactivos con potencial terapéutico en el contexto óseo. Los resultados obtenidos sientan las bases para que las investigaciones futuras profundicen en sus mecanismos de acción y validen sus aplicación traslacional, con la perspectiva de que los fucoidanos puedan incorporarse como alternativas seguras y efectivas dentro de las estrategias de prevención y tratamiento de la pérdida ósea y de la metástasis asociada al cáncer de mama.

## Literatura citada

- Adler, R. A. (2021). Update on Rare Adverse Events from Osteoporosis Therapy and Bisphosphonate Drug Holidays. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 50(2), 193-203. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2021.03.003>
- Ahmad, T., Ishaq, M., Karpinić, S., Park, A., Stringer, D., Singh, N., Ratanpaul, V., Wolfswinkel, K., Fitton, H., & Caruso, V. (2022). Oral *Macrocystis pyrifera* fucoidan administration exhibits anti-inflammatory and antioxidant properties and improves DSS-induced colitis in C57BL/6J mice. *Pharmaceutics*, 14(11), 1-21, 2383. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112383>
- Ale, M. T., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. (2011). Important determinants for fucoidan bioactivity: A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Marine drugs*, 9(10), 2106-2130. <https://doi.org/10.3390/md9102106>
- Almeida, M., Laurent, M. R., Dubois, V., Claessens, F., O'Brien, C. A., Bouillon, R., Vanderschueren, D., & Manolagas, S. C. (2017). Estrogens and Androgens in Skeletal Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*, 97(1), 135-187. <https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2015>
- Ansari, M. (2019). Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies. *Progress in biomaterials*, 8(4), 223-237. <https://doi.org/10.1007/s40204-019-00125-z>
- Arakil, N., Akhund, S. A., Elaasser, B., & Mohammad, K. S. (2024). Intersecting paths: unraveling the complex journey of cancer to bone metastasis. *Biomedicines*, 12(5), 1-37, 1075. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12051075>
- Asagiri, M., & Takayanagi, H. (2007). The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone*, 40(2), 251-264. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.09.023>
- Atashrazm, F., Lowenthal, R. M., Woods, G. M., Holloway, A. F., & Dickinson, J. L. (2015). Fucoidan and cancer: A multifunctional molecule with anti-tumor potential. *Marine drugs*, 13(4), 2327-2346. <https://doi.org/10.3390/md13042327>
- Bandeira, L., & Lewiecki, M. (2022). Anabolic therapy for osteoporosis: update on efficacy and safety. *Archives of endocrinology and metabolism*, 66(5), 707-716. <https://doi.org/10.20945/2359-3997000000566>
- Barrett, J. C. (1993). Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environmental health perspectives*, 100, 9-20. <https://doi.org/10.1289/ehp.931009>
- Beas-Luna, R., & Ladah, L. B. (2014). Latitudinal, seasonal, and small-scale spatial differences of the giant kelp, *Macrocystis pyrifera*, and an herbivore at their southern range limit in the northern hemisphere. *Botanica Marina*, 57(2), 73-83. <https://doi.org/10.1515/bot-2013-0114>
- Bellido, T. (2014). Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcified tissue international*, 94(1), 25-34. <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9774-y>
- Bellido, T., Plotkin, L., & Bruzzaniti, A. (2019). Chapter 3- Bone cells. In Burr, D. & Allen, M. (Eds), *Basic and applied bone biology* (pp. 37-55). Academic Press.

- Bitter, T. J., & Muir, H. M. (1962). A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical biochemistry*, 4(4), 330-334. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(62\)90095-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(62)90095-7)
- Bittkau, Dörschmann, Blümel, Tasdemir, Roider, Klettner, & Alban. (2019). Comparison of the Effects of Fucoidans on the Cell Viability of Tumor and Non-Tumor Cell Lines. *Marine Drugs*, 17(8), 1-19, 441. <https://doi.org/10.3390/md17080441>
- Bonewald, L. F. (2011). The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(2), 229-238. <https://doi.org/10.1002/jbmr.320>
- Borsig, L. (2018). Selectins in cancer immunity. *Glycobiology*, 28(9), 648-655. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx105>
- Boyle, W. J., Simonet, W. S., & Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937), 337-342. <https://doi.org/10.1038/nature01658>
- Campbell, J. P., Merkel, A. R., Masood-Campbell, S. K., Elefteriou, F., & Sterling, J. A. (2012). Models of bone metastasis. *Journal of visualized experiments*, (67), 1-6, e4260. <https://doi.org/10.3791/4260>
- Cao, L. M., Sun, Z. X., Makale, E. C., Du, G. K., Long, W. F., & Huang, H. R. (2021). Antitumor activity of fucoidan: A systematic review and meta-analysis. *Translational Cancer Research*, 10(12), 5390-5405. <https://doi.org/10.21037/tcr-21-1733>
- Cappariello, A., Maurizi, A., Veeriah, V., & Teti, A. (2014). The Great Beauty of the osteoclast. *Archives of biochemistry and biophysics*, 558, 70-78. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.06.017>
- Carson, M. A., & Clarke, S. A. (2018). Bioactive Compounds from Marine Organisms: Potential for Bone Growth and Healing. *Marine drugs*, 16(9), 1-16, 340. <https://doi.org/10.3390/md16090340>
- Castañeda, S., Gómez-Alonso, C., Graña, J., Guañabens, N., Muñoz-Torres, M., Peris, P., Naves, M., & Álvaro-Gracia, J. (2022). Posicionamiento de la Sociedad Española de Reumatología (SER) y la Sociedad Española de Investigación Ósea y Metabolismo Mineral (SEIOMM) respecto a romosozumab. *Reumatología Clínica*, 18(7), 383-386. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2021.10.001>
- Chen, C. Y., Wang, S. H., Huang, C. Y., Dong, C. D., Huang, C. Y., Chang, C. C., & Chang, J. S. (2021). Effect of molecular mass and sulfate content of fucoidan from *Sargassum siliquosum* on antioxidant, anti-lipogenesis, and anti-inflammatory activity. *Journal of bioscience and bioengineering*, 132(4), 359-364. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.06.005>
- Chin, K. Y., Ng, B. N., Rostam, M. K.I., Muhammad Fadzil, N. F. D., Raman, V., Mohammed Yunus, F., Syed Hashim, S. A., & Ekeku, S. O. (2022). A mini review on osteoporosis: from biology to pharmacological management of bone loss. *Journal of Clinical Medicine*, 11(21), 1-17, 6434. <https://doi.org/10.3390/jcm11216434>
- Coleman, R. E. (2006). Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clinical cancer research*, 12(20), 6243s-6249s. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0931>
- Coleman, R., De Boer, R., Eidtmann, H., Llombart, A., Davidson, N., Neven, P., von Minckwitz, G., Sleeboom, H. P., Forbes, J., Barrios, C., Frassoldati, A., Campbell, I., Paija, O., Martin, N., Modi, A., & Bundred, N. (2013). Zoledronic acid (zoledronate) for postmenopausal women with early breast cancer

- receiving adjuvant letrozole (ZO-FAST study): final 60-month results. *Annals of Oncology*, 24(2), 398-405. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds277>
- Craigie, J. S., & Wen, Z. C. (1984). Effects of temperature and tissue age on gel strength and composition of agar from *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae). *Canadian Journal of Botany*, 62(8), 1665-1670. <https://doi.org/10.1139/b84-224>
- Crockett, J. C., Rogers, M. J., Coxon, F. P., Hocking, L. J., & Helfrich, M. H. (2011). Bone remodelling at a glance. *Journal of cell science*, 124(7), 991-998. <https://doi.org/10.1242/jcs.063032>
- Cummings, S. R., Martin, J. S., McClung, M. R., Siris, E. S., Eastell, R., Reid, I., Delmas, P., Zoog, H., Austin, M., Wang, M. A., Kutilek, S., Adami, S., Zanchetta, J., Libanati, C., Siddhanti, S. & Christiansen, C. (2009). Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *New England Journal of Medicine*, 361(8), 756-765. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0809493>
- da Costa Reis, J., & Oliveira, M. T. (2020). Bone: functions, structure and physiology. In Belinha, J., Manzaneres-Céspedes, MC., Completo, A. (Eds.), *The Computational Mechanics of Bone Tissue: Biological Behaviour, Remodelling Algorithms and Numerical Applications* (pp. 3-43). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-37541-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-37541-6_1)
- Dallas, S. L., Prideaux, M., & Bonewald, L. F. (2013). The osteocyte: an endocrine cell... and more. *Endocrine reviews*, 34(5), 658-690. <https://doi.org/10.1210/er.2012-1026>
- De Leon-Oliva, D., Barrera-Blázquez, S., Jiménez-Álvarez, L., Fraile-Martínez, O., García-Montero, C., López-González, L., Torres-Carranza, D., García-Puente, L. M., Carranza, S. T., & Álvarez-Mon, M. Á. (2023). The RANK–RANKL–OPG system: a multifaceted regulator of homeostasis, immunity, and cancer. *Medicina*, 59(10), 1-15, 1752. <https://doi.org/10.3390/medicina59101752>
- Dische, Z. (1955). New color reactions for determination of sugars in polysaccharides. In Glick, D. (Ed.), *Methods of Biochemical Analysis* (pp. 313-358), Interscience Publishers, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470110188.ch11>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Durand, J. P., Karoubi M., Anract, P., & Goldwasser, F. (2013). Metástasis óseas: manejo multidisciplinario, conducta diagnóstica y terapéutica. *EMC-Aparato locomotor*, 46(1), 1-16. [https://doi.org/10.1016/S1286-935X\(13\)64172-6](https://doi.org/10.1016/S1286-935X(13)64172-6)
- Feng, X., & McDonald, J. M. (2011). Disorders of bone remodeling. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6(1), 121-145. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130203>
- Fernando, I. P. S., Dias, M. K. H. M., Madusanka, D. M. D., Han, E. J., Kim, M. J., Heo, S. J., Lee, K., Cheong, S. H., & Ahn, G. (2021). Low molecular weight fucoidan fraction ameliorates inflammation and deterioration of skin barrier in fine-dust stimulated keratinocytes. *International journal of biological macromolecules*, 168, 620-630. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.115>
- Fitton, J. H., Stringer, D. N., & Karpinić, S. S. (2015). Therapies from fucoidan: An update. *Marine drugs*, 13(9), 5920-5946. <https://doi.org/10.3390/md13095920>

- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed research international*, 2015(1), 1-17, 421746. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Flórez-Fernández, N., Balboa, E., & Domínguez, H. (2020). Extraction and purification of fucoidan from marine sources. In Kim, S. K. (Ed.). *Encyclopedia of marine biotechnology*, (pp. 1093-1125). John Wiley & Sons Ltd.
- Fuller, K., Chambers, T. J., & Gallagher, A. C. (1991). Heparin augments osteoclast resorption-stimulating activity in serum. *Journal of cellular physiology*, 147(2), 208-214. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041470204>
- Gasser, J. A., Green, J. R., Shen, V., Ingold, P., Rebmann, A., Bhatnagar, A. S., & Evans, D. B. (2006). A single intravenous administration of zoledronic acid prevents the bone loss and mechanical compromise induced by aromatase inhibition in rats. *Bone*, 39(4), 787-795. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.04.035>
- Gasser, J. A., & Kneissel, M. (2017). Bone physiology and biology. In Smith, S., Varela, A., & Samadfam, R. (Eds.), *Bone toxicology* (pp. 27-94). Cham: Springer International Publishing.
- Giordano, D. (2020). Bioactive Molecules from Extreme Environments. *Marine drugs*, 18(12), 1-7, 640. <https://doi.org/10.3390/md18120640>
- Gómez-Ordóñez, E., & Rupérez, P. (2011). FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. *Food hydrocolloids*, 25(6), 1514-1520. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.009>
- Grabowski, P. (2009). Physiology of bone. In Allgrove, J. & Shaw, N. (Eds.) *Endocrine Development*, (pp. 32-48). S. Karger AG.
- Han, Y. S., Lee, J. H., & Lee, S. H. (2015). Antitumor effects of fucoidan on human colon cancer cells via activation of Akt signaling. *Biomolecules & therapeutics*, 23(3), 1-8, 225. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2014.136>
- Haroun-Bouhedja, F., Ellouali, M., Sinquin, C., & Boisson-Vidal, C. (2000). Relationship between sulfate groups and biological activities of fucans. *Thrombosis research*, 100(5), 453-459. [https://doi.org/10.1016/s0049-3848\(00\)00338-8](https://doi.org/10.1016/s0049-3848(00)00338-8)
- Harrison, M., O'Brien, A., Adams, L., Cowin, G., Ruitenberg, M. J., Sengul, G., & Watson, C. (2013). Vertebral landmarks for the identification of spinal cord segments in the mouse. *Neuroimage*, 68, 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.11.048>
- Hernández-Garibay, E., Zertuche-González, J. A., & Pacheco-Ruiz, I. (2019). Sulfated polysaccharides (fucoidan) from the brown seaweed *Silvetia compressa* (J. Agardh) E. Serrão, T.O. Cho, S.M. Boo & Brawley. *Journal of Applied Phycology*, 31, 3841-3847. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01870-1>
- Hildebrand, G., Patel, P., & Kasi, A. (2024). Denosumab. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535388/>

- Ho, T. L., Mutalik, C., Rethi, L., Nguyen, H. N. T., Jheng, P. R., Wong, C. C., Yang, T. S., Nguyen, T. T., Mansel, B. W., Wang, C. A. & Chuang, E. Y. (2023). Cancer-targeted fucoidan-iron oxide nanoparticles for synergistic chemotherapy/chemodynamic theranostics through amplification of P-selectin and oxidative stress. *International Journal of Biological Macromolecules*, 235, 123821. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123821>
- Huang, H., Guo, F., Deng, X., Yan, M., Wang, D., Sun, Z., Yuan, C., & Zhou, Q. (2022). Modulation of T Cell responses by fucoidan to inhibit osteogenesis. *Frontiers in Immunology*, 13, 1-10, 911390. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.911390>
- Hwang, P. A., Hung, Y. L., Phan, N. N., Hieu, B. T. N., Chang, P. M., Li, K. L., & Lin, Y. C. (2016). The *in vitro* and *in vivo* effects of the low molecular weight fucoidan on the bone osteogenic differentiation properties. *Cytotechnology*, 68(4), 1349-1359. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9894-5>
- Jin, W., Chen, F., Fang, Q., Mao, G., & Bao, Y. (2023). Oligosaccharides from *Sargassum thunbergii* inhibit osteoclast differentiation via regulation of IRF-8 signaling. *Experimental Gerontology*, 172, 1-10, 112057. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2022.112057>
- Jin, X., Zhu, L., Li, X., Jia, J., Zhang, Y., Sun, X., Ma, J., Liu, Z., & Ma, X. (2017). Low-molecular weight fucoidan inhibits the differentiation of osteoclasts and reduces osteoporosis in ovariectomized rats. *Molecular Medicine Reports*, 15(2), 890-898. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.6062>
- Kang, H. K., Seo, C. H., & Park, Y. (2015). The effects of marine carbohydrates and glycosylated compounds on human health. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 1-39, 6018-6056. <https://doi.org/10.3390/ijms16036018>
- Kanis, J. A., Melton, L. J., Christiansen, C., Johnston, C., & Khaltaev, N. (1994). The diagnosis of osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 9(8), 1137-1141. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650090802>
- Khosla, S., Melton III, L. J., & Riggs, B. L. (2011). The unitary model for estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis: Is a revision needed? *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(3), 441-451. <https://doi.org/10.1002/jbmr.262>
- Khosla, S., Oursler, M. J., & Monroe, D. G. (2012). Estrogen and the skeleton. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(11), 576-581. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.03.008>
- Kim, B. S., Kang, H. J., Park, J. Y., & Lee, J. (2015). Fucoidan promotes osteoblast differentiation via JNK-and ERK-dependent BMP2-Smad 1/5/8 signaling in human mesenchymal stem cells. *Experimental & molecular medicine*, 47(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/emm.2014.95>
- Kim, S. W., Lu, Y., Williams, E. A., Lai, F., Lee, J. Y., Enishi, T., Balani, D., Ominsky, M., Ke, H. Z., & Kronenberg, H. (2017). Sclerostin antibody administration converts bone lining cells into active osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, 32(5), 892-901. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3038>
- Kim, W. J., Koo, Y. K., Jung, M. K., Moon, H. R., Kim, S. M., Synytsya, A., Yun-Choi, H. S., Kim, Y. S., Park, J. K., & Park, Y. I. (2010). Anticoagulating activities of low-molecular weight fuco-oligosaccharides prepared by enzymatic digestion of fucoidan from the sporophyll of Korean *Undaria pinnatifida*. *Archives of Pharmacal Research*, 33, 125-131. <https://doi.org/10.1007/s12272-010-2234-6>

- Kim, Y. W., Baek, S. H., Lee, S. H., Kim, T. H., & Kim, S. Y. (2014). Fucoidan, a Sulfated Polysaccharide, Inhibits Osteoclast Differentiation and Function by Modulating RANKL Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(10), 18840-18855. <https://doi.org/10.3390/ijms151018840>
- Kirindage, K. G. I. S., Jayasinghe, A. M. K., Cho, N., Cho, S. H., Yoo, H. M., Fernando, I. P. S., & Ahn, G. (2022). Fine-Dust-Induced skin inflammation: low-Molecular-Weight fucoidan protects keratinocytes and underlying fibroblasts in an integrated culture model. *Marine drugs*, *21*(1), 1-18, 12. <https://doi.org/10.3390/md21010012>
- Koh, H. S. A., Lu, J., & Zhou, W. (2019). Structure characterization and antioxidant activity of fucoidan isolated from *Undaria pinnatifida* grown in New Zealand. *Carbohydrate polymers*, *212*, 178-185. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.040>
- Kylin, H. (1918). Weitere Beiträge zur Biochemie der Meeresalgen. *Biological Chemistry*, *101*(5-6), 236-247. <https://doi.org/10.1515/bchm2.1918.101.5-6.236>
- Landeros-Juárez, J. S., Iduarte-Frias, B., Hernández-Garibay, E., Félix, E.O., Beas-Luna, R., Nomura, M., Fournier, P. & Juárez, P. (2025). Comparison of *in vitro* and *ex vivo* osteogenic efficacy of fucoidans extracted from three brown macroalgae of the Pacific Ocean. *Bone*, *200*, 1-13, 117606. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2025.117606>
- Larsen, B. (1978). Brown seaweeds: analysis of ash, fiber, iodine and mannitol. In Hellebust, J. A. & Craigie J. S. (Eds.), *Handbook of phycological Methods*. Cambridge University Press.
- Läubli, H., & Borsig, L. (2010). Selectins promote tumor metastasis. *Seminars in cancer biology*, *20*(3), 169-177. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.04.005>
- Lee, H., Kim, J. S., & Kim, E. (2012). Fucoidan from seaweed *Fucus vesiculosus* inhibits migration and invasion of human lung cancer cell via PI3K-Akt-mTOR pathways. *PloS one*, *7*(11), 1-10, e50624. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050624>
- Lee, J. B., Hayashi, K., Hashimoto, M., Nakano, T., & Hayashi, T. (2004). Novel antiviral fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* (Mekabu). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *52*(9), 1091-1094. <https://doi.org/10.1248/cpb.52.1091>
- Li, B., Lu, F., Wei, X., & Zhao, R. (2008). Fucoidan: structure and bioactivity. *Molecules*, *13*(8), 1671-1695. <https://doi.org/10.3390/molecules13081671>
- Lin, Y., Qi, X., Liu, H., Xue, K., Xu, S., & Tian, Z. (2020). The anti-cancer effects of fucoidan: A review of both *in vivo* and *in vitro* investigations. *Cancer Cell International*, *20*(1), 1-14, 154. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01233-8>
- Lipton, A., Uzzo, R., Amato, R. J., Ellis, G. K., Hakimian, B., Roodman, G. D., & Smith, M. R. (2009). The science and practice of bone health in oncology: managing bone loss and metastasis in patients with solid tumors. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, *7*(7), 1-29. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2009.0080>
- Lu, S. H., Hsia, Y. J., Shih, K. C., & Chou, T. C. (2019). Fucoidan prevents RANKL-stimulated osteoclastogenesis and LPS-induced inflammatory bone loss via regulation of Akt/GSK3 $\beta$ /PTEN/NFATc1 signaling pathway and calcineurin activity. *Marine drugs*, *17*(6), 1-13 345. <https://doi.org/10.3390/md17060345>

- Lutfia, F. N. L., Isnansetyo, A., Susidarti, R. A., & Nursid, M. (2020). Chemical composition diversity of fucoidans isolated from three tropical brown seaweeds (Phaeophyceae) species. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(7), 3170-3177. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210739>
- Mak, W., Wang, S. K., Liu, T., Hamid, N., Li, Y., Lu, J., & White, W. L. (2014). Anti-proliferation potential and content of fucoidan extracted from sporophyll of New Zealand *Undaria pinnatifida*. *Frontiers in nutrition*, 1, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2014.00009>
- Marcadet, L., Bouredji, Z., Argaw, A., & Frenette, J. (2022). The roles of RANK/RANKL/OPG in cardiac, skeletal, and smooth muscles in health and disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 1-9, 903657. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.903657>
- Martins, A., Vieira, H., Gaspar, H., & Santos, S. (2014). Marketed Marine Natural Products in the Pharmaceutical and Cosmeceutical Industries: Tips for Success. *Marine drugs*, 12(2), 1066-1101. <https://doi.org/10.3390/md12021066>
- Mesny, E., Martz, N., Stacoffe, N., Clarençon, F., Louis, M., Mansouri, N., Sirveaux, F., Thureau, S., & Faivre, J. C. (2025). State-of-the-art of multidisciplinary approach of bone metastasis-directed therapy: review and challenging questions for preparation of a GEMO practice guidelines. *Cancer and Metastasis Reviews*, 44(2), 1-14. <https://doi.org/10.1007/s10555-025-10262-6>
- Mohammad, K. S., Chirgwin, J. M., & Guise, T. A. (2008). Assessing new bone formation in neonatal calvarial organ cultures. In Westendorf, J. J (Ed.), *Osteoporosis: Methods and Protocols* (pp. 37-50), Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-104-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-104-8_3)
- Morya, V., Kim, J., & Kim, E. K. (2012). Algal fucoidan: Structural and size-dependent bioactivities and their perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 93, 71-82. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3666-8>
- Nielsen, M. S., Mikkelsen, M. D., Ptak, S. H., Hejbøl, E. K., Ohmes, J., Thi, T. N., Nguyen Ha, V. T., Fretté, X., Fuchs, S., & Meyer, A. (2022). Efficacy of marine bioactive compound fucoidan for bone regeneration and implant fixation in sheep. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 110(4), 861-872. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37334>
- Ohmes, J., Xiao, Y., Wang, F., Mikkelsen, M. D., Nguyen, T. T., Schmidt, H., Seekamp, A., Meyer, A., & Fuchs, S. (2020). Effect of enzymatically extracted fucoidans on angiogenesis and osteogenesis in primary cell culture systems mimicking bone tissue environment. *Marine drugs*, 18(9), 1-18, 481. <https://doi.org/10.3390/md18090481>
- Oryan, A., & Sahviah, S. (2021). Effects of bisphosphonates on osteoporosis: Focus on zoledronate. *Life Sciences*, 264, 1-28, 118681. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118681>
- Pajovich, H. T., & Banerjee, I. A. (2017). Biomineralization of fucoidan-peptide blends and their potential applications in bone tissue regeneration. *Journal of Functional Biomaterials*, 8(3), 1-22, 41. <https://doi.org/10.3390/jfb8030041>
- Pang, L., Gan, C., Xu, J., Jia, Y., Chai, J., Huang, R., Li, A., Ge, H., Yu, S., & Cheng, H. (2022). Bone metastasis of breast cancer: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Cancers*, 14(23), 1-29, 5727. <https://doi.org/10.3390/cancers14235727>

- Patankar, M., Oehninger, S., Barnett, T., Williams, R., & Clark, G. (1993). A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *Journal of Biological Chemistry*, 268(29), 21770-21776. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)80609-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)80609-7)
- Pavy-Le Traon, A., Heer, M., Narici, M., Rittweger, J., & Vernikos, J. (2007). From space to Earth: advances in human physiology from 20 years of bed rest studies (1986–2006). *European Journal of Applied Physiology*, 101(2), 143-194. <https://doi.org/10.1007/s00421-007-0474-z>
- Peniche-Pavía, H., Tzuc-Naveda, J., Rosado-Espinosa, L., & Collí-Dulá, R. C. (2024). FTIR-ATR chemometric analysis on pelagic *Sargassum* reveals chemical composition changes induced by cold sample transportation and sunlight radiation. *Journal of Applied Phycology*, 36(3), 1391-1405. <https://doi.org/10.1007/s10811-023-03167-w>
- Pereira, J., Portron, S., Dizier, B., Vinatier, C., Masson, M., Sourice, S., Galy-Fauroux, I., Corre, P., Weiss, P., & Fischer, A.-M. (2014). The *in vitro* and *in vivo* effects of a low-molecular-weight fucoidan on the osteogenic capacity of human adipose-derived stromal cells. *Tissue Engineering Part A*, 20(1-2), 275-284. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2013.0028>
- Ponce, N. M., & Stortz, C. A. (2020). A comprehensive and comparative analysis of the fucoidan compositional data across the Phaeophyceae. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1-25, 556312. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.556312>
- Qaseem, A., Hicks, L. A., Etxeandia-Ikobaltzeta, I., Shamliyan, T., Cooney, T. G., Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians., & Tufté, J. E. (2023). Pharmacologic treatment of primary osteoporosis or low bone mass to prevent fractures in adults: a living clinical guideline from the American College of Physicians. *Annals of internal medicine*, 176(2), 224-238. <https://doi.org/10.7326/M22-1034>
- Ramos-de-la-Peña, A. M., Contreras-Esquivel, J. C., Aguilar, O., & González-Valdez, J. (2022). Structural and bioactive roles of fucoidan in nanogel delivery systems. A review. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 4, 1-21, 100235. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2022.100235>
- Robling, A., & Bonewald, L. (2020). The osteocyte: new insights. *Annual review of physiology*, 82(1), 485-506. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034332>
- Rosen, C. (2009). *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. John Wiley & Sons.
- Rouzet, F., Bachelet-Violette, L., Alsac, J. M., Suzuki, M., Meulemans, A., Louedec, L., Petiet, A., Jandrot-Perrus, M., Chaubet, F., & Michel, J. B. (2011). Radiolabeled fucoidan as a p-selectin targeting agent for *in vivo* imaging of platelet-rich thrombus and endothelial activation. *Journal of Nuclear Medicine*, 52(9), 1433-1440. <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.085852>
- Rubio-Polania, J. C., Solana-Arellano, E., Díaz-Castañeda, V., & Flores-Uzeta, O. (2016). Efecto del tamaño de malla en los valores de densidad y biomasa de la comunidad bentónica estuarina del Estero de Punta Banda, Baja California. *Revista de biología marina y oceanografía*, 51(3), 599-608. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572016000300011>
- Rudnick-Glick, S., Corem-Salkmon, E., Grinberg, I., Yehuda, R., & Margel, S. (2015). Near IR fluorescent conjugated poly(ethylene glycol)bisphosphonate nanoparticles for *in vivo* bone targeting in a

- young mouse model. *Journal of Nanobiotechnology*, 13(1), 1-8, 80. <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0126-0>
- Rutkovskiy, A., Stensløkken, K.-O., & Vaage, I. J. (2016). Osteoblast differentiation at a glance. *Medical science monitor basic research*, 22, 1-12. <https://doi.org/10.12659/msmbr.901142>
- Safadi, F. F., Barbe, M. F., Abdelmagid, S. M., Rico, M. C., Aswad, R. A., Litvin, J., & Popoff, S. (2009). Bone structure, development and bone biology. In Khurana, J. (Ed.) *Bone pathology* (1-50). Humana Press.
- Santhanam, R. C., Yacoob, S. A. M., & Venkatraman, A. (2022). *In vitro* cytotoxicity assay of Fucoidan extracted from *Turbinaria conoides* against cancer cell lines MCF7, A549, and normal cell line L929. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58, 1-6, e19542. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902022e19542>
- Schweiger, R. (1962). Methanolysis of fucoidan. II. The presence of sugars other than L-fucose. *The Journal of Organic Chemistry*, 27(12), 4270-4272. <https://doi.org/10.1021/jo01059a034>
- Souza, V. R., Mendes, E., Casaro, M., Antiorio, A. T. F., Oliveira, F. A., & Ferreira, C. M. (2018). Description of Ovariectomy Protocol in Mice. In Guest, P. (Ed.), *Steroid receptor methods: Protocols and assays* (303-309). Humana Press.
- Tabatabai, M. A. (1974). A rapid method for determination of sulfate in water samples. *Environmental letters*, 7(3), 237-243. <https://doi.org/10.1080/00139307409437403>
- Tohamy, K. M., Mabrouk, M., Soliman, I. E, Beherei, H. H., & Aboelnasr, M. A. (2018). Novel alginate/hydroxyethyl cellulose/hydroxyapatite composite scaffold for bone regeneration: *In vitro* cell viability and proliferation of human mesenchymal stem cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 112, 448-460. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.181>
- Tsai, H. T., Lin, C., Chung, C. H., Hsu, W. J., Hsieh, M. Y., Chiang, M. C., Lu, T. W., Mi, F. L., & Lin, C. W. (2025). Fucoidan-decorated metal-zoledronic acid nanocomplexes suppress tumor metastasis by inducing ferroptotic cell death and enhancing cancer immunotherapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 23(1), 1-24, 405. <https://doi.org/10.1186/s12951-025-03473-0>
- Usov, A. I., Smirnova, G. P., & Klochkova, N. G. (2001). Polysaccharides of algae: 55. Polysaccharide composition of several brown algae from Kamchatka. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 27(6), 395-399. <https://doi.org/10.1023/a:1012992820204>.
- Vaamonde-García, C., Florez-Fernandez, N., Torres, M. D., Lamas-Vazquez, M., J. Blanco, F. J., Domínguez, H., & Meijide-Faílde, R. (2021). Study of fucoidans as natural biomolecules for therapeutical applications in osteoarthritis. *Carbohydrate polymers*, 258, 1-11, 117692. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117692>
- Venkatesan, J., Bhatnagar, I., & Kim, S. K. (2014). Chitosan-alginate biocomposite containing fucoidan for bone tissue engineering. *Marine drugs*, 12(1), 300-316. <https://doi.org/10.3390/md12010300>
- Vishchuk, O., Ermakova, S. P., & Zvyagintseva, T. N. (2013). The fucoidans from brown algae of Far-Eastern seas: Anti-tumor activity and structure–function relationship. *Food chemistry*, 141(2), 1211-1217. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.065>

- Wang, K., Xu, X., Wei, Q., Yang, Q., Zhao, J., Wang, Y., Li, X., Ji, K., & Song, S. (2022). Application of fucoidan as treatment for cardiovascular and cerebrovascular diseases. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 13, 1-15, 20406223221076891. <https://doi.org/10.1177/20406223221076891>
- Weilbaecher, K. N., Guise, T. A., & McCauley, L. K. (2011). Cancer to bone: a fatal attraction. *Nature Reviews Cancer*, 11(6), 411-425. <https://doi.org/10.1038/nrc3055>
- Weinberg, R. (2014). *The Biology of Cancer*. (2nd ed.). Garland Science Taylor and Francis group.
- Wolde-Semait, H. T., & Komlos, D. (2020). Normal Bone Physiology. In Razi, A., Hershman, S. (Eds.), *Vertebral Compression Fractures in Osteoporotic and Pathologic Bone: A Clinical Guide to Diagnosis and Management* (1-8). Cham: Springer International Publishing.
- Xu, F., & Teitelbaum, S. L. (2013). Osteoclasts: new insights. *Bone Research*, 1(1), 11-26. <https://doi.org/10.4248/BR201301003>
- Xue, M., Ge, Y., Zhang, J., Liu, Y., Wang, Q., Hou, L., & Zheng, Z. (2013). Fucoidan inhibited 4T1 mouse breast cancer cell growth *in vivo* and *in vitro* via downregulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Nutrition and cancer*, 65(3), 460-468. <https://doi.org/10.1080/01635581.2013.757628>
- Yamasaki-Miyamoto, Y., Yamasaki, M., Tachibana, H., & Yamada, K. (2009). Fucoidan induces apoptosis through activation of caspase-8 on human breast cancer MCF-7 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(18), 8677-8682. <https://doi.org/10.1021/jf9010406>
- Yan, C., Pan, M., Geng, L., Zhang, Q., Hu, Y., Wang, J., & Ye, S. (2024). A novel enzyme-assisted one-pot method for the extraction of fucoidan and alginate oligosaccharides from *Lessonia trabeculata* and their bioactivities. *Journal of Oceanology and Limnology*, 42(6), 1998-2012. <https://doi.org/10.1007/s00343-024-4042-8>
- Yizhong, B., Chen, F., Jin, W., Dai, J., Mao, G., & Song, B. (2024). Sulfated galactofucan from *Sargassum fusiforme* protects against postmenopausal osteoporosis by regulating bone remodeling. *Communications Biology*, 7(1), 1-13, 1471. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-07097-2>
- Yu, J., Li, Q., Wu, J., Yang, X., Yang, S., Zhu, W., Liu, Y., Tang, W., Nie, S., Hassouna, A., White, W. L., Zhao, Y., & Lu, J. (2021). Fucoidan Extracted From Sporophyll of *Undaria pinnatifida* Grown in Weihai, China –Chemical Composition and Comparison of Antioxidant Activity of Different Molecular Weight Fractions. *Frontiers in Nutrition*, 8, 1-11, 636930. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.636930>
- Yue, Q., Liu, Y., Li, F., Hong, T., Guo, S., Cai, M., Zhao, L., Su, L., Zhang, S., & Zhao, C. (2025). Antioxidant and anticancer properties of fucoidan isolated from *Saccharina Japonica brown algae*. *Scientific Reports*, 15(1), 1-14, 8962. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-94312-7>
- Yun, C. W., Yun, S., Lee, J. H., Han, Y. S., Yoon, Y. M., An, D., & Lee, S. H. (2016). Silencing prion protein in HT29 human colorectal cancer cells enhances anticancer response to fucoidan. *Anticancer Research*, 36(9), 4449-4458. <https://doi.org/10.21873/anticancer.10989>
- Zayed, A., El-Aasr, M., Ibrahim, A. R. S., & Ulber, R. (2020). Fucoidan characterization: Determination of purity and physicochemical and chemical properties. *Marine drugs*, 18(11), 1-31, 571. <https://doi.org/10.3390/md18110571>

Zhang, Y., Liang, J., Liu, P., Wang, Q., Liu, L., & Zhao, H. (2022). The RANK/RANKL/OPG system and tumor bone metastasis: Potential mechanisms and therapeutic strategies. *Frontiers in Endocrinology*, *13*, 1-8, 1063815. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1063815>

Zhao, Z., Sun, H., Fu, Y., Liang, X., Fan, T., Li, X., Zhu, L., Xu, L., Wang, X., & Li, J. (2023). Fucoidan, as a marine bioactive substance, has shown great potential in regulating the bone-gut axis. *Algal Research*, *76*, 1-11, 103323. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103323>