

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA



Casa abierta al tiempo

**Efecto hipoglucémico, hipolipidémico y citotóxico de macroalgas y
pastos marinos del Golfo de México**

Hidrobiol. García Granados Ramón Ulises

Matricula: 2133801351

Co-Directora:

Dra. Gallegos Martínez Margarita Elizabeth

Co-Director:

Dr. Alarcón Aguilar Francisco Javier

Asesora:

Dra. De Lara Isassi Graciela

México, D.F

2015

COMITÉ TUTORAL

Co-Directora

Dra. Margarita Elizabeth Gallegos Martínez

Profesor Titular "C"

Laboratorio de Ecosistemas Costeros y Pastos Marinos

Departamento de Hidrobiología

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Co-Director

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Profesor Titular "C"

Laboratorio de Farmacología

Departamento de Ciencias de la Salud

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Asesora

Dra. Graciela De Lara Isassi

Profesor Titular "C"

Laboratorio de Ficología Aplicada

Departamento de Hidrobiología

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

“El programa de la maestría en Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Excelencia del CONACyT (PNPC).

Número de registro de la beca otorgada por CONACyT y CVU del becario 566590 y 302040.

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada "Efecto hipoglucémico, hipolipidémico y citotóxico de macroalgas y pastos marinos del Golfo de México".

Jurado del examen de grado



Presidente

Dr. Francisco Cruz Sosa

Departamento de Biotecnología
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.



Secretaria

Dra. María del Carmen Escobar Villanueva

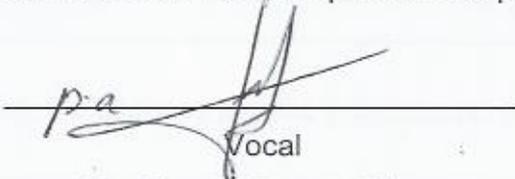
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.



Vocal

Dr. Gerardo Blancas Flores

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.



Vocal

Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Instituto de Química
Universidad Autónoma de México.

ÍNDICE

| | |
|---|-----|
| Agradecimientos. | I |
| Resumen. | II |
| Abstract. | III |
| Índice de tablas | IV |
| Índice de figuras | V |
| | |
| 1. Introducción. | 18 |
| 1.1 Diabetes mellitus. | 21 |
| 1.2 Enfermedades cardiovasculares | 23 |
| 1.2 Citotoxicidad. | 24 |
| 2. Antecedentes. | 27 |
| 3. Justificación. | 35 |
| 4. Hipótesis. | 35 |
| 5. Objetivo General. | 36 |
| 6. Objetivos particulares. | 36 |
| 7. Metodología. | 36 |
| 7.1 Criterios de selección del material biológico. | 36 |
| 7.2 Material algal. | 36 |
| 7.3 Material vegetal. | 37 |
| 7.4 Obtención de extractos acuosos algales y vegetales. | 38 |
| 7.5 Modelo Murino. | 39 |
| 7.5.1 Cepa CD-1 <i>Mus musculus</i> . | 40 |
| 7.5.2 Bionesayo <i>in vivo</i> . | 40 |
| 7.6 Estudio agudo - Macroalgas y pastos marinos. | 41 |

| | |
|---|-----------|
| 7.7 Estudio sub-crónico. ----- | 42 |
| 7.8 Registro de parámetros. ----- | 42 |
| 7.9 Perfil bioquímico. ----- | 42 |
| 7.10 Cuantificación de polifenoles totales. ----- | 44 |
| 7.10 Cultivo de la línea celular RINm5F. ----- | 46 |
| 7.11 Citotoxicidad. ----- | 46 |
| 8. Análisis estadístico. ----- | 47 |
| 9. Resultados. ----- | 48 |
| 9.1 Rendimiento de los extractos elaborados por infusión y maceración de <i>C. sertularioides</i> , <i>C. prolifera</i> , <i>S. filamentosa</i> , <i>L. intricata</i> , <i>T. testudinum</i> y <i>S. filiforme</i> .-- ----- | 48 |
| 9.2 Estudio agudo con extractos de macroalgas y pastos marinos (<i>C. sertularioides</i> , <i>C. prolifera</i> , <i>S. filamentosa</i> , <i>L. intricata</i> , <i>T. testudinum</i> y <i>S. filiforme</i>) en un modelo murino normoglucémico y con diabetes experimental. ----- | 49 |
| 9.3 Estudio subcrónico en un modelo murino con extractos elaborados por infusión de macroalgas y pastos marinos (<i>C. sertularioides</i> , <i>C. prolifera</i> , <i>S. filamentosa</i> , <i>L. intricata</i> , <i>T. testudinum</i> y <i>S. filiforme</i>) en un modelo murino.----- | 52 |
| 9.4 Peso, consumo de agua y alimento de los grupos control y de los grupos tratados durante el estudio subcrónico con extractos acuosos elaborados por infusión de macroalgas y pastos marinos (<i>C. sertularioides</i> , <i>C. prolifera</i> , <i>S. filamentosa</i> , <i>L. intricata</i> , <i>T. testudinum</i> y <i>S. filiforme</i>) en un modelo murino. ----- | 55 |
| 9.5 Contenido de polifenoles totales en extractos acuosos elaborados por infusión de <i>C. sertularioides</i> , <i>C. prolifera</i> , <i>S. filamentosa</i> , <i>L. intricata</i> , <i>S. filiforme</i> y <i>T. testudinum</i> . ----- | 57 |

| | |
|--|----|
| 9.6 Pruebas de citotoxicidad con extractos elaborados por infusión de las macroalgas y pastos marinos (<i>C. sertularioides</i> , <i>C. prolifera</i> , <i>S. filamentosa</i> , <i>L. intricata</i> , <i>T. testudinum</i> y <i>S. filiforme</i>). ----- | 58 |
| 10 Discusión. ----- | 62 |
| 11 Conclusiones. ----- | 74 |
| 12 Perspectivas. ----- | 75 |
| 13 Referencias. ----- | 76 |

I. Agradecimientos

Agradezco al Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) por el financiamiento del proyecto "Indicadores del estado de las comunidades de pastos marinos, en la costa del Golfo de México" que fue fundamental para la recolecta del material biológico, utilizado en el desarrollo de esta investigación.

II. Índice de abreviaturas

ANOVA. Análisis de varianza.

ATCC. American Type Culture Collection.

ALT. Alanina aminotransferasa.

AST. Aspartato aminotransferasa.

CI. Cardiopatía isquémica.

CO₂. Bióxido de Carbono.

Cp. *Caulerpa prolifera*.

Cs. *Caulerpa sertularioides*.

DHA. Ácido docosahexaenoico.

DM. Diabetes mellitus.

ECV. Enfermedades cardiovasculares.

ECNT. Enfermedades crónicas no transmisibles.

Gb. Glibenclamida.

HeLa. Células de adenocarcinoma humano de la cervix.

Hep-2. Células de carcinoma humano laríngeo.

Hep-G2. Células de hepatoblastoma humano.

H₂O₂. Peróxido de Hidrogeno.

i. Infusión.

INECC. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático.

IP. Intraperitoneal.

KB. Células de carcinoma humano nasofaríngeo.

Li. *Laurencia intricata*.

m. Maceración.

MEM. Medio esencial mínimo.

MDCK. Células normales de riñón canino.

MTT. Bromuro de 3-(4, 5-Dimetil-2- tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium.

OMS. Organización Mundial de la Salud.

OPS. Organización Panamericana de la Salud.

PBS. Solución salina amortiguadora de fosfatos.

RINm5f. Células productoras de insulina.

Sf. *Spyridia filamentosa*.

SM. Síndrome metabólico.

STZ. Estreptozotocina.

Syrf. *Syringodium filiforme*.

Tt. *Thalassia testudinum*.

UAM-I. Universidad Autónoma Metropolitana – Campus Iztapalapa.

III. Índice de tablas

Tabla 1. Rendimiento de los extractos acuosos preparados por maceración e infusión de las macroalgas y pastos marinos estudiados. -----48

Tabla. 2. Contenido de polifenoles totales en los extractos elaborados por infusión de *C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, *S. filiforme*, *T. testudinum*. -----58

IV. Índice de figuras

Fig. 1. Estructuras del ácido gálico y floroglucinol.

Fig. 2. Sección a-b. Niveles de D-glucosa de un modelo murino sano con extractos elaborados por infusión y maceración de *C. sertularioides* y *C. prolifera* [200 mg/kg]. Sección c-d. Niveles de glucosa de un modelo murino con diabetes experimental con extractos elaborados por infusión de *C. sertularioides* y *C. prolifera* [50, 100 y 200 mg/kg]. -----49

Fig. 3. Sección a-b. Niveles de D-glucosa de un modelo murino sano con extractos elaborados por infusión y maceración de *S. filamentosa* y *L. intricata* [200 mg/Kg]. Sección c-d. Niveles de glucosa de un modelo murino con diabetes experimental con extractos elaborados por infusión de *S. filamentosa* y *L. intricata* [50, 100 y 200 mg/kg]. -----50

Fig. 4. Sección a-b. Niveles de D-glucosa de un modelo murino sano con extractos elaborados por infusión y maceración de *S. filiforme* y *T. testudinum* [200 mg/Kg]. Sección c-d. Niveles de glucosa de un modelo murino con diabetes experimental con extractos elaborados por infusión de *T. testudinum* y *S. filiforme* [50, 100 y 200 mg/kg].-----51

Fig. 5. Niveles de D-glucosa durante el estudio subcrónico con extractos elaborados por infusión de *C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, *T. testudinum* y *S. filiforme* [50 mg/kg], Glibenclamida [20 mg/kg] y solución salina [4 mL/kg]. -----52

Fig. 6. Perfil lipídico al final del estudio subcrónico en un modelo murino con extractos elaborados por infusión de *C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, *T. testudinum* y *S. filiforme* [50 mg/kg], Glibenclamida [20 mg/kg] y solución salina [4 ml/kg]. -----53

Fig. 7. Niveles de ALT y AST durante el estudio subcrónico con extractos elaborados por infusión de *C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, *T. testudinum* y *S. filiforme* [50 mg/kg], Glibenclamida [20 mg/kg] y solución salina [4 ml/kg].-----54

Fig. 8. Peso de los controles y tratamientos durante el estudio subcrónico con extractos elaborados por infusión de *C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, *T. testudinum*, *S. filiforme* [50 mg/kg], Glibenclamida [20 mg/kg] y solución salina 4 [mL/kg]. -----55

Fig. 9. Consumo de agua y alimento durante el estudio subcrónico con extractos elaborados por infusión de *C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, *T. testudinum*, *S. filiforme* [50 mg/kg], Glibenclamida [20 mg/kg] y solución salina 4 [mL/kg]. -----56

| | |
|--|----|
| Fig. 10. Prueba de citotoxicidad con diferentes concentraciones del extracto acuoso de <i>C. sertularioides</i> y <i>C. prolifera</i> en la línea celular RINm5F.----- | 58 |
| Fig. 11. Prueba de citotoxicidad con diferentes concentraciones del extracto acuoso de <i>S. filamentosa</i> y <i>L. intricata</i> en la línea celular RINm5F. ----- | 59 |
| Fig. 12. Prueba de citotoxicidad con diferentes concentraciones del extracto acuoso de <i>T. testudinum</i> y <i>S. filiforme</i> en la línea celular RINm5F. ----- | 60 |
| Fig. 13. Estructura de la talasiolina B. ----- | 62 |
| Fig. 14. Estructura del L-qui-ro-inositol. ----- | 63 |
| Fig. 15. Estructuras del ácido chicórico y ácido caftárico. ----- | 64 |
| Fig. 16. Estructura del α -tocoferol. ----- | 65 |
| Fig. 17. Estructura del ulvano. ----- | 66 |
| Fig. 18. Estructura del ácido docosahehexaenoico. ----- | 67 |

V. Resumen

En el último siglo, con la mejora de las condiciones sanitarias, el mundo ha sufrido una transición epidemiológica, pasando de las enfermedades infecciosas y deficiencias nutricionales a enfermedades crónicas no transmisibles, como la diabetes mellitus, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Debido a que hoy en día los tratamientos existentes para estas enfermedades son limitados en eficacia y están asociados con efectos secundarios, la población humana alrededor del mundo ha recurrido al uso de recursos naturales; entre los cuales se encuentran las macroalgas y los pastos marinos. Tomando en cuenta la información etnobotánica y los antecedentes generados alrededor del mundo, el objetivo de este proyecto fue determinar los efectos hipoglucémico, hipolipidémico y/o citotóxico de las macroalgas *Caulerpa sertularioides*, *C. prolifera*, *Spyridia filamentosa*, *Laurencia intricata* y los pastos marinos, *Thalassia testudinum* y *Syringodium filiforme*, recolectados en el litoral del estado de Campeche, México. Se prepararon extractos acuosos a partir de una maceración y una infusión de cada especie. El efecto hipoglucémico agudo de estos extractos fue evaluado en un modelo murino normoglucémico, seleccionando el extracto con mayor efecto. De manera subsecuente se evaluaron las infusiones en un modelo murino con diabetes experimental. También se realizó un estudio subcrónico para evaluar el efecto hipoglucémico e hipolipidémico de los extractos de las macroalgas y pastos marinos. El efecto citotóxico se evaluó en la línea RINm5F con la técnica de Bromuro de 3-(4, 5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-

difeniltetrazolium (MTT) a 24 h de tratamiento con diferentes dosis de los extractos. En cada extracto activo se cuantificó el contenido de polifenoles totales con la técnica de Folin-Ciocalteu. Los resultados mostraron que los extractos acuosos elaborados por infusión y maceración de *C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, *T. testudinum* y *S. filiforme* tienen efecto hipoglucémico. En el estudio subcrónico, las infusiones de *S. filamentosa*, *L. intricata* y *T. testudinum* mejoraron las dislipidemias y normalizaron los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST). Además, la infusión de los pastos marinos presentó el mayor contenido de polifenoles totales. Por último, los extractos acuosos elaborados a partir de la infusión de *C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, *T. testudinum* y *S. filiforme* no resultaron ser citotóxicos en la línea celular RINm5F. En esta investigación se concluye que los extractos elaborados por infusión de las macroalgas marinas *C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, y los pastos marinos *T. testudinum* y *S. filiforme*, recolectados en el Golfo de México tienen efecto hipoglucémico, hipolipidémico y no son citotóxicos.

VI. Abstract

In the last century with the improvement of sanitary conditions, the world has undergone an epidemiological transition, from infectious diseases and nutritional deficiencies to chronic non-communicable diseases, such as diabetes mellitus, cardiovascular diseases and cancer. Because existing treatments for these diseases today are limited in effectiveness and associated with side effects, the human population around the world it has resorted to use of natural resources; within them macroalgae and seagrasses. Considering the ethnobotanical information and background generated around the world, the aim of this project was to determine the hypoglycemic effects, hypolipidemic and/or cytotoxic of the macroalgae *Caulerpa sertularioides*, *C. prolifera*, *Spyridia filamentosa*, *Laurencia intricata* and seagrasses, *Thalassia testudinum* and *Syringodium filiforme*, collected on the coast of Campeche, Mexico. Aqueous extracts from maceration and infusion were prepared. The acute hypoglycemic effect of seaweeds and seagrasses was evaluated in a murine model normoglycemic, selecting the most effective extract. Then, the effects of an infusion [50, 100, 200 mg/kg] were evaluated in a mouse model with experimental diabetes. A subchronic study also was performed to evaluate the hypoglycemic and hypolipidemic effect of extracts from seaweeds and seagrasses. The cytotoxic effect was assessed in the RINm5F cell line with the 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT) technique, in a range of different concentrations [0.1 to 100 mg/ml] for a period of 24 hours. Totals polyphenols were quantified in the aqueous

extracts prepared from an infusion by technique of Folin-Ciocalteu. Results showed that the aqueous extracts made from an infusion and maceration of *C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, *T. testudinum* and *S. filiforme* have hypoglycemic effect . In the subchronic study, the infusion of *S. filamentosa*, *L. intricata* and *T. testudinum* improved dyslipidemia and normalized the levels of alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST). The infusion of seagrasses presented a high content of total polyphenols. Finally infusions of *C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, *T. testudinum* and *S. filiforme* did not present cytotoxic activity in RINm5F cell line. In this study we conclude that the extracts are produced by infusion of marine macroalgae *C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata* and seagrasses *T. testudinum* and *S. filiforme*, collected in the Gulf of Mexico have an effect hypoglycemic and hypolipidemic and are not cytotoxic .

1. Introducción

Uno de los grandes problemas que enfrenta actualmente la humanidad es el hecho de que la evolución biológica no va a la par con la evolución cultural. La maquinaria biológica (estructura tisular-orgánica-corporal, procesos metabólicos, etc.) es la misma de los antecesores de hace miles de miles de años (Pineda, 2008); pero las costumbres y estilos de vida cambian vertiginosamente, la globalización, la adopción de dietas occidentales y el estilo de vida sedentario, junto con la urbanización y la industrialización han traído una alta incidencia en enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT).

La mejora de las condiciones sanitarias efectuadas en el último siglo a nivel global generaron una “transición epidemiológica”, propiciando un cambio en las causas predominantes de muerte, pasando de las enfermedades infecciosas y deficiencias nutricionales a enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), tales como el cáncer, la diabetes mellitus, las enfermedades cardiovasculares y respiratorias (Hunter & Reddy, 2013; Yusuf *et al.*, 2013).

Las ECNT son uno de los mayores retos que enfrenta el sistema de salud, ya que en son la causa más frecuente de incapacidad prematura, con un elevado costo es su tratamiento, así como su complejidad implícita (Bodeheimer *et al.*, 2002). Desafortunadamente, los determinantes epidemiológicos de las ECNT tuvieron su origen en el progreso y la mejoría del nivel de vida y, de acuerdo con Cordoba-Villalobos *et al.* (2008), sólo podrán revertirse a través de un enfoque individual, social e institucional. El

control de las ECNT se fundamenta en principios distintos en relación con los padecimientos transmisibles. Implica un proceso educativo para entender la enfermedad, cambios significativos y focalizados en las conductas, utilización a largo plazo de múltiples fármacos y evaluaciones frecuentes, además de la participación de especialistas en conjunto con la familia y la comunidad (Strong *et al.*, 2005).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que el número de personas con diabetes en el mundo es de 171 millones y pronostica que aumentará a 366 millones en el año 2030 (Wild *et al.*, 2004). Esta enfermedad se caracteriza por hiperglucemia debido a un déficit en la secreción de insulina por el páncreas.

En estudios realizados durante la década pasada en la población mexicana, se reportó que la prevalencia de la diabetes mellitus se encontraba entre el 8 y el 9 % y se calculó que podría llegar a 12.3 % en el año 2025 (Aguilar *et al.*, 2001; Lerman-Garber y Rul-Rodrigo, 2001; King *et al.*, 1998), alcanzando el primer lugar de morbilidad en nuestro país. La diabetes se considera el prototipo de enfermedad crónica neurodegenerativa que precisa una gran cantidad de cuidados sanitarios (Monereo *et al.*, 1999), debido al desarrollo de complicaciones tardías (oftalmopatía, neuropatía, angiopatía cerebral, cardiovascular y vascular periférica). De hecho, los pacientes son de 2 a 4 veces más susceptibles a enfermedades cardíacas y 5 veces más propensos a tener un accidente cerebrovascular (Bakri, 2007; Tzagournis y Falko, 1982).

De igual forma la disminución de la tasa de fertilidad y el aumento de la

expectativa de vida; en conjunto de los índices de urbanización y globalización, favorecen día con día la incidencia de factores de riesgo cardiovascular para el desarrollo de cardiopatía isquémica (CI) y accidente cerebrovascular, dos más de las principales causas de mortalidad a nivel mundial (Yusuf *et al.*, 2001). Todo esto se traduce en una mayor dependencia del sistema sanitario y por tanto, en un mayor consumo de recursos directos para el tratamiento de los distintos procesos.

Por otra parte, el cáncer es otra de las principales causas de muerte en el mundo. Desde el punto de vista médico se define como un crecimiento tisular patológico, producido como consecuencia de la proliferación continua de células transformadas, con capacidad de expansión local, invasión, colonización y destrucción de otros tejidos (Bennet y Plum 1996). Ésta no es una única entidad patológica sino que abarca más de 100 formas, según el tejido afectado; incluso en un mismo tejido se puede encontrar una amplia variedad de cánceres con distinta morfología y grado de malignidad (Orozco y Gariglio, 2000). En América Latina, de acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud [OPS] (2011), durante el periodo 2007-2009, la tasa de mortalidad estandarizada a consecuencia de alguna neoplasia maligna fue de 110.7 muertes por cada 100 mil habitantes; para la región, las tasas más altas se ubicaron en Uruguay (168.4), Cuba (143.3) y Perú (136.6). En contraste, México presentó la tasa más baja de Latinoamérica (75.4), probablemente como resultado de los esfuerzos que se han llevado a cabo en materia de prevención, atención oportuna y sensibilización entre la población. Aun así, en nuestro país es la tercera

causa de muerte, después de la diabetes mellitus y las enfermedades cardiovasculares, de acuerdo con la Secretaría de Salud y el Instituto Mexicano del Seguro Social.

Las medidas terapéuticas tradicionales contra el cáncer incluyen la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia; sin embargo, la mayoría de los antitumorales son poco selectivos y afectan la viabilidad de las células sanas; además de que poseen una alta toxicidad, empeorando la calidad de vida de los pacientes (Sotomayor *et al.*, 2006).

Tomando en cuenta lo anterior, existe una gran necesidad de ampliar la farmacognosia marina nacional, optimizando los recursos naturales para, en un futuro, poder atender los problemas sanitarios, bajar sus costos y ampliar su accesibilidad.

1.1 Diabetes

La DM es un problema de salud a nivel mundial (Villalpando *et al.*, 2010) y es el desenlace de un proceso iniciado varias décadas antes del diagnóstico. La mayoría de los individuos con diabetes tiene otros miembros de su familia con la misma enfermedad. A menudo tuvieron bajo peso al nacer y un aumento de peso mayor a lo normal durante la adolescencia. Casi todos ellos acumulan la grasa en el abdomen. Un alto porcentaje sufre hipertensión arterial, concentraciones anormales de colesterol, triglicéridos, colesterol y ácido úrico antes de la aparición de la hiperglucemia. Con el tiempo, la concentración de glucosa en sangre aumenta, al principio sólo después de ingerir alimentos y años después aun en estado de ayuno. El conocimiento de esta secuencia ha permitido

identificar a los sujetos en riesgo de convertirse en diabéticos y es la base para el diseño de programas preventivos (Aguilar *et al.*, 2001).

Las poblaciones latinas en general son más susceptibles, especialmente los mexicanos. En nuestro país, la prevalencia de DM alcanza cifras del 7.5 % en la población general (Villalpando *et al.*, 2010). Sin embargo, otros estudios han reportado hasta el 17 %, específicamente en los estados del noreste (Villalpando *et al.*, 2010, Morley, 2008). Se ha referido que la prevalencia es más alta conforme avanza la edad; así, en los mayores de 60 años se sitúa entre el 20 y el 22.4 %, con una elevación importante entre los 64 y los 75 años. La relevancia en relación con la DM es que ésta se notifica como la primera causa de muerte directa o indirecta en nuestro país (Tamez *et al.*, 2007).

Los pilares sobre los que se fundamenta el tratamiento de la DM son: la dieta, el ejercicio, la educación del paciente, la terapéutica de remplazo con insulina y los agentes orales hipoglucemiantes y antihiperoglucemiantes (American Diabetes Association, 2006; Kilo, 1987; Saudek y Eder 1979; Yki, 1990).

Estos aspectos continúan evolucionando y desarrollándose con el fin de conseguir realmente el objetivo básico del tratamiento para estos enfermos; pero a pesar de los protocolos y de los fármacos existentes, estos tratamientos han limitado la eficacia y están asociados con efectos secundarios indeseables. Esto ha llevado a un creciente interés en el uso de plantas medicinales como una alternativa de manejo para la diabetes (Betteridge, 1989).

1.2 Enfermedades cardiovasculares

Las dislipidemias, en particular los niveles elevados de lipoproteínas de baja densidad (LDL), junto con la hipertrigliceridemia, son importantes factores de riesgo cardiovascular (NCEP, 2001). Si bien los niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL) se han postulado como un importante factor de riesgo, es probable que su participación no sea tan crucial como los altos niveles de LDL (Briel *et al.*, 2009). En la ciudad de México resulta alarmante la elevada prevalencia de dislipidemias, tanto en relación a los niveles de colesterol total como de LDL y triglicéridos. En hombres de 50 años el riesgo de tener o morir por enfermedad cardiovascular es del 38.7 % si sus niveles de colesterol en sangre son < 180 mg/dl y se eleva al 64.6 % si éstos son de 240 mg/dl o mayores. En las mujeres estos riesgos son, respectivamente, del 19.4 y 48 % (Lloyd-Jones *et al.*, 2006). Se considera que por cada incremento de 30 mg/dl de LDL hay un aumento del 30 % en el riesgo de cardiopatía isquémica (Grundy *et al.*, 2001). De hecho, la reducción de LDL, entre 77 y 116 mg/dl disminuye entre un 40 y 50 % la incidencia de infarto al corazón, de revascularización o de un evento vascular cerebral de tipo isquémico (CTT, 2010).

En la República Mexicana, niveles elevados de colesterol en sangre son un factor de riesgo importante para infarto agudo de miocardio (Camacho-Hernández *et al.*, 1995) así como para isquemia miocárdica silente (Unzueta-Montoya *et al.*, 2000), y en conjunción con la diabetes mellitus explican dos terceras partes de la mortalidad por cardiopatía isquémica en el país (Escobedo De la Peña *et al.*, 1994).

Desafortunadamente el tratamiento conservador de las dislipidemias, con dieta y normalización del peso es muy eficaz, pero difícil de realizar en la práctica; es por ello que en el tratamiento farmacológico convencional encontramos fármacos como los fibratos, estatinas, niacinas (NCEP, 2001; Ros y Laguna, 2006).

Una opción en la búsqueda de nuevos fármacos se encuentra en los recursos naturales de origen marino, los cuales son ricos en ácidos grasos polinsaturados. Se ha reportado que en dosis de 2-4 g/día, los ácidos grasos de origen marino son tan eficaces como los fibratos en el control de dislipidemias, además de carecer de efectos secundarios (Ros y Laguna, 2006). Por lo tanto, una gestión adecuada de estos recursos naturales, podría brindar alternativas terapéuticas renovables.

1.3 Citotoxicidad

La búsqueda de nuevas moléculas con potencial anticancerígeno a partir de productos naturales es hoy en día un campo abierto a la investigación médica (Cordell 2000, Mans *et al.*, 2000). En este proceso, la valoración de la citotoxicidad *in vitro* es una herramienta válida y útil en las primeras etapas de selección de compuestos promisorios, que los grupos de investigación básica están utilizando ampliamente alrededor del mundo (Andrighetti-Fröhner *et al.*, 2003, Fricker y Buckley, 1996). En términos generales la citotoxicidad está definida como una alteración de las funciones básicas celulares, que lleva a daño celular y que, por distintos medios o técnicas puede ser detectado; de igual forma nos indica el potencial que un agente tiene para causar el daño celular (Repetto, 2002),

éste dependerá totalmente de la concentración, así como del tiempo de exposición. La intensidad de este efecto compromete la viabilidad celular por perturbación metabólica o integridad estructural, causando muerte celular; o por integridad reproductiva, inhibiendo la división celular (Shaw, 1994).

Los ensayos de evaluación de la actividad citotóxica *in vitro*, empleando líneas celulares derivadas de neoplasias humanas, se han convertido en una de las principales herramientas de apoyo para realizar procesos de bioprospección y, al ser un modelo experimental *in vitro*, es una alternativa que ha permitido la búsqueda de nuevos principios activos.

Una prueba *in vitro* ideal para evaluar la proliferación celular y la citotoxicidad debe cumplir con ciertas características, como son: ser simple, rápida, eficiente, económica, reproducible, sensible, segura, efectiva en la medida de la población celular viable y que no muestre interferencia con el compuesto a evaluar (Lieberman *et al.*, 2001; Monks *et al.*, 1991), permitiendo reducir tanto el tiempo, como los costos en la investigación. Por otra parte, deber ser útil para diferentes tipos de estudios relacionados con mecanismos celulares y moleculares (Prieto y Aristizabal 2009; Freshney, 2000).

En este tipo de ensayos los cultivos de las líneas celulares son expuestas a la sustancia por un periodo determinado de tiempo, se evalúa la viabilidad celular y la capacidad citotóxica de los agentes estudiados; esa capacidad es interpretada como un indicativo de potencial anticáncer *in vivo* (Morantes *et al.*, 2006). También se emplean diferentes métodos de tinción celular con

el fin de estimar de manera indirecta el número de células viables presentes después de un tratamiento. La mayoría de éstos son de punto final, al usarse de forma destructiva, lo cual imposibilita seguir el comportamiento de las células después de ser sometidas a un tratamiento traumático (Anoopkumar-Dukie *et al.*, 2005).

Para dar solidez a las valoraciones es necesario disponer de un panel de líneas celulares que represente diversos tipos de tumores y conocer su sensibilidad a agentes con acción citotóxica demostrada. Para la selección de productos con potencial actividad anticancerígena, el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos estableció en 1989 el tamizaje de líneas celulares, actualmente emplea un panel de 60 líneas que representan nueve tipos de tumores humanos (cerebro, colon, pulmón, ovario, riñón, melanoma, leucemia, mama y próstata) (Takimoto, 2003).

De forma general, con estas líneas celulares se ha podido evaluar una serie de agentes antineoplásicos con diferentes mecanismos de acción, generando perfiles de sensibilidad frente a los cuales se ha podido comparar el perfil de nuevas sustancias en esta rama del estudio, lo que permite plantear hipótesis sobre su mecanismo de acción, así como de sus blancos moleculares (Sausville y Johnson 2000)

2 Antecedentes

Las algas han sido centro de atención como una fuente natural de compuestos con actividad biológica por poseer efectos benéficos para la salud humana (Marfaing y Lerat 2007). En nuestros mares las algas son un recurso muy abundante, pero no han sido suficientemente estudiadas como

agentes curativos. Se conoce que contienen una gran cantidad de metabolitos secundarios con diversa actividad biológica, antibacteriana, antimicótica, antioxidante, tóxica, anticoagulante, antineoplásica, entre otras, pero las investigaciones no han tenido continuidad, ni han sido suficientemente profundas. Estos organismos constituyen una alternativa para lograr reducir el contenido de colesterol, debido a sus metabolitos secundarios con propiedades hipocolesterolémicas e hipolipidémicas, como los ácidos grasos poliinsaturados, polisacáridos (agar, carragenanos, ácido algínico y fucanos) y esteroides (fucosterol, desmosterol, sargasterol, estigmasterol y beta sitosterol) (Rodríguez *et al.*, 1995; Jiménez-Escrig y Goñi, 1999; Nishide y Uchida, 2003; Yuan, 2008).

Las algas también pueden ser útiles como medicina alternativa en el control de la diabetes mellitus y en la prevención de complicaciones vasculares (Motesakeri *et al.*, 2011). En países como China, la macroalga marina *Laminaria japonica*, que de forma coloquial se le conoce como Kelp Japonés, ha sido utilizado de manera tradicional en el tratamiento de la diabetes mellitus. En los últimos años también se ha demostrado que esta alga posee varias actividades biológicas: como hipotensora (Chiu y Fung, 1997), antimutagénica (Okai y Nakamura, 1993), y antioxidante (Han *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 1999).

En la línea de hipoglucémicos, Lamela *et al.*, (1993) llevaron a cabo una variedad de ensayos con el alga parda *Himanthalia elongata*, utilizando extractos crudos de polisacáridos y proteínas, que bajaron los niveles de glucemia en animales normales y con diabetes experimental inducida con

aloxana. Por otra parte, Kim *et al.*, (2009) observaron cómo las algas influyen en el control de la glucemia y cómo pueden ser eficaces en la reducción de lípidos en la sangre y mejorar la actividad enzimática de los antioxidantes.

Algunas algas comestibles también pueden contener cantidades apreciables de polifenoles (Rodríguez *et al.*, 2010), que son antioxidantes eficaces y que pueden tener actividad biológica particular. Por ejemplo, extractos ricos en polifenoles y componentes aislados, como el florotanino, han demostrado inhibir la proliferación de células cancerígenas (Kwon *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2005), funcionar como antidiabéticos mediante la inhibición de la α -amilasa y α -glucosidasa (Nwosu *et al.*, 2011) e influir en las respuestas antiinflamatorias (Kim *et al.*, 2009).

Los polifenoles contenidos en algas comestibles influyen en las respuestas pertinentes a la diabetes a través de la modulación del estrés oxidativo inducido por la glucosa (Lee *et al.*, 2010), así como a través de la inhibición de enzimas digestivas del almidón (Lee *et al.*, 2008) De hecho, extractos ricos en polifenoles, como en el caso del alga parda *Ascophyllum nodosum*, inhiben a la enzima α -glucosidasa, con efectos antidiabéticos prometedores en modelos murinos (Zhang *et al.*, 2007), mientras que los polifenoles de *Ecklonia* han demostrado efectos positivos en ratones genéticamente diabéticos (Iwai, 2008).

Algunos flavonoides de algas marinas y polifenoles han tenido efectos hipoglucemiantes (Apostolidis y Lee, 2010; Kang *et al.*, 2010; Iwai, 2008; Zhang *et al.*, 2007). Los extractos etanólicos y acuosos del alga *Sargassum*

polycystum alivian la hiperglucemia sin cambios significativos en la secreción de insulina y mostraron efectos hipolipidémicos en ratas con diabetes experimental tipo II, reduciendo los riesgos de enfermedades cardiovasculares (Motesakeri *et al.*, 2011).

En Pakistán, Ara *et al.*, (2002) evaluaron en un modelo murino el efecto hipolipidémico con extractos etanólicos de *Solieria robusta*, *Lyngaria stellata*, *Colpomenia sinuosa*, *Spatoglossum asperum* y *Caulerpa racemosa* en dosis de 10 mg/200g, demostrando que todas las especies disminuyeron significativamente los niveles del colesterol y triglicéridos. A su vez, algunas algas sintetizan polisacáridos y fibras como el alginato, la carragenina, el funorano, fucoidano, laminarano, porfirano y ulvano, que son capaces de reducir la absorción de colesterol en el intestino, produciendo respuestas hipocolesterolémicas e hipolipidémicas en el organismo (Kiryama *et al.*, 1968; Wang y Yang, 1997; Panlasigui *et al.*, 2003).

En México, en la península de Yucatán también se han probado extractos de diferentes especies algales; entre ellas, *Udotea flabellum* y *U. conglutinata*, que mostraron actividad citotóxica en células normales de riñón canino (MDCK), células de carcinoma humano laríngeo (Hep-2), células de adenocarcinoma humano de la cervix (HeLa) y células de carcinoma humano nasofaríngeo (KB). *Bryothamnion triquetrum* tuvo una destacable citotoxicidad selectiva contra las células Hep-2, mientras que *Lobophora variegata* y *Dictyota caribaea*, en la línea celular de células de carcinoma humano nasofaríngeo (KB), demostrando el potencial de estos

extractos como una fuente prometedora de compuestos para el tratamiento de algunos tipos de cáncer (Moo-Puc *et al.*, 2009).

En relación al uso etnobotánico de los pastos marinos alrededor del mundo se sabe que en la costa de Zanzibar en África, se utilizan como un remedio contra las picaduras de peces de las familias *Scorpaenidae* y *Siganidae*. También se usan para los dolores musculares, heridas, problemas estomacales, contra la fiebre, tos, malaria, lepra, viruela o como un tranquilizante para los bebés y calmante durante el embarazo. Sin embargo, los métodos y usos de los pastos marinos en la medicina tradicional de África son considerados por la población como un secreto (Torre-Castro y Rönnbäck, 2004).

En relación con el uso medicinal de las especies de pastos marinos localizadas en el Golfo de México, como *T. testudinum* y *S. filiforme*, existen escasos reportes en la literatura científica sobre sus potencialidades como posibles agentes de uso terapéutico; los estudios en estas especies se enfocaron a su capacidad antioxidante por su contenido de polifenoles (González *et al.*, 2010; Nuissier *et al.*, 2010; Regalado *et al.*, 2009; Zapata y Mac Millan, 1979; Mac Millan *et al.*, 1980).

Cabe señalar que este tipo de estudios no se han realizado con algas marinas mexicanas, aunque si se han hecho estudios con algunas especies de macroalgas marinas para probar otros tipos de actividades biológicas (De Lara-Isassi, 1986, 1991 y 1995; De Lara-Isassi *et al.*, 1989, 1993, 1995, 1996 y 1998; De Lara-Isassi y Álvarez-Hernández, 1994 y 1999), pero no con pastos marinos.

En años recientes se han iniciado estudios con macroalgas marinas en el laboratorio de Ficología Aplicada y en el Laboratorio de Farmacología de la UAM-I, encontrando en las especies *Caulerpa sertularioides* (Chlorophyta) y *Spyridia filamentosa* (Rhodophyta) cierto potencial como hipoglucemiantes. Por las razones expuestas, como parte del del proyecto "Indicadores del estado de las comunidades de pastos marinos, en la costa del Golfo de México" financiado por el Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) y coordinado por la Dra. Margarita Elizabeth Gallegos Martínez; se recolectó bajo el permiso de pesca de fomento: DG0PA.00665.060213.0220; material algal y vegetal con la finalidad de evaluar su actividad biológica.

Las especies seleccionadas y recolectadas de macroalgas y de pastos marinos, para esta investigación fueron las siguientes:

- ***Caulerpa sertularioides* (S.G. Gemelin) M.A. Howe**

C. sertularioides es una especie de alga sifonal que se distingue por poseer un estolón rastrero, del cual salen frondas en forma de pluma, ocasionalmente ramificadas, con pínulas cilíndricas de forma acicular con una talla hasta 20 cm de altura y 1-2 cm de ancho. Los estolones se adhieren al sustrato por medio de rizoides, el cual puede ser arenoso o fangoso. La reproducción es principalmente asexual, por fragmentación, de acuerdo a Smith y Walters 1999, en las algas sifonales los fragmentos de hasta 2 mm pueden formar un talo nuevo, por lo cual, puede propagarse de forma clonal con gran facilidad (Collado-Vides y Robledo 1999). En el campo se le observa formando parches en áreas someras de arena,

presente entre los pastos marinos y hasta más de 10 m de profundidad (Schnetter y Bula-Meyer 1982, Littler y Littler 2000), con una distribución tropical y subtropical en todos los océanos (Trainor 1978, Van den Hoek *et al.*, 1998).

- ***Caulerpa prolifera* (Forsskal) J.V. Lamouroux**

C. prolifera es un alga perenne con forma de vida epilítica y psammófila, que vive entre las praderas de pastos marinos, entre los 1.0- 6.2 m de profundidad o bien hasta los 15 m de profundidad. Se caracteriza por poseer frondas erectas, delicadas, delgadas, planas, de color verde oscuro, individuales, con elongación ovalada de 6-15 cm de longitud, 15-25 mm de ancho, posteriormente, proliferan hojas secundarias (filoides) de la parte central de la hoja progenitora; se observa un pedúnculo corto, delgado de 1.0-1.4 mm de diámetro (0.5) 1-2 cm de longitud; estolón rastro de 1.0-1.5 mm de diámetro; rizoides de 0.7-1.0 mm de diámetro surgiendo del estolón. (Littler y Littler 2000).

- ***Spyridia filamentosa* (Wulfen) Harvey**

S. filamentosa es una especie de macroalga marina de porte arbuscular, erecta y con ramificaciones irregulares (Sansón y Reyes 1996), posee un talo uniaxal pseudoparenquimatoso, constituido por medio de la organización radial de los primeros filamentos laterales con crecimiento indeterminado, muy filamentoso y de apariencia compacta (Cabrera *et al.*, 2004). Se encuentra en fondos arenosos de muchas regiones tropicales y subtropicales (Abbott y Hollenberg, 1976; Silva *et al.*, 1987, 1996; Schneider y Searles, 1991; Adams, 1994; Stegenga *et al.*, 1997;

Womersley, 1998; Wynne, 1998; Yoshida, 1998) , incluidas zonas de manglares. Su biología reproductiva en cultivos ha sido también investigada (West y Calumpong, 1989). En ciertas localidades tropicales y subtropicales es un componente principal de la biomasa de macroalgas (Cruz - Ayala *et al.*, 1998).

- ***Laurencia intricata* J. V. Lamouroux**

L. Intricata es una macroalga marina de porte erecto, con ramificación irregular y espiralada con hasta 2 órdenes de ramificación; cuyos ejes nacen de ramas estoloníferas de coloración rosáceo-púrpura, consistencia carnosa flácida, adherida completamente al papel de herbario cuando está seca. Posee un talo psuedoparenquimatoso cilíndrico, de 3-8 cm de altura, con un diámetro de 0.6-0.8 mm.

Crece generalmente enmarañadas o en densas alfombras intrincadas, creciendo en la zona submareal e intermareal, sobre otras algas o raíces de fanerógamas acuáticas, hasta 1 m de profundidad, en ambientes protegidos, con poco movimiento de agua (Senties-Granados y Fujii, 2002; Galicia-García *et al.*, 2013).

- ***Thalassia testudinum* Banks ex König**

Es una fanerógama marina, monocotiledonia, dioica constituida por hojas, acintadas, planas y anchas (hasta 1,5 cm) con 10 a 17 venas longitudinales y que pueden alcanzar una longitud aproximadamente de 80 cm. El rizoma es fuerte y grueso, provisto de nudos separados a intervalos de aproximadamente cinco milímetros. No todos los nudos producen vástagos de hojas ni raíces. El intervalo entre vástagos es de mínimo cinco nudos

(Phillips, 1960) y cada uno es capaz de sustentar de tres a siete hojas individuales que surgen de una vaina o bráctea que envuelve el conjunto en su base. Las raíces son capaces de penetrar varias decenas de centímetros en el sedimento. Se puede propagar vegetativamente o sexualmente por medio de semillas producidas por flores. *T. testudinum* es la principal formadora de praderas en el Caribe, su área de distribución se extiende desde Florida y el norte del golfo de México hasta las costas de Colombia y Venezuela. Se desarrolla en zonas muy someras hasta unos 14 m de profundidad, pudiendo quedar expuesta al aire durante mareas bajas extremas (Díaz *et al.*, 2003).

- ***Syringodium filiforme* Kutzing**

Es una fanerógama marina, monocotiledónea, dioica y la única en el Caribe con hojas cilíndricas; éstas son relativamente delgadas (1-2 mm), quebradizas, tienden a flotar puesto que poseen un mayor contenido de aerénquima en comparación a otras especies y pueden alcanzar longitudes mayores a 35 cm, usualmente enrollándose. Las hojas se disponen sobre ramas que brotan a intervalos regulares de nodos existentes a lo largo del rizoma, el cual se extiende ramificado horizontalmente unos cuatro a cinco centímetros por debajo de la superficie del sedimento. Existen muy pocos registros de plantas florecidas, por lo que se supone que su dispersión ocurre principalmente por vía asexual y que el crecimiento vegetativo es responsable de la supervivencia y dispersión de la especie (Phillips, 1960). En estado fértil, las hojas suelen presentar ramificaciones adicionales. Su área de distribución geográfica es el Gran Caribe, incluyendo el Golfo de

México, Bahamas y Bermudas (Díaz *et al.*, 2003).

3 Justificación

México es un país en crecimiento con grandes problemas en el sector salud; aunque sus recursos acuícolas, marinos y pesqueros son muy abundantes como fuente de fármacos, su aprovechamiento no ha sido óptimo. En particular, el recurso algal y de pastos marinos en el área de la farmacognosia marina no han sido estudiados.

Por el contrario, la información en esta área de investigación se ha incrementado a nivel mundial. Así por ejemplo, en países asiáticos y del Medio Oriente se han comprobado diversas actividades biológicas de macroalgas y pastos marinos. Con estos antecedentes y tomando en cuenta la riqueza y diversidad ficológica y vegetal que poseen los mares mexicanos, es probable que se obtengan resultados positivos en las actividades biológicas objeto de este estudio.

4 Hipótesis

Las macrofitas marinas en Asia y África se utilizan en la medicina tradicional. Por lo tanto, los extractos acuosos de macroalgas y pastos marinos del Golfo de México presentarán efecto hipoglucémico, hipolipidémico y/o citotóxico.

5 Objetivo General

Determinar los efectos hipoglucémico, hipolipidémico y/o citotóxico de las macroalgas *C. sertularioides*, *C. prolifera* (Chlorophyta), *S. filamentosa*, *L. intricata* (Rhodophyta), y los pastos marinos, *T. testudinum* y *S. filiforme* (Tracheophyta).

6 Objetivos Particulares

Comparar el efecto hipoglucémico agudo, en un modelo murino sano, de los extractos obtenidos con y sin temperatura de las macroalgas *C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata* y los pastos marinos, *T. testudinum* y *S. filiforme*.

Determinar en estudios agudos y subcrónicos si los extractos activos en ratones sanos poseen efecto hipoglucémico y/o hipolipidémico en ratones con diabetes experimental.

Determinar el contenido de polifenoles totales de los extractos más activos.

Determinar si los extractos activos en ratones diabéticos de las macroalgas y pastos marinos poseen efecto citotóxico en la línea celular RINm5F.

7 Metodología

7.1 Criterios de selección del material biológico

El material biológico se seleccionó respetando los criterios establecidos por Ramírez-Mares *et al.*, (1999), de manera bioracional; es decir, considerando los antecedentes fitoquímicos, taxonómicos y ecológicos.

7.2 Material Algal

La recolecta del material ficológico se realizó en la época de secas, en Abril del 2013, para *C. sertularioides*, en el litoral del estado de Campeche, localidad del Ranchito (18° 38' 49.10" N/91° 44' 33.00" W); *C. prolifera* se recolectó en la localidad de Champotón (19° 19' 50.10" N / 90° 44' 24.80" W). *S. filamentosa* fue recolectada en Isla Blanquilla (18° 38' 10.80" N / 91° 41' 54.30" W) y finalmente *L. intricata* en la localidad de Champotón (19° 22' 44.60" N / 90° 44' 50.40" W). Estas recolectas se hicieron de forma

manual, las muestras se lavaron con agua de mar y posteriormente se colocaron en bolsas Ziploc, con la menor cantidad de agua y sedimentos, asignándoles un número de recolecta correspondiente a la localidad en donde fueron recolectadas y se almacenaron dentro de una hielera a 4 °C.

En el laboratorio todas las muestras recolectadas se almacenaron a una temperatura de -20 °C hasta el día de su procesamiento. Se procesaron con descongelamiento paulatino y a temperatura ambiente, dentro de cristalizadores con un volumen de 1 l. Las muestras ya descongeladas se lavaron con agua destilada, desechando en su totalidad los sedimentos acumulados en los talos; con ayuda de unas pinzas de disección se revisaron talo por talo y se les removió toda clase de organismos epífitos.

Terminando este proceso se extendieron las muestra sobre láminas de uncel forradas de plástico y con ayuda de toallas absorbentes se eliminó el exceso de humedad (Pesando y Caram, 1984), para colocarse posteriormente dentro de una campana de extracción durante una semana, con el fin de deshidratarlas completamente.

7.3 Material Vegetal

La recolecta del material vegetal se realizó en la época de secas, en Enero del 2014, en el estado de Campeche en las localidades de Petenes (20° 14' 35.50" N / 90° 31' 02.80" W), para *S. filiforme*, y en Champotón (19° 19' 50.10" N / 90° 43' 36.00" W) para *T. testudinum*, durante la realización del citado proyecto. Esta colecta se hizo de forma manual; las muestras se lavaron con agua de mar y posteriormente se colocaron en bolsas Ziploc con la menor cantidad de agua y sedimentos, asignándoles un número de

colecta correspondiente a la estación donde fueron recolectadas, conservándose dentro de una hielera a 4 °C. En el laboratorio todas las muestras colectadas se conservaron a una temperatura de -20 °C hasta el día de su procesamiento. Cuando se procesaron, su descongelamiento fue paulatino y a temperatura ambiente, dentro de cristalizadores con un volumen de 1 l. Las muestras ya descongeladas se lavaron con agua destilada, desechando en su totalidad los sedimentos acumulados; con ayuda de unas pinzas de disección, se revisaron tanto hojas como rizomas y se removieron toda clase de organismos epífitos. Terminando este proceso se extendió cada muestra sobre láminas de uncel forradas de plástico y con ayuda de toallas absorbentes se eliminó el exceso de humedad (Pesando y Caram,1984), para colocarse posteriormente dentro de una campana de extracción durante una semana con el fin de deshidratarlas completamente.

7.4 Obtención de extractos acuosos algales y vegetales

Las algas y los pastos marinos se molieron en un molino de café de acero inoxidable, se pesaron y se guardaron en sobres de papel aluminio dentro de bolsas de plástico (marca Ziploc) etiquetadas con el número de muestra, localidad y peso final, resguardándose de la luz, la humedad y el calor dentro de bolsas de papel. Posteriormente se pesaron 40 g del material biológico y se colocó cada uno dentro de un matraz con 500 ml con agua destilada; se agitó la solución durante 15 min. La mitad de estas soluciones se maceró por 24 h y las demás se colocaron durante 10 min a 80 °C, para obtener una infusión. Posteriormente los extractos se incubaron a 4 °C

durante 24 h en un matraz cubierto con papel aluminio, para evitar la oxidación. Después del periodo de incubación las soluciones se filtraron. Cada una de las soluciones se colocaron en un refractario de cristal, cubierto de plástico autoadherible con perforaciones en su superficie dentro de la campana de extracción, para evaporar el solvente. Al término de este proceso, cada muestra se recuperó con ayuda de una espátula de metal. El material resultante se pesó y guardó dentro de frascos de plástico color ámbar previamente etiquetados, conservándolos a una temperatura de 4 °C. Los productos resultantes se utilizaron en los bioensayos, utilizando como vehículo solución salina [4 ml/kg].

7.5 Modelo murino

En la actualidad el ratón de laboratorio (*Mus musculus* L.) es el modelo animal más usado en el laboratorio para el análisis de enfermedades humanas. Entre sus ventajas se pueden resaltar las siguiente: talla pequeña, buen manejo, adecuada resistencia, ciclo reproductivo corto con camadas grandes y sobre todo, bien caracterizado en cuanto a su biología; además, es una especie que cuenta con muchas cepas consanguíneas diferentes. Es relativamente barato en comparación con otros animales experimentales y su mantenimiento, aún en condiciones de alta seguridad, es relativamente sencillo (Rodríguez, 2007). Por todas estas características esta especie es idónea para la realización de estudios farmacológicos.

7.5.1 Cepa CD-1/*Mus musculus*

El Hsd : ICR (CD- 1®) es un modelo murino de origen suizo, que descendió de una cepa original compuesta por dos machos y siete hembras

de ratones albinos no consanguíneos, importados por el Instituto Rockefeller en 1926 de Lausanne, Suiza. Actualmente conocidos como ratones “swiss”, los ratones CD-1® son una marca registrada de los laboratorios Charles River, USA. Sus usos en investigación científica se ubican en áreas como la oncología, toxicología, envejecimiento, teratología, modelo de propósito general y el modelo quirúrgico (Harlan, 2012)

7.5.2 Bioensayo *in vivo*

Los bioensayos se realizaron usando ratones machos (*Mus musculus*) de la cepa CD-1, de 8 semanas de nacidos con un peso que oscile entre los 30-40 g, del bioterio de la UAM Iztapalapa, mantenidos en grupos de 5 individuos por tratamiento, dentro de jaulas de acrílico transparente de la marca Uni-Cage y con una dieta básica para roedores (Rodent Laboratory Chow 5001) de la marca Purina y con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. El manejo zoonosanitario, cuidado, estudio y eutanasia, en este modelo animal, se realizó respetando los requerimientos de la tres R's: *reemplazo*, *reducción* y *refinamiento* (Rusche, 2003), propuestos por Russell & Bursh en 1959 que, a manera de conclusión, postulan el concepto de ciencia humanitaria, así como sensible para el trabajo científico en busca de garantizar el uso racional y respetuoso de los animales experimentales (Huggins, 2003; Yearley, 2009) y bajo la norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999): Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio; así como respetando en todo el momento la bioética necesaria en la realización de esta serie de experimentos.

7.6 Estudio agudo - Macroalgas y pastos marinos

El bioensayo se realizará usando ratones machos de la cepa CD-1, con un peso que osciló entre 30-40 g, obtenidos en el bioterio de la UAM-I. De un lote de 70 ratones sanos se formaron seis grupos de cinco individuos cada uno. Los individuos de cada grupo llevaron un marcaje en la cola con tinta indeleble, para su identificación y consistió en pequeñas barras, una barra correspondió al individuo 1, dos barras al individuo 2 y así consecutivamente. Los grupos 1 y 2 se usaron como controles positivo y negativo respectivamente. Al grupo 1 se le administró por vía intraperitoneal (ip), solución salina isotónica [4 ml/kg]. Al grupo 2 se le administró Gliblenclamida [20 mg/kg]. Del grupo 3 en adelante, se trataron cada uno con los extractos elaborados por infusión y maceración de *C. sertularioides*, *Caulerpa prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, *T. testudinum* y *Sytingodium filiforme* [200 mg/kg]. Esto con el fin de determinar el potencial hipoglucémico diferencial que pudiese haber en la elaboración de los extractos con temperatura y a temperatura ambiente.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos, su comparación y efectividad, se escogió el de mayor efecto hipoglucémico para realizar otro estudio agudo en ratones con diabetes experimental inducida por la administración ip de estreptozotocina [135 mg/kg] en dosis única, la cual se disolvió en una solución buffer de citrato de sodio 0.1 M (pH 4.5). Se evaluaron tres diferentes dosis de extractos algales y vegetales [50, 100 y 200 mg/kg]. Después de la administración de los tratamientos se registraron las glucemias a diferentes intervalos de tiempo (60, 120 y 360 min).

7.7 Estudio subcrónico

El bioensayo se realizó usando ratones machos (*Mus musculus*) de la cepa CD-1 de 8 semanas de nacidos con un peso que osciló entre los 30-40 g, a los cuales se les indujo la diabetes de forma experimental con la administración ip de estreptozotocina [135 mg/kg] en una dosis única y que se disolvió en una solución buffer de citrato de sodio 0.1 M (pH 4.5). Se formaron ocho grupos de cinco individuos cada uno. Los individuos de cada grupo se marcaron en la cola con tinta indeleble para su identificación. Los grupos 1 y 2 se usaron como controles positivo y negativo respectivamente, todos los tratamientos se suministraron por vía intragástrica Al grupo uno se le suministró, solución salina isotónica [4 ml/kg]; al grupo dos Glibenclamida [20 mg/kg]; al grupo tres se le suministró por la misma vía el extracto de *C. sertularioides* [50 mg/kg]; al grupo 4, extracto de *C. prolifera* [50 mg/kg]; al grupo cinco, extracto de *S. filamentosa* [50 mg/kg]; al grupo seis, *L. intricata* [50 mg/kg]; al grupo siete *T. testudinum* [50 mg/kg] y finalmente al grupo ocho, extracto de *S. filiforme* [50 mg/kg]. Todo esto se realizó diariamente a la misma hora por un periodo de 30 días.

7.8 Registro de parámetros

Al inicio y a los 30 días del estudio crónico se determinó el consumo de agua y alimento; de igual forma se registró el peso de lo animales al inicio y al final del estudio subcrónico.

7.9 Perfil bioquímico

Los niveles de D-glucosa en sangre se cuantificaron a partir de muestras de sangre obtenidas por medio de la punción de la vena caudal o coccígea

media. La cuantificación de glucosa se basó en la medición de corriente eléctrica (Amperes), generada por la conversión de glucosa en gluconolactona por la enzima glucosa deshidrogenasa (*Accu-Check Sensor Comfort*). La toma de glucosa en sangre en cada estudio agudo se realizó a los 120, 240 y 360 min, después de haberle suministrado cada extracto algal o vegetal. En el caso del estudio subcrónico se hizo al inicio y después de los 30 días de tratamiento.

En relación con la cuantificación de los niveles de colesterol total, lipoproteínas de alta densidad (HDL), triglicérido, alanina aminotransferasa (ALT), y aspartato aminotransferas (AST); se obtuvo de igual forma mediante muestras de sangre obtenidas, en este caso, por medio de la punción del seno orbital del ojo del ratón; su determinación cuantitativa se realizó mediante el sistema Reflotron Plus de *Roche Diagnostics*. Esta técnica se basa en una reacción enzimática a través de diferentes fases de reacción, produciendo la formación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el cual se oxida bajo efecto catalítico de la enzima 41 peroxidasa, produciendo agua, la cual reacciona con un colorante azul (indicador redox) y se midió a 642 nm a 37 °C. Para complementar los parámetros bioquímicos anteriores se calculó indirectamente el colesterol de baja densidad (LDL) por medio de la siguiente fórmula: $LDL = TC/1.19 + TG/1.9 - HDL/1.1 - 38 (mg/dL)$.

Esta fórmula propuesta por Ahmadi *et al.*, 2008, basada en un modelo de regresión lineal y considerando la ecuación de Friedewall (1972), permite el cálculo de colesterol de baja densidad, aun cuando los valores de triglicéridos sean bajos.

7. 10 Cuantificación de polifenoles totales.

Los fenoles totales se determinaron mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, el cual se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico (Peterson, 1979). La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Julkunen-Tiito, 1985). En el desarrollo de estas pruebas se utilizó ácido gálico y floroglucinol, como material de referencia, de acuerdo a la naturaleza del material biológico. Se preparó una disolución patrón de ácido gálico y de floroglucinol de 0,1 g/l, para lo cual se pesaron 25 mg de ácido gálico y 25 mg de floroglucinol, cada uno se colocaron en un matraz aforado de 25 ml y se llevaron a volumen de aforo con agua destilada, enseguida se preparó una dilución 1:10 con agua destilada, de cada solución. De la misma manera se preparó una disolución de carbonato de sodio al 20%, pesando 5 g de carbonato de sodio en un matraz aforado de 25 ml, inicialmente se disolvió en 15 ml de agua destilada, finalmente se llevó a su volumen de aforo. Por otro lado se preparó una disolución 1 N del reactivo de Folin-Ciocalteu, por medio de una dilución 1:2 del reactivo comercial (2 N) en agua destilada; el reactivo se protegió de la luz, hasta su uso. A partir de la disolución patrón de ácido gálico y de floroglucinol, en

tubos de ensayo, con tapa rosca y protegidos de la luz, se hicieron las diluciones necesarias con agua destilada para obtener concentraciones de 0-5 mg/l para la preparación de la curva de calibración. Esto se realizó tomando respectivamente 20, 40, 60, 80 y 100 μ l de la disolución patrón de ácido gálico de 0.1 g/l y de floroglucinol en tubos de ensayo con tapa rosca de 3 ml, luego se adicionó a cada vial 250 μ l del reactivo de Folin Ciocalteu 1 N; se agitaron durante 5 min en el vortex, posteriormente se adicionaron 250 μ l de la disolución de carbonato de sodio al 20% a cada vial, se llevó a un volumen final de 2 ml con agua destilada y se dejó reposar por 240 minutos. También se preparó un blanco con todos los componentes, excepto la disolución de ácido gálico y floroglucinol. Finalmente se leyó la absorbancia λ 760 nm en el espectrómetro de ultravioleta-visible.

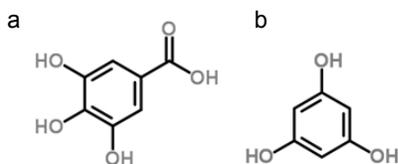


Fig. 1. Estructuras del ácido gálico (a) y floroglucinol (b). Tomado de <http://www.chemspider.com/>

Para los extractos acuosos elaborados a partir de una infusión se tomaron 5 mg de cada extracto liofilizado, se colocaron en un tubo Eppendorf de 2.5 ml y se les agregó 1 ml de agua destilada. Enseguida se tomaron 40 μ l de cada una de estas disoluciones y se mezclaron con 250 μ l de reactivo de Folin-Ciocalteu dejando en reposo a temperatura ambiente por 5 min después de lo cual se agregaron 250 μ l de carbonato de sodio al 20% y se llevó a un volumen final de 2 ml con agua destilada. Se agitaron

fuertemente para luego, dejar reposar durante 240 min a temperatura ambiente. Después de este tiempo se midió la absorbancia a 760 nm. Este procedimiento se realizó con cada uno de los extractos elaborados por infusión de las macroalgas y pastos marinos por triplicado.

7.11 Cultivo de la línea celular RINm5F

La línea celular RINm5f es productora de insulina, proveniente de islotes pancreáticos tumorales (Tiedge *et al.*, 1993). Se adquirieron comercialmente de American Type Culture Collection (ATCC). Se sembraron en medio RPMI 1640 (11.1 mM de glucosa) (GIBCO), se les agregó 8 % de suero fetal bovino, 2 Mm L-glutamina, 1 mM piruvato sódico, 20 ug/l de gentamicina a 37 °C con una atmosfera del 5 % de CO₂ y 95 % de humedad hasta llegar a confluencia (aproximadamente 72h). Se resembraron utilizando tripsina 0.025 % en PBS y se crecieron en placas de cultivo de 6 pozos; para llevarlas a confluencia e iniciar los tratamientos.

7.12 Citotoxicidad

Para determinar la citotoxicidad de los extractos de las macroalgas y pastos marinos se utilizó la prueba de Bromuro de 3-(4, 5-Dimetil-2- tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) por el método de Mosmann (1983), el cual se basa en la capacidad de las deshidrogenasas de la célula para reducir el MTT, soluble en agua (amarillo), a cambiar a (azul) insoluble en agua. Se sembraron 200,000 células por pozo en placa de 24 pozos (Nunc) con el medio adecuado para cada línea celular y se dejaron crecer por 24 h a 37 °C. Después se lavaron con PBS y se les cambió el medio por uno sin suero fetal de bovino, aplicando a su vez los tratamientos, nuevamente por

un periodo de 24 h. Transcurrido este tiempo una vez más se lavaron con PBS, para posteriormente agregar la solución con el MTT y se incubó por 3 h a 37 °C y 90 % de humedad. Pasado ese tiempo, las células se lavaron por última vez con PBS y se agregaron 500 µl de una solución de HCl 0.04 N en 2-isopropanol, durante 15 min, para disolver el formazán. El cambio de absorbencia se leyó a λ 570 nm en un espectrofotómetro. Posteriormente se realizaron las curvas concentración-respuesta. La funcionalidad se determinó por el porcentaje del cambio de extinción del MTT (Doyle *et al.*, 1994).

8 Análisis estadístico

Cada experimento se realizó por triplicado en eventos independientes. El análisis estadístico de los resultados obtenidos fue realizado mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido por la prueba complementaria de Tukey-Kramer. Se utilizó el programa IBM-SPSS/ 22 y el nivel de significancia fue del 95%.

9 Resultados

9.1 Rendimiento de los extractos.

En la tabla 1 se muestran los rendimientos (%) de los extractos algales y vegetales respecto a la biomasa empleada en su elaboración. Los extractos algales y vegetales elaborados por maceración tuvieron mayor rendimiento en comparación con los elaborados por infusión.

Tabla 1. Rendimiento de los extractos acuosos preparados por maceración e infusión de las macroalgas y pastos marinos estudiados.

| Macerados | Rendimiento neto (g) | Infusiones | Rendimiento neto (g) |
|--------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|
| <i>C. sertularioides</i> | 13.83 | <i>C. sertularioides</i> | 11.91 |
| <i>C. prolifera</i> | 11.04 | <i>C. prolifera</i> | 9.76 |
| <i>S. filamentosa</i> | 12.50 | <i>S. filamentosa</i> | 10.08 |
| <i>L. intricata</i> | 7.63 | <i>L. intricata</i> | 8.45 |
| <i>T. testudinum</i> | 17.75 | <i>T. testudinum</i> | 12.66 |
| <i>S. filiforme</i> | 20.25 | <i>S. filiforme</i> | 16.08 |

9.2 Estudio agudo con extractos de macroalgas y pastos marinos (*C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, *T. testudinum* y *S. filiforme*) en un modelo murino normoglucémico y con diabetes experimental.

En la Figura 2, en la sección a-b, se muestra el efecto hipoglucémico producido por la maceración (m) y la infusión (i) de *C. sertularioides* y *C. prolifera* en ratones normoglucémicos. El extracto realizado por maceración, bajó los niveles de D-glucosa, pero a su vez a los 120 minutos los elevó considerablemente. Mientras que en la sección c-d, la infusión en ratones diabéticos demuestra que todas las dosis bajan los niveles de glucosa.

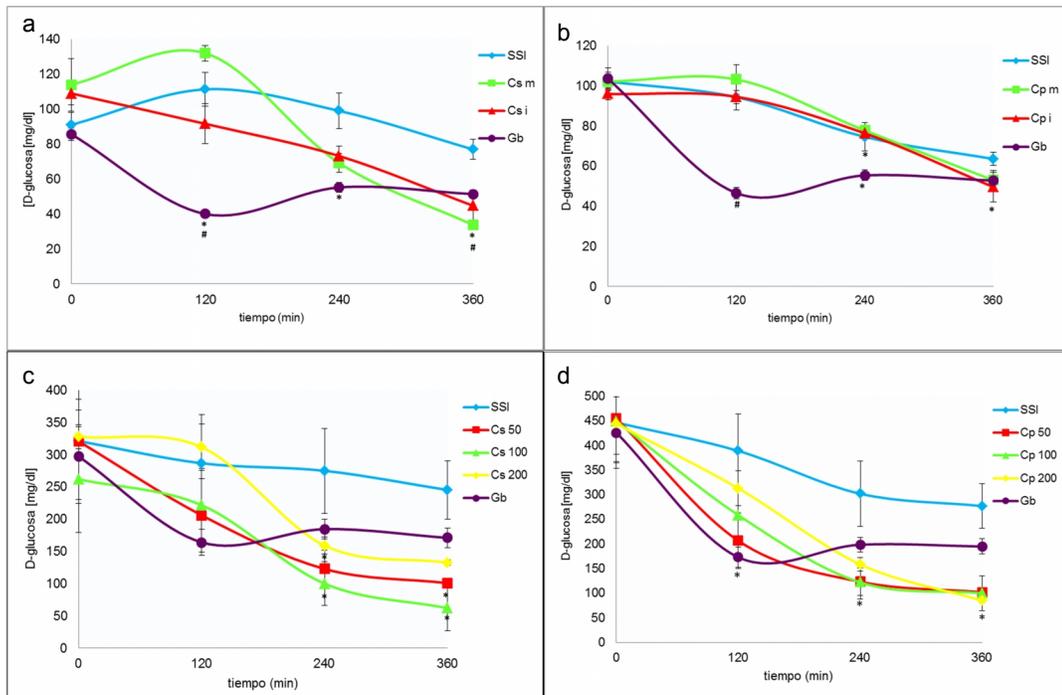


Fig. 2. Sección a-b. Niveles de D-glucosa de un modelo murino sano con extractos elaborados por infusión y maceración de *C. sertularioides* y *C. prolifera* [200 mg/Kg]. Sección c-d. Niveles de glucosa de un modelo murino con diabetes experimental con extractos elaborados por infusión de *C. sertularioides* y *C. prolifera* [50, 100 y 200 mg/kg] *Diferencia significativa respecto a su glucemia inicial. # Diferencia significativa respecto a SSI en el mismo tiempo. N=5 (p<0.05).

La Figura 3 en su sección a-b representa el comportamiento de los extractos de *S. filamentosa* y *L. intricata* [200 mg/kg], los cuales tuvieron un comportamiento similar en ratones normoglucémicos, viéndose más acentuado su efecto hipoglucémico con el extracto realizado por una infusión (i). La sección c-d muestra el comportamiento de los extractos realizados por infusión de *S. filamentosa* y *L. intricata* [200, 100 y 50 mg/kg]. Al término del estudio agudo, todas las dosis fueron eficaces para dicha actividad biológica; los dos extractos algales de ambas algas rojas en dosis de 50 mg/kg, bajaron considerablemente los niveles de glucosa, sin elevarlos a los 120 min.

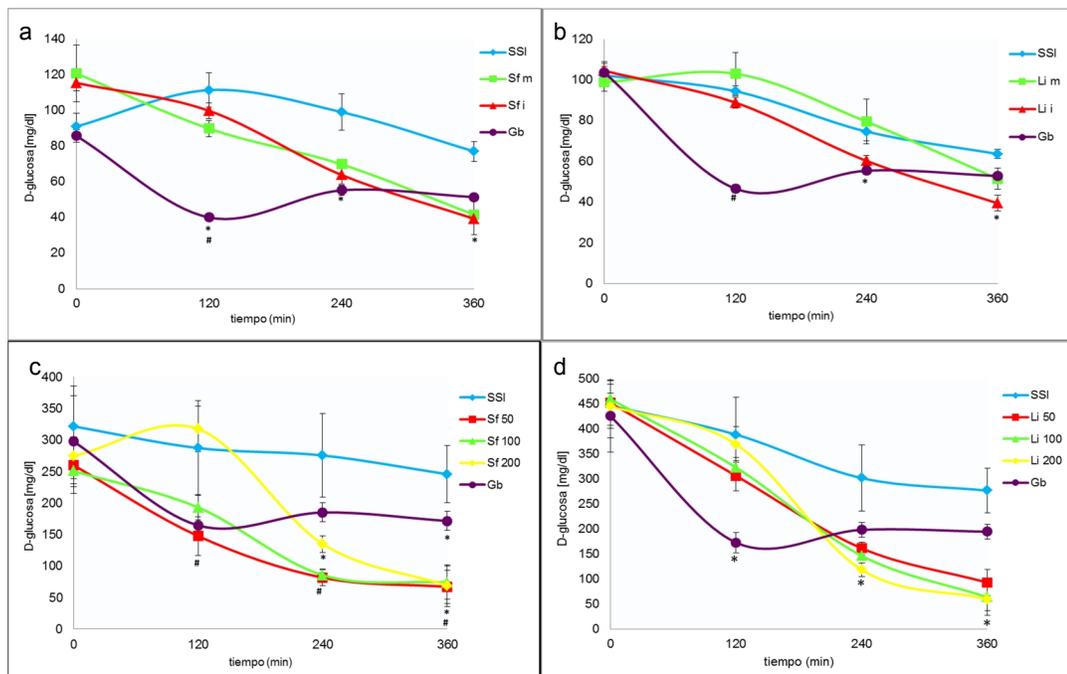


Fig. 3. Sección a-b. Niveles de glucosa de un modelo murino sano y con diabetes experimental con extractos elaborados por infusión y maceración de *S. filamentosa* y *L. intricata* [200 mg/kg]. Sección c-d. Niveles de glucosa de un modelo murino con diabetes experimental con extractos elaborados por infusión de *S. filamentosa* y *L. intricata* [50, 100 y 200 mg/kg] *Diferencia significativa respecto a su glucemia inicial. # Diferencia significativa respecto a SSI en el mismo tiempo. N=5 (p<0.05).

La Figura 4 en la sección a-b representa el comportamiento de ambos extractos de *T. testudinum* y *S. filiforme* [200 mg/kg], los cuales tuvieron un comportamiento similar en ratones normoglucémicos, viéndose más acentuado su efecto hipoglucémico con el extracto realizado por una infusión (i). La sección c-d muestra el comportamiento de los extractos realizados por infusión de *T. testudinum* y *S. filiforme* [50, 100 y 200 mg/kg]. Al término del estudio agudo, todas las dosis fueron eficaces para dicha actividad biológica; los extractos algales y vegetales en dosis de 50 mg/kg, bajaron considerablemente los niveles de D-glucosa; por lo cual se utilizarán en el desarrollo del estudio subcrónico

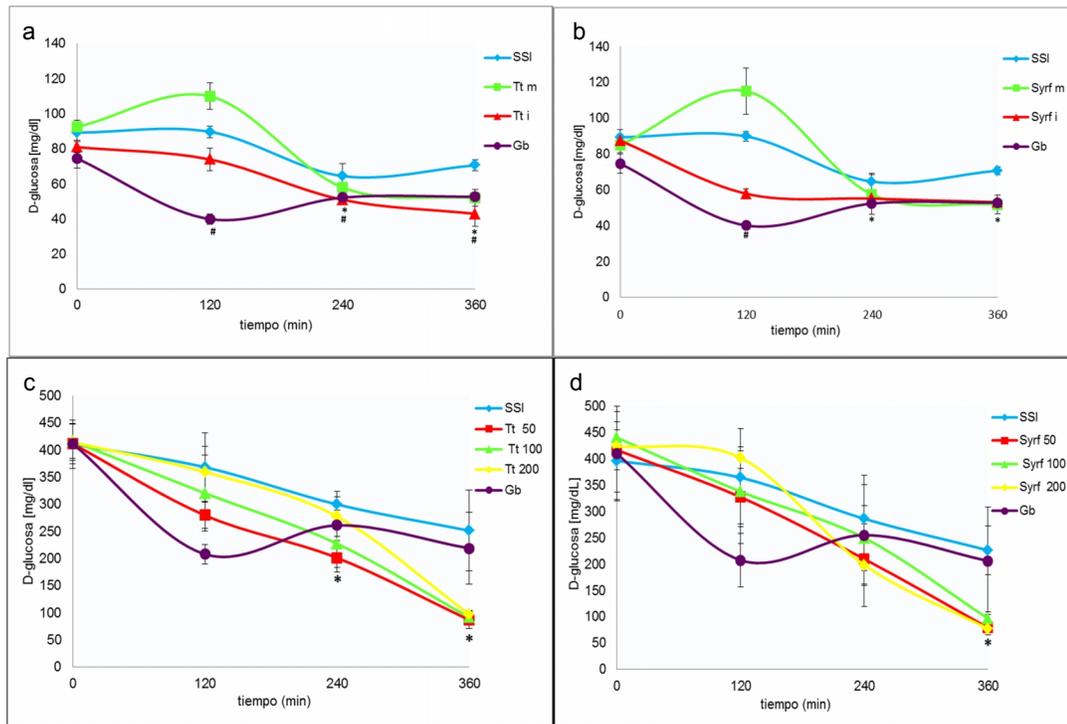


Fig. 4. Sección a-b. Niveles de D-glucosa de un modelo murino sano y con diabetes experimental con extractos elaborados por infusión y maceración de *S. filiforme* y *T. testudinum* [200 mg/kg]. **Sección c-d.** Niveles de glucosa de un modelo murino con diabetes experimental con extractos elaborados por infusión de *S. filiforme* y *T. testudinum* [50, 100 y 200 mg/kg] *Diferencia significativa respecto a su glucemia inicial. # Diferencia significativa respecto a SSI en el mismo tiempo. N=5 (p<0.05).

9.3 Estudio subcrónico con extractos acuosos elaborados por infusión de macroalgas y pastos marinos (*C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, *T. testudinum* y *S. filiforme*) en un modelo murino.

En la Figura 5, podemos observar los valores de las glucemías al inicio y al termino del estudio subcrónico donde se observa como aumentaron los niveles de las glucemías en el control negativo, mientras en el control positivo se disminuyeron ligeramente; conforme a los extractos algales y vegetales podemos corroborar una vez mas que estas infusiones, bajan los niveles de glucosa al final del estudio subcrónico.

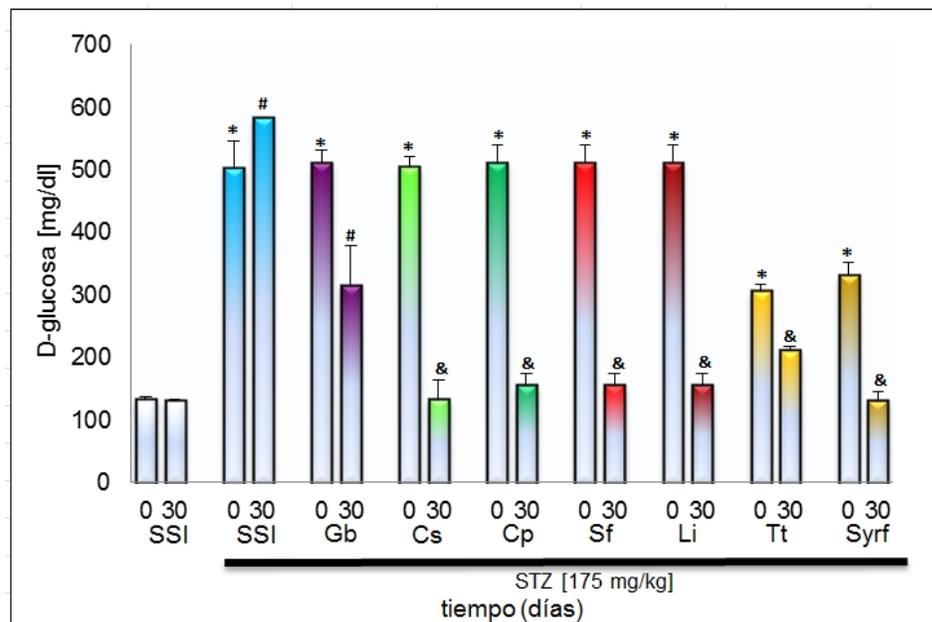


Fig. 5. Niveles de D-glucosa durante el estudio subcrónico con extractos elaborados por infusión de *C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, *T. testudinum* y *S. filiforme* [50 mg/kg], Glibenclamida [20 mg/kg] y solución salina [4 ml/kg]. Cada barra representa el valor promedio \pm E.E.M. * Diferencia significativa respecto al control sano. # Diferencia significativa respecto al control diabético. & Diferencia significativa respecto a Glibenclamida. N=5 ($p < 0.05$).

La Figura 6 en la sección a-b representa el perfil lipídico (Colesterol total, triglicéridos, HDL y LDL) de los extractos elaborados por infusión de *C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, *T. testudinum* y *S. filiforme*. Se observó que *L. intricata* fue eficaz al bajar los niveles de colesterol total, mientras que la misma especie junto con *S. filamentosa* y *T. testudinum* disminuyeron los niveles de triglicéridos y HDL, al final del estudio subcrónico, mostrando diferencias significativas respecto al control diabético.

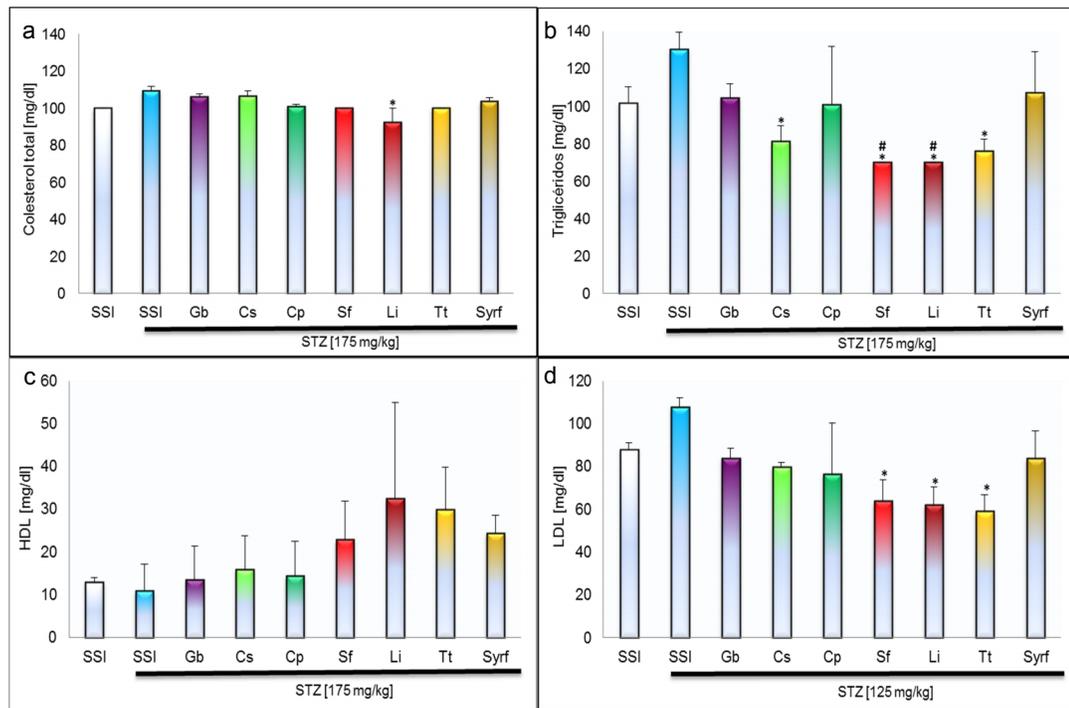


Fig. 6. Perfil lipídico al final del estudio subcrónico en un modelo murino con extractos elaborados por infusión de *C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, *T. testudinum* y *S. filiforme* [50 mg/kg], Glibenclamida [20 mg/kg] y solución salina [4 mL/kg]. Cada barra representa el valor promedio \pm E.E.M. * Diferencia significativa respecto al control sano. # Diferencia significativa respecto al control diabético. & Diferencia significativa respecto a Glibenclamida. N=5 ($p < 0.05$).

En la Figura 7 se demostró que los niveles de la alanina amino transfera, aumentaron al final del estudio subcrónico en el grupo tratado con Glibenclamida, el control diabético y el grupo tratado con *S. filiforme*. Los grupos tratados con el extracto elaborado por infusión de *L. intricata* y *T. testudinum* difirieron significativamente respecto a los controles diabéticos. En la sección b, incrementaron los niveles de la asparatato aminotransferasa, en los grupos control, a su vez los grupos tratado con *S. filamentosa*, *L. intricata* y *T. testudinum*, tuvieron la tendencia de normalizar los niveles de esta transaminasa.

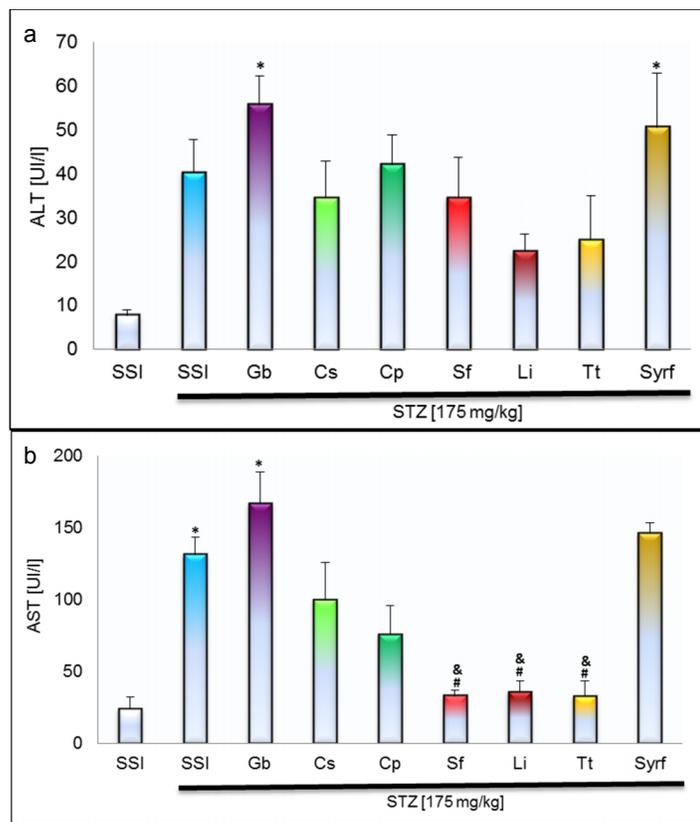


Fig. 7. Niveles de ALT y AST durante el estudio subcrónico con extractos elaborados por infusión de *C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, *T. testudinum* y *S. filiforme* [50 mg/kg], Glibenclamida [20 mg/kg] y solución salina [4 mL/kg]. Cada barra representa el valor promedio \pm E.E.M. * Diferencia significativa respecto al control sano. # Diferencia significativa respecto al control diabético. & Diferencia significativa respecto a Glibenclamida. N=5 ($p < 0.05$).

9.4 Peso, consumo de agua y alimento de los grupos control y de los grupos tratados durante el estudio subcronico con los extractos elaborados por infusión de macroalgas y pastos marinos (*C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, *T. testudinum* y *S. filiforme*) en un modelo murino.

En la Figura 8, se observó al igual que en los estudios efectuados con las macroalgas marinas que todos los grupos conformados por los tratamientos y controles usados en este estudio subcrónico, tuvieron la tendencia de incrementar ligeramente de peso, de tal manera que los estadísticos aplicados no encontraron diferencias significativas entre ellos.

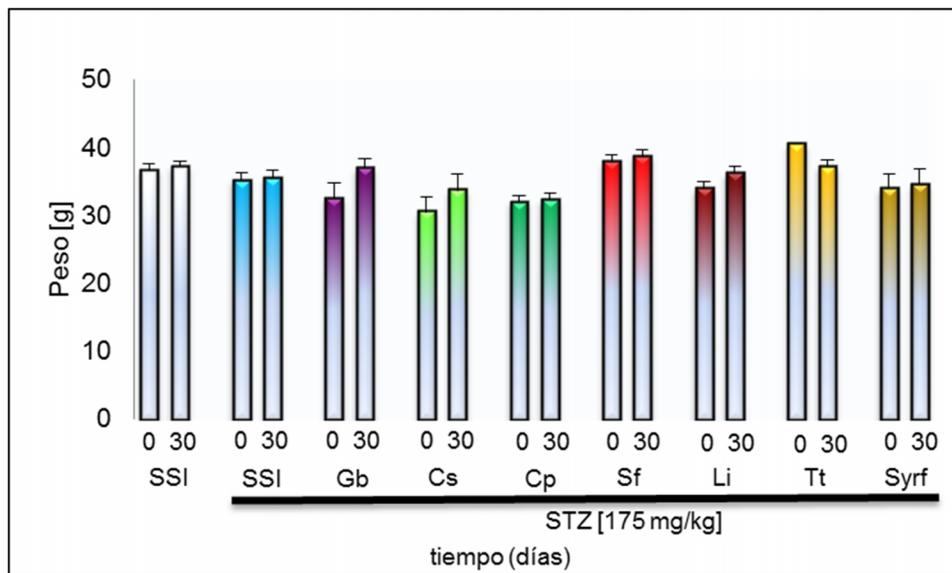


Fig. 8. Peso de los controles y tratamientos durante el estudio subcrónico con extractos elaborados por infusión de *C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, *T. testudinum*, *S. filiforme* [50 mg/kg], Glibenclamida [20 mg/kg] y solución salina 4 [mL/kg]. Cada barra representa el valor promedio \pm E.E.M. Cada barra representa el valor promedio \pm E.E.M. * No se encontraron diferencias significativas entre los grupos control y los tratamientos.

La Figura 9, muestra el consumo de agua y alimentos por los 7 tratamientos y ambos controles. Los grupos tratados con las dos especies de pastos marinos consumieron un volumen muy cercano al control normoglucémico, por lo cual mostraron diferencias significativas respecto al control diabético y a Glibenclamida; mientras que los grupos tratados con los extractos de *C. prolifera*, *L. intricata*, *T. testudinum* y *S. filiforme*, consumieron una cantidad menor de alimento durante el estudio subcrónico

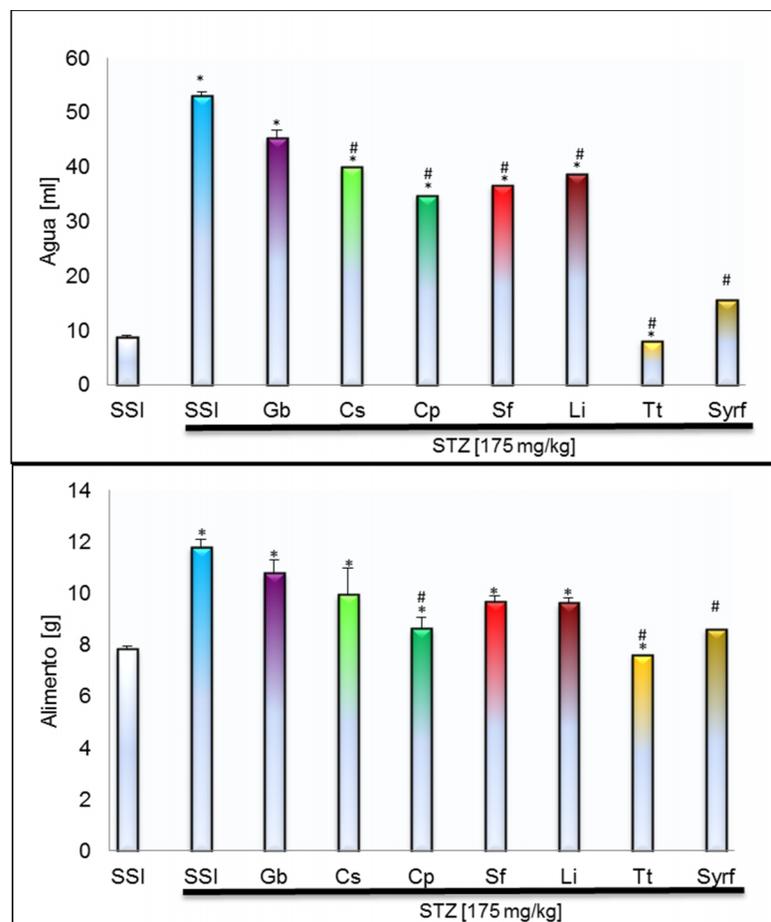


Fig. 9. Consumo de agua y alimento durante el estudio subcrónico con extractos elaborados por infusión de *C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, *T. testudinum*, *S. filiforme* [50 mg/kg], Glibenclamida [20 mg/kg] y solución salina 4 [mL/kg]. Cada barra representa el valor promedio \pm E.E.M. * Diferencia significativa respecto al control sano. # Diferencia significativa respecto al control diabético. & Diferencia significativa respecto a Glibenclamida. N=5 ($p < 0.05$).

9.6 Contenido de polifenoles totales en extractos elaborados por infusión de macroalgas y pastos marinos (*C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, *S. filiforme* y *T. testudinum*).

En la Tabla 2 se observa que el mayor contenido de polifenoles totales [$\mu\text{g/ml}$], se encontró en las dos especies de pastos marinos *S. filiforme* y *T. testudinum*, seguido por las dos especies de macroalgas marinas *S. filamentosa* y *L. intricata*.

| Infusiones | Contenido de polifenoles totales [$\mu\text{g/ml}$] |
|--------------------------|---|
| <i>C. sertularioides</i> | 38.38 |
| <i>C. prolifera</i> | 34.92 |
| <i>S. filamentosa</i> | 71.06 |
| <i>L. intricata</i> | 71.66 |
| <i>S. filiforme</i> | 98.79 |
| <i>T. testudinum</i> | 81.96 |

Tabla. 2. Contenido de polifenoles totales en los extractos acuosos elaborados por infusión de *C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, *S. filiforme*, *T. testudinum*.

9.7 Pruebas de citotoxicidad con extractos elaborados por infusión de macroalgas y pastos marinos (*C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, *S. filiforme* y *T. testudinum*).

La Figura 10, en su sección a, muestra un ensayo de citotoxicidad del extracto elaborado por infusión de *C. sertularioides* a diferentes concentraciones durante 24 h en la línea celular RINm5F. Esta serie de tratamientos en su rango de concentraciones de 10-100 $\mu\text{g/ml}$ disminuyeron la viabilidad en relación a las células control. Mientras que el extracto elaborado por infusión de *C. prolifera* solo la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ disminuyó la viabilidad.

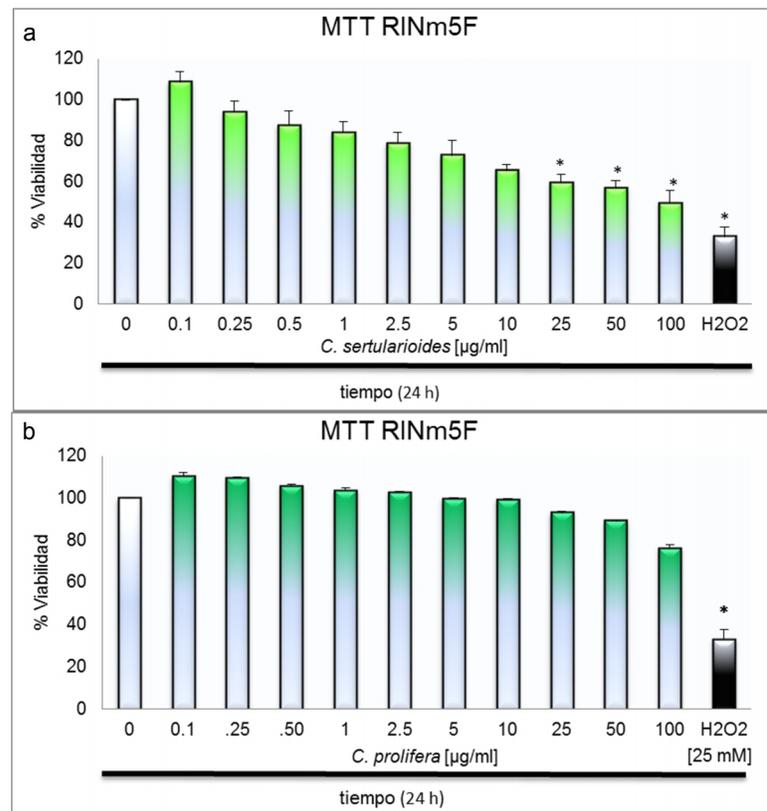


Fig. 10. Prueba de citotoxicidad con diferentes concentraciones del extracto acuoso elaborado por infusión de *C. sertularioides* y *C. prolifera* en la línea celular RINm5F. Cada barra representa el valor promedio \pm E.E.M. * Diferencia significativa respecto a las células control. N=6 ($p < 0.05$).

La Figura 11, muestra la viabilidad celular del extracto acuoso de *S. filamentosa* y *L. intricata* a diferentes concentraciones [0.5- 100 $\mu\text{g/ml}$], durante 24 h en la línea celular RINm5F. El análisis estadístico, no encontró diferencias significativas en las concentraciones usadas en los tratamientos.

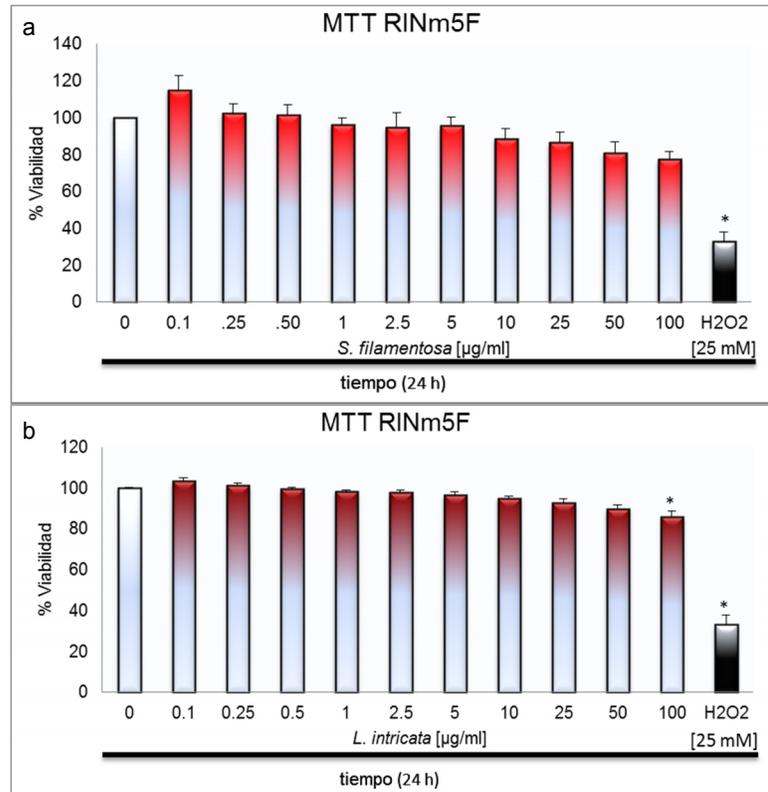


Fig. 11. Prueba de citotoxicidad con diferentes concentraciones del extracto acuoso de *S. filamentosa* y *L. intricata* en la línea celular RINm5F. Cada barra representa el valor promedio \pm E.E.M. * Diferencia significativa respecto a las células control. N=6 ($p < 0.05$).

La Figura 12, representa la viabilidad celular con el extracto acuoso de *T. testudinum* y *S. filiforme*, a diferentes concentraciones [0.5- 100 $\mu\text{g/ml}$], durante 24 h en la línea celular. Se observó que todas las concentraciones usadas en el desarrollo de ambos experimentos, no causaron alteración alguna en la viabilidad de las células RINm5F.

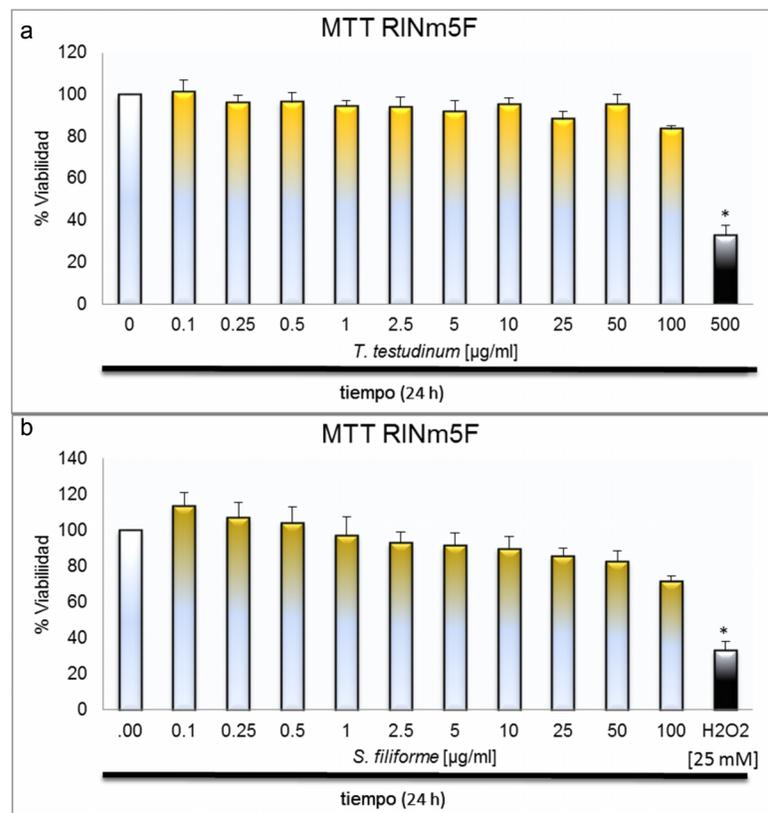


Fig. 12. Prueba de citotoxicidad con diferentes concentraciones del extracto acuoso de *T. testudinum* y *S. filiforme* en la línea celular RINm5F. Cada barra representa el valor promedio \pm E.E.M. * Diferencia significativa respecto a las células control. N=6 ($p<0.05$).

10. Discusión

Las macroalgas marinas desde el siglo pasado se reconocen como una de las fuentes más ricas en nuevos compuestos bioactivos, debido a ello se han desencadenado una serie considerable de revisiones y desarrollo de investigaciones a partir del descubrimiento de las múltiples actividades biológica de sus compuestos derivados (Blunt *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran cierta similitud con estudios previos realizados por diferentes grupos de trabajo,

Los resultados sugieren que todas las dosis empleadas de los extractos acuosos elaborados con temperatura y a temperatura ambiente de las macroalgas y pastos marinos *C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, *T. testudinum* y *S. filiforme* disminuyen de forma eficaz los niveles de D-glucosa en sangre en los estudios agudos en animales normoglucémicos y el estudio agudo subsecuente con extractos elaborados a partir de una infusión; así como en el estudio subcrónico. En ambos estudios los extractos algales y vegetales, resultaron ser más eficaces que los grupos tratados por Glibenclamida en sus correspondientes dosis. En contraste los controles diabéticos presentaron un comportamiento constante en los estudios agudos; mientras que en los estudios subcrónicos elevaron sus niveles de D-glucosa en sangre.

De acuerdo con la literatura, se conoce que las macroalgas marinas poseen polifenoles con la capacidad de inhibir a la enzima α -glucosidasa, además de ser responsable de la estimulación de la captación de glucosa (Iwai, 2008; Kim *et al.*, 2008; Kurihara *et al.*, 1995, Kurihara *et al.*, 1999a,

Kurihara *et al.*, 1999b, Xu *et al.*, 2003, Kurata *et al.*, 1997 ; Xu *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007). La inhibición de esta enzima reduce la absorción de carbohidratos, decreciendo el incremento postprandial de glucosa en sangre (Rajeswari *et al.*, 1991). De forma global se ha reportado que los polifenoles poseen efectos benéficos efectos inhibitorios de las enzimas α -glucosidasa y α -amilasa; por lo tanto, contribuyen a un buen control de los pacientes con diabetes tipo 2 (Cho *et al.*, 2003; Cheplick *et al.*, 2010; Ranilla *et al.*, 2010).

Junto con las actividades biológicas reportadas por el contenido de polifenoles en las macroalgas marinas, también tenemos referencias del contenido de estas biomoléculas, en el caso de los pastos marinos. En Cuba se desarrolló un extracto hidroalcohólico por Torre-Nuñez *et al.*, (2012) a partir de las hojas de *T. testudinum*. El extracto hidroalcohólico resultó tener una composición fitoquímica conformada por polifenoles. Con esta misma especie se observaron los efectos citoprotectores y dermorregeneradores frente al daño en piel inducido por radiaciones a partir de una flavona glicosilada, la Talasiolina B, la cual estuvo presente en altas concentraciones dentro del extracto (Regalado *et al.*, 2009).

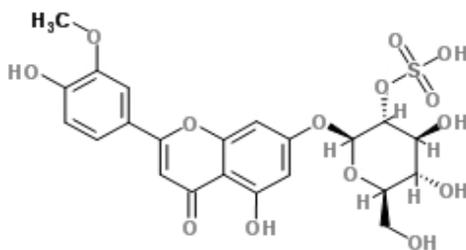


Fig. 13. Estructura de la Talasiolina B. Tomado de <http://www.chemspider.com>

Con *S. filiforme*, su manejo fue diferente ya que las hojas de las arribazones fueron la materia prima para elaborar un extracto acuoso donde se aisló el L-qui-ro-inositol, cuyas concentraciones fueron del 2.3 a 2.5 % del peso seco; ofreciendo una alternativa para el manejo de este recurso como una nueva fuente barata, renovable y con aplicaciones nutracéuticas o terapéuticas, teniendo en cuenta la acción hipoglucemiante demostrada de L-qui-ro-inositol.

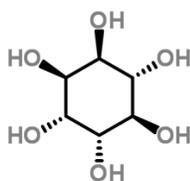


Fig. 14. Estructura del L-qui-ro-inositol. Tomado de <http://www.chemspider.com>

Dos años más tarde el mismo equipo de trabajo de Nuisser *et al.*, (2010) identificaron y cuantificaron los principales polifenoles de los extractos orgánicos y acuosos de esta fanerógama marina, encontrando ácido chicórico y ácido caftárico. Esta información la podemos correlacionar con el efecto hipoglucémico e hipolipidémico de los pastos marinos estudiados en el presente trabajo.

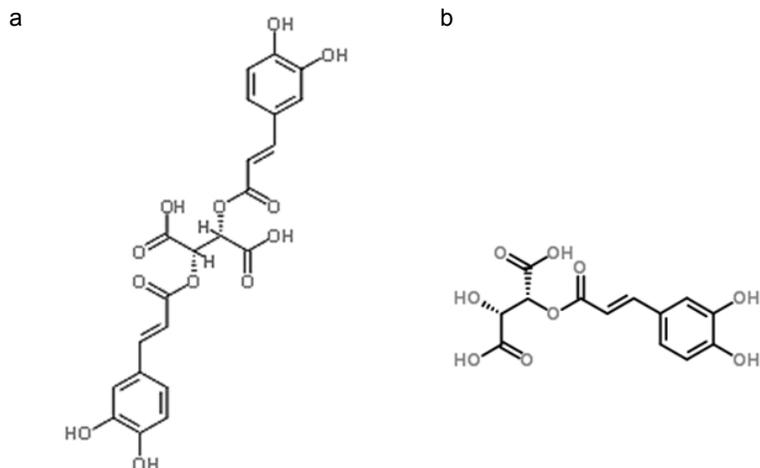


Fig. 15. Estructuras del ácido chicórico y ácido caftárico. Tomado de <http://www.chemspider.com>

Es por ello que, con el fin de ir elucidando si la razón del efecto hipoglucémico se debió a una cantidad considerable de polifenoles en los extractos acuosos elaborados por infusión de *C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, *T. testudinum* y *S. Filiforme*, se cuantificaron los polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, observando que la mayor cantidad de polifenoles se presentó en las algas rojas y en los pastos marinos.

Investigadores como Burrit *et al.*, (2002) sugieren que la ausencia de daño oxidativo en los componentes estructurales de las macroalgas marinas y su estabilidad frente a condiciones adversas como el entorno marino se deben, entre otras razones, a la presencia de polifenoles como antioxidantes muy eficaces.

Analizando los perfiles lipídicos obtenidos al final de los estudios subcrónicos de los grupos controles y de los tratamientos, encontramos que las cuatros especies de macroalgas marinas bajaron de manera eficaz los

niveles de triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad. En relación al género *Caulerpa*, Matanjun *et al.*, en 2010 reportó que *C. lentillifera* y *C. racemosa* ayudan a prevenir la enfermedad coronaria cardíaca y la arterosclerosis hiperlipidémica, debido a que alteran la absorción de colesterol, así como su metabolismo; por lo tanto disminuyen los niveles de colesterol, triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad en un modelo murino con hiperlipidemia, un signo común en pacientes diabéticos. Un dato importantes es el contenido que poseen las macroalgas marinas de la División Chlorophyta y Rhodophyta de α -tocoferol (Burtin, 2003).

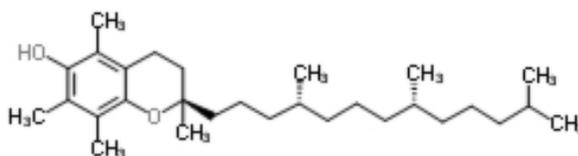


Fig. 16. Estructura del α -tocoferol. Tomado de <http://www.chemspider.com>

A diferencia de oriente, el mundo occidental sólo ha implementado el uso de las macroalgas marinas y sus derivados en el área industrial y farmacéutica, con el uso de los carragenanos (Indegaard y Ostgaard, 1991; Mabeau y Fleurence, 1993; Burtin, 2003). Este grupo de polisacáridos es particular y exclusivo de las macroalgas de la División Rhodophyta y se han probado clínicamente en un estudio subcrónico en personas con hiperlipidemias (Panlasigui *et al.*, 2003), obteniendo resultados similares a los obtenidos en nuestro modelo y con las dos especies de macroalgas marinas rojas, *S. filamentosa* y *L. intricata*.

Con una especie de macroalga de la División Chlorophyta, Penzhang *et al.*

(2003) administraron, en un modelo murino con dislipidemias, un polisacárido sulfatado de *Ulva pertusa*, denominado Ulvano, el cual fue degradado para producir dos fracciones de peso molecular bajo U1 (151.6 kDa) y U2 (28.2 kDa).

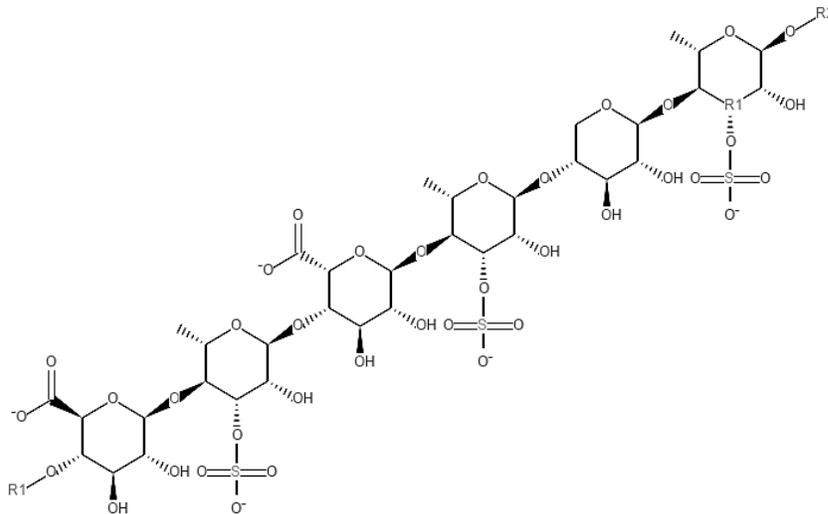


Fig. 17. Estructura del ulvano. Tomado de <http://www.chemspider.com>

Estas fracciones fueron administradas, observando que el Ulvano redujo significativamente los niveles de colesterol total en un 45.2 %, mientras que las lipoproteínas de baja densidad disminuyeron en 54.1 %. Los niveles de triglicéridos con U1 se redujeron 82.4 %; las lipoproteínas de alta densidad aumentaron en un 22.0 % y con U2 los triglicéridos bajaron en un 77.7 % para elevarse en un 61.0 % con las lipoproteínas de alta densidad. Además, la administración de estos ulvanos aumentaron significativamente los niveles de ácido biliar fecal; por lo tanto, los autores consideran las fracciones de ulvano benéficas en las dislipidemias asociadas con la diabetes. Pero no sólo los polisacáridos son los responsables de dicha actividad hipolipidémica, sino también los ácidos grasos poliinsaturados

(PUFAs).

Los ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido eicosapentaenoico y el ácido docosahexaenoico (DHA) son sintetizados eficazmente por organismos acuáticos; es por ello que la población humana sólo puede obtener estos componentes esenciales por el consumo de productos acuáticos, ya sea de origen marino o dulceacuícola.

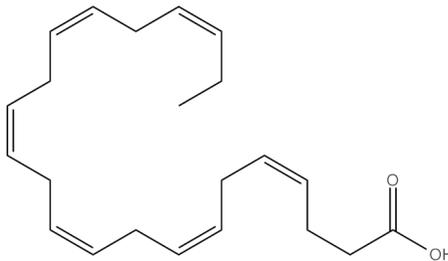


Fig. 18. Estructura del ácido docosahexaenoico. Tomado de <http://www.chemspider.com>

En este contexto las macroalgas marinas son una fuente de Omega-3 (Sánchez-Machado *et al.*, 2004). Una consecuencia del consumo diario de Omega-3 reduce el riesgo de desarrollar enfermedades cardíacas, disminuye los niveles en sangre de las lipoproteínas de bajas densidad, al igual que los triglicéridos, previniendo la osteoartritis y la diabetes (Burtin, 2003; Matanjun *et al.*, 2009; Skulas-Ray *et al.*, 2008).

Aunque Polat y Ozogul en 2013, reportaron bajas concentraciones de ácido DHA en la macroalga marina *S. filamentosa* y otra especie del género *Laurencia* en muestras colectadas en el Mediterráneo, y a pesar que se desconoce el contenido de ácidos grasos poliinsaturados de los extractos elaborados por infusión de las macroalgas y pastos marinos utilizados en esta investigación, sí estuvieron presentes en bajas concentraciones, debido al método de elaboración de los extractos, su administración diaria

pudo haber originado tan excelentes resultados en los perfiles lipídicos al final del estudio subcrónico.

Debido a esto, es de gran importancia señalar que el contenido de lípidos y ácidos grasos depende del tipo de especie, las condiciones de su hábitat, la temporada, las diferencias genéticas y las localidades (Nelson *et al.*, 2002; Kostetsky *et al.*, 2004). En consideración con esto, en las siguientes investigaciones con algas y pastos marinos, la fenología será un factor importante en la comparación de las actividades biológicas encontradas, al igual que realizar extractos orgánicos.

El control diabético, en el estudio subcrónico, en comparación al control sano, presentó menores valores de lipoproteínas de alta densidad, mayores de triglicéridos y de lipoproteínas de baja densidad, resultados que están en correspondencia con datos clínicos reportados por otros autores (Knopp *et al.*, 2003).

Por otra parte el análisis del perfil lipídico del grupo tratado con Glibenclamida [20mg/kg] coincidió con el grupo de trabajo de Triana-Mantilla *et al.*, en 2010. En su publicación se concluye que el tratamiento con Glibenclamida brinda protección a pacientes con diabetes tipo 2, contra los efectos tóxicos de la hiperglicemia, al disminuir los niveles de lipoproteínas modificadas por la glicosilación no enzimática y el estrés oxidativo. En nuestro estudio subcrónico, aparte de fungir como un control positivo en la disminución de la glucosa, la glibenclamida también logró una mejora en el perfil lipídico, disminuyendo los niveles de colesterol total, triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad.

En cuanto al incremento en los niveles de ALT y AST, cabe señalar que se trata de indicadores de hepatotoxicidad (McAnuff *et al.*, 2003., Quin *et al.*, 2003., Ao *et al.*, 2008). Los niveles incrementados en ambas transaminasas en el grupo tratado con Glibenclamida, apoya los efectos secundarios de los fármacos que existen para el tratamiento de la diabetes tipo 2 (Tewari *et al.*, 2003). Cabe recordar que el rango normal de aspartato aminotransferasa es 69-191 UI/l, mientras el de alanina aminotransferasa es 26-120 UI/l en el modelo murino, de acuerdo con Danneman *et al.*, 2004. En cambio, en la mayoría de los tratamientos con las macroalgas y pastos marinos, se presentaron niveles bajos de ALT, quizá debido a la presencia de estructuras fenólicas con efectos hepatoprotectores, una actividad biológica reportada en modelos experimentales tras la administración oral de los extractos obtenidos de especies de macroalgas de la División Heterokontophyta (*S. polycystum*, *S. henslowianu* y *S. siliquastrum*). Existe la posibilidad de que los extractos acuosos de las especies usadas en el presente estudio hayan producido un efecto similar al reportado para otras especies (Wong *et al.*, 2004).

Otro tipo de estructura presente en las macroalgas marinas vinculada también con un efecto hepatoprotector, son los polisacáridos, actividad biológica reportada por Ravajendra *et al.*, en 2004, evaluada en un modelo murino con un extracto acuoso elaborado con temperatura de la macroalga marina de la División Chlorophyta, *Ulva reticulata*. La administración intragástrica de este extracto acuoso elaborado con temperatura, tras su administración oral, disminuyó la hepatotoxicidad inducida por altas dosis

de paracetamol y normalizó el balance peroxidativo del tejido hepático. Los resultados se explican por el contenido polifenólico del extracto. Los métodos utilizados por Ravajendra *et al.*, (2004) fueron similares en la preparación de los extractos utilizados en el desarrollo de esta investigación.

En las pruebas de citotoxicidad se encontró que los extractos acuosos elaborados por infusión, de las macroalgas marinas *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata* y los pastos marinos *T. testudinum* y *S. filiforme.*, no mostraron alteraciones en la viabilidad de la línea RINm5F. De acuerdo con los criterios del Instituto Nacional del Cáncer de los EUA, un extracto vegetal es considerado bioactivo si tiene una CL50 < 30 µg/ml sobre células transformadas (Suffness y Pezzuto, 1990). Efecto que no se encontró con las especies manejadas en el desarrollo de estas pruebas (ver figuras 10-12.)

Torrez-Nuñez *et al.*, en 2012 desarrolló un extracto hidroalcohólico al que llamaron B21, obtenido a partir de las hojas secas de *T. testudinum* e identificó, aisló y sintetizó del mismo extracto la Talasiolina B; ambos fueron probados en las líneas celulares 3T3 y HepG2. En la línea 3T3 la concentración letal media (CL50) no pudo ser detectada y sólo lograron encontrar una ligera disminución de la viabilidad celular de alrededor del 30 %, con altas concentraciones después de 48 h de tratamiento al producto en estudio. En la línea HepG2 ocurrió una toxicidad diferencial, tras 24 y 48 h de exposición, reportando efectos citotóxicos a concentraciones > 200 µg/ml; en paralelo la Talasiolina B en esta línea celular no produjo ningún

efecto.

De acuerdo con lo anterior y los resultados obtenidos en la presente investigación, coincidimos en que el extracto de *T. testudinum* [0.1-100 µg/ml] no posee efectos citotóxicos ya que el efecto encontrado en otras líneas celulares se encuentra por arriba de los 30 µl/ml (Suffness y Pezzuto, 1990) y posiblemente de probar concentraciones más altas encontremos un resultado análogo en la línea RINm5F.

La información obtenida durante este estudio y su comparación con los resultados de Moo Puc *et al.*, (2003), se considera la importancia de un adecuado procesamiento al material biológico, rescatando de esta valiosa publicación la liofilización de las muestras completas, como base de la elaboración de los extractos. Al liofilizar adecuadamente un material vegetal se puede almacenar por períodos muy largos con reducciones muy bajas de sus características organolépticas, nutritivas, físicas, químicas y biológicas. Las características mencionadas antes no se conservan de igual forma por deshidratación a temperatura ambiente, técnica utilizada en la elaboración de los extractos utilizados en los bioensayos *in vivo* e *in vitro* del presente trabajo; de implementarlo en estudios futuros, pudiera ser que las actividades biológicas reportadas sean más eficaces o con mayor potencia. Es importante señalar también, que las investigaciones realizadas por este grupo de trabajo anterior en la península de Yucatán, ha sido con extractos orgánicos.

Los resultados obtenidos en este proyecto de investigación, exponen de manera clara los efectos benéficos que proporcionaron seis extractos

acuosos de origen algal y vegetal, en un modelo in vivo e in vitro, por lo cual se debe continuar con su estudio, para que en un futuro formen parte de una terapia complementaria, así como una alternativa natural a los farmacos existentes.

Los factores causantes de las ECNT como la globalización la urbanización y la industrialización, de igual forma ponen día con día en riesgo los ecosistemas naturales. A nivel global, la tasa de pérdida de las praderas de pastos marinos es de 110 km²/año desde 1980 y es comparable a la reportada para manglares, arrecifes coralinos y selvas tropicales, por lo cual las praderas de pastos marinos se ubican entre los ecosistemas más amenazados en la tierra (Waycott *et al.*, 2009).

La pérdida de biodiversidad, también significa una pérdida de compuestos bioactivos, con potenciales benéficos. Es por ello que investigaciones de esta índole, son una razón más para la conservación de estos ecosistemas en nuestro país.

11. Conclusiones

Los extractos acuosos elaborados a partir de una infusión de las macroalgas marinas *C. sertularioides*, *C. prolifera*, *S. filamentosa*, *L. intricata*, así como los elaborados con los pastos marinos *T. testudinum* y *S. filiforme*, tuvieron una mayor eficacia en la reducción de los niveles de D-glucosa en el desarrollo de estudios agudos sobre un modelo murino normoglucémico y con diabetes experimental.

Las macroalgas y pastos marinos redujeron los niveles de D-glucosa, mientras que la macroalga *L. intricata* y el pasto marino *T. testudinum*, disminuyeron los niveles de colesterol total, lipoproteínas de baja densidad y normalizaron los niveles de ambas transaminasas, en el estudio subcrónico realizado.

Las lipoproteínas de alta densidad con las dos especies anteriores mostraron una tendencia a aumentar.

La actividad citotóxica representada por viabilidad celular encontrada en la línea RINm5F, demostró que las concentraciones administradas [0.1 -100 µg/ml] por 24 h de los extractos acuosos elaborados por infusión de las macroalgas y pastos marinos estudiados no son citotóxicos.

12. Perspectivas

- Determinar las actividades biológicas encontradas en las siguientes especies: *Acetabularia schenkii*, *Avranvillea nigricans*, *C. ashmedii*, *C. cupresoides*, *C. palmata*, *Bryotamnion triquetrum*, *Gracilaria tikvahie*, *Halimena floresia*, *Halimeda monile*, *Halimeda opuntia f. triloba*, *Halodule wrightii*, *Jania capillacea*, *Penicilus capitatus*, *Sargassum fluitans*, *U. dixonii* y *U. spinulosa*, ya que son especies que también fueron identificadas y recolectadas en la misma región.
- Considerar a la fenología como una variable importante en la búsqueda de actividad biológica.
- Realizar un estudio crónico con los extractos acuosos utilizados y evaluar nuevamente los parámetros bioquímicos, así como realizar una valoración histológica.
- Realizar extracciones con disolventes orgánicos con el fin comparar la eficacia de las actividades biológicas encontradas, conforme al método de elaboración de los extractos.
- Caracterizar fitoquímicamente los extractos acuosos y orgánicos de las macroalgas y pastos marinos estudiados.
- Identificar las moléculas responsables de los efectos encontrados en esta investigación.

13. Referencias

- Abbott I. A. y Hollenberg G. J. 1976. Marine Algae of California. Stanford University Press, Stanford. 827 p.
- Adams, N. 1994. Seaweeds of New Zealand. Canterbury University Press, Christchurch. 360 p.
- Aguilar-Salinas C., Vázquez-Chávez C., Gamboa-Marrufo R., García-Soto N., Ríos-González J y R. Holguín. 2001. Prevalence of obesity, diabetes, hypertension and tobacco consumption in an urban adult Mexican population. *Archives of Medical Research*. 32: 446-453.
- Ahmadi S. A., Boroumand M. A., Gohari-Moghaddam K., Tajik S y M. Dibaj. 2008. The impact of low serum triglyceride on LDL-cholesterol estimation. *Archives of Iranian Medicine* 11: 318-321.
- American Diabetes Association. 2006. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*. 29: 4-42.
- Andrighetti-Fröhner C. R., Antonio R. V., Creczynski-Pasa T. B., Barardi C. R y C. M Simões. 2003. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 98: 843-848.
- Anoopkumar-Dukie S., Carey J. B., Conere T., O'Sullivan E., VanPelt F. N y A. Allshire. 2005. Resazurin assay of radiation response in cultured cells. *British Journal Radiology*. 78: 945-947.
- Apostolidis E y C. M Lee. 2010. In Vitro Potential of *Ascophyllum nodosum* phenolic antioxidant-mediated α -glucosidase and α -amylase inhibition:

Journal of Food Science. 75: 97-102.

Ara J., Sultana V y V. U Qasim Rahmad. 2002. Hypolipidaemic activity of seaweed from Karachi coast. *Phytotherapy Research*. 16: 479-483.

Ao Y, Chen J, Yue J y R. Peng. 2008. Effect of 18 α -glycyrrhizine on pharmacodynamic and pharmacokinetic of glibenclamide in alloxan-induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*. 587:330-335.

Bakri R. 2007. Diabetes Epidemic in Malaysia: Second National Health and Morbidity Survey Diabetes. Diabetes mellitus among adults aged 30 years and above. *Public Health Institute*. 9:101.

Bennett J. C y M. D. F. Plum. 1996. "Oncología", en "*Tratado de medicina interna*", pp 1153.

Betteridge 1989. Diabetes, lipoproteins, metabolism and atherosclerosis. *British Medical Bulletin*. 45: 385-311.

Blunt J. W., Copp B. R., Munro M. H. G., Northcote P. T y M. R Prinsep. 2006. Marine natural products. *Natural Products Reports*. 23: 26–78.

Bodenheimer T., Wagner E y K. Grumbach. 2002. Improving primary care for patients with chronic illness. *JAMA*. 288: 1775-1779.

Briel M., Ferreira-Gonzalez I., You J. J., Karanickolas P. J., Akl E. A., Wu P., Blechacz B., Bassler D., Wei X., Sharman A., Whitt I., Suzana Alves da Silva S., Senior Khalid Z., Nordmann A. J., Zhou Q., Walter S.D., Vale N., Bhatnagar N., O'Regan H., Mills E. J., Bucher H. C., Montori V. M y G. H Guyatt. 2009. Association between change in high density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease morbidity and mortality: systematic review and meta-regression analysis. *British Medical Journal*. 338: 522-526.

Burritt D. J., Larkindale J y K. Hurd. 2002. Antioxidant metabolism in the intertidal red seaweed *Stictosiphonia arbuscula* following desiccation. *Planta*. 215: 829-838.

Burtin P. 2003. Nutritional Value of seaweeds. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 2: 498-503.

Cabrera R., Martínez-Daranas B., Suárez A y A. Moreira. 2004. Adiciones a las rodofíceas marinas de Cuba. *Revista de Investigación Marina*. 25:163-166.

Camacho-Hernández R., Corona-Muñiz I., Vázquez-Martínez J.L., Martínez-Rodríguez F y J. Escobedo de la Peña.1995. Factores de riesgo para cardiopatía isquémica en México: un estudio de casos clínicos y testigos. *Archivos del Instituto de Cardiología de México*. 65: 315-322.

Cheplick S., Kwon Y. I., Bhowmik P y K. Shetty. 2010. Phenolic-linked variation in strawberry cultivars for potential dietary management of hyperglycemia and related complications of hypertension. *Bioresource Technology*. 101: 404-413.

Chiu K. W y A. Y. L Fung. 1997. The cardiovascular effects of green beans (*Phaseolus aureus*), common rue (*Ruta graveolens*), and kelp (*Laminaria japonica*) in rats. *General Pharmacology*. 29: 859-862.

Cho E. J., Yokozawa, T., Rhyu D. Y., Kim S. C., Shibahara N & J. C Park. 2003. Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1, 1-diphenyl 2-picrylhydrazyl radical. *Phytomedicine*. 10: 544-551.

Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration. 2010. Efficacy and

safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *The Lancet*. 376 : 1670-1681.

Cordell G. A. 2000. Biodiversity and drug discovery a symbiotic relationship. *Phytochemistry*. 55: 463-480.

Córdova-Villalobos J. A., Barriguete-Meléndez J. A., Lara-Esqueda A., Barquera S., Rosas-Peralta M., Hernández-Ávila M., León-May M. E y C Aguilar-Salinas. 2008. Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud Pública de México*. 50: 419-427.

Collado-Vides L. y D. Robledo. 1999. Morphology and photosynthesis of *Caulerpa* (Chlorophyta) in relation to growth form. *Journal of Phycology*. 35: 325-330.

Cruz-Ayala M. B., Casas-Valdez M y S. Ortega-García. 1998. Temporal and spatial variation of frondose benthic seaweeds in La Paz Bay, B.C.S., México. *Botanica Marina*. 41: 191-198.

Danneman P. J., Suckow M. A y B. Cory. 2012. *The Laboratory Mouse*. CRC Press. 184 p.

De Lara-Isassi G. 1986. "El Mar: Una Fuente Potencial de Medicamentos". *Revista Mexicana de Cultura*. No. 185. El Nacional. México.

De Lara-Isassi G., Sobrino-Figueroa A., Lozano-Ramírez C., Ponce-Márquez M.E y K. Dreckman. 1989. "Evaluación de la actividad antibiótica de las macroalgas de las costas de Michoacán, México". *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela. Univ. Oriente* 28: 99-104.

- De Lara-Isassi G. 1991. "Propiedades antibióticas de algunas especies de algas marinas bentónicas". *Hidrobiológica*. 1: 21-28.
- De Lara-Isassi G., Ponce M. E., Hernández-Soto N y A. Aguilar. 1993. "Actividad antibiótica de las algas marinas de las costas de Nayarit, Jalisco y Colima, México". *Serie Ocasional* 2: 43-46.
- De Lara-Isassi G. y S. Álvarez-Hernández. 1994. Actividad biológica de algunas macroalgas marinas Mexicanas. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. 45: 51-60.
- De Lara-Isassi G. 1995. "Screening for toxic activity of some marine benthic algae". *Food Additives and Contaminants*. 12: 485-490.
- De Lara-Isassi G. y S. Alvarez-Hernández. 1995. Propiedades anticoagulantes de extractos de algas marinas Mexicanas: *Halimeda discoidea* (Chlorophyta) con actividad semejante a la heparina. *Cryptogamie-Algologie*. 16: 199-205.
- De Lara-Isassi G., Álvarez-Hernández S y K. Dreckmann. 1996. Hemagglutinating activity in extracts of some Marine Mexican Algae. *Cryptogamie-Algologie*. 17: 265-269.
- De Lara-Isassi G y S. Álvarez-Hernández. 1998. "Evaluación de la actividad anticoagulante de algas marinas presentes en las costas del Golfo de México y Caribe mexicano. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. 49: 75-82.
- De Lara-Isassi G., Álvarez-Hernández S., Lozano-Ramírez C. & N. Hernández-Soto. 1999. Nuevas adiciones al conocimiento de la actividad antibiótica de macroalgas marinas mexicanas. *Hidrobiológica*. 9: 159-169.

Díaz J. M., Barrios L. M y D. I Gómez-López. 2003. Las praderas de pastos marinos en Colombia: Estructura y distribución de un ecosistema estratégico. INVEMAR, Serie Publicaciones Especiales No. 10. Santa Marta. 160 p.

Doyle A., Griffiths, J. S y D. G Newell. 1994. Cell & Tissue, Culture: Laboratory & Procedures, Ed. John Wiley & Sons, New York, 4B:7.

Escobedo De la Peña J., Escamilla Cejudo J. A y C. Santos-Burgoa. 1994. Colesterol sérico y diabetes mellitus: principales factores de riesgo independientes en la mortalidad por cardiopatía isquémica en México. *Archivos del Instituto Cardiología de México*. 64:189-95.

Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). 2001. Expert Panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 285: 2486-2497.

Freshney I. 2000. Culture of animal cells: a manual of Basic technique II, John Wiley and Sons Inc, 4 edition. pp 329-343.

Fricker S. P y R. G Buckley. 1996. Comparison of two colorimetric assays as cytotoxicity end point for an in vitro screen for antitumor agents. *Anticancer Research*.16: 3755-3760.

Friedewald W. T., Levy R. I y D. S Fredrickson. 1972. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*.18: 499-502.

Galicia-García C., M. Robinson N y Y. B Okolodkov. 2013. New records of red algae (Rhodophyta) for Cabezo Reef, National Park Sistema Arrecifal

- Veracruzano, Gulf of Mexico. *Acta Botanica Mexicana* 102: 39-76.
- González-García K. L., Valdés-Iglesias O., Laguna, A., Díaz-Martínez, M y J. A González-Lavaut. 2010. Efecto antioxidante y contenido polifenólico de *Syringodium filiforme* (Cymodoceaceae). *Revista de Biología Tropical*. 59: 465-472.
- Grundy S. M., Cleeman J. I y C. N. B Merz. 2004. The Coordinating Committee of the National Cholesterol Education Program. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation*. 110: 227-239.
- Jiménez-Escrig A y C. I Goñi. 1999. Evaluación nutricional y efectos fisiológicos de macroalgas marinas comestibles. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 2: 114-120.
- Jin D. Q., Li G y J. S Kim. 2004. Preventive effects of *Laminaria japonica* aqueous extract on the oxidative stress and xanthine oxidase activity in streptozotocin induced diabetic rat liver. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 27: 1037-1040.
- Han J., Choue R y H. Kim. 2002. Free radical scavenging effect of *Diospyros kaki*, *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida*. *Fitoterapia*. 73: 710-712.
- Hu G., Qiao Q., Tuomilehto J., Balkau B., Borch-Johnsen K y K. Pyorala. 2004. Group DS. Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women. *Archives of Internal Medicine*. 164: 1066-1076.
- Huggins J. 2003. Alternatives to animal testing: research, trends, validation,

regulatory acceptance. *Alternatives to Animal Experimentation*. 20: 3-61.

Hunter D. J y K. S Reddy. 2013. Noncommunicable Diseases. *New England Journal of Medicine*. 369: 1336-1343

Indegaard M y K. Ostgaard. 1991. Polysaccharides for food and pharmaceutical uses. M.D. Guiry, G. Blunden (Eds.), *Seaweed resources in Europe: uses and potential*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester. pp. 169-183.

Iwai K. 2008. Anti-diabetic and antioxidant effects of polyphenols in brown alga *Ecklonia stolonifera* in genetically diabetic KK-A9y mice. *Plant Foods and Human Nutrition*. 63: 163-169.

Julkunen-Tiito R. 1985. Phenolic constituents in the leaves of Northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 33: 213-217

Kang S. I., Kim M. H., Shin H. S., Kim H. M., Hong Y. S., Park J. G., Ko H. C., Lee N. H., Chung W. S y S. J Kim. 2010. A water-soluble extract of *Petalonia binghamiae* inhibits the expression of adipogenic regulators in 3T3-L1 preadipocytes and reduces adiposity and weight gain in rats fed a high-fat diet. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 21: 1251-1257.

Knopp R. H., Retzlaff B., Aikawa K y S. E Kahn. 2003. Management of patients with diabetic hyperlipidemia. *American Journal of Cardiology*. 91: 24-28.

Kurihara H., Ando J., Hatano M y J. Kawabata. 1995. Sulfoquinovosyldacylglycerol as an alpha-glucosidase inhibitor. *Bioorganic Medical Chemistry*. 5: 1241-1244

- Kurihara H., Mitani T., Kawabata J y K. Takahashi. 1999. Inhibitory potencies of bromophenols from Rhodomelaceae algae against α -glucosidase activity. *Fishery Sciences*. 65: 300-303.
- Kurihara H., Mitani T., Kawabata J y K. Takahashi. 1999. Two new bromophenols from red alga *Odonthalia cormbifera*. *Journal of Natural Products*. 62: 882-884.
- Kostetsky E. Y., Goncharova S. N., Sanina N. M y V. L Shnyrov. 2004. Season influence on lipid composition of marine macrophytes. *Botánica Marina*. 4: 134-139
- Kilo C. 1987. Vascular complications of diabetes. *Cardiovascular Reviews & Reports*. 8:18-24.
- Kim A. R., Shin T. S., Lee, M. S., Park J., Park K. E y N. Y Yoon. 2009. Isolation and identification of phlorotannins from *Ecklonia stolonifera* with antioxidant and anti-inflammatory properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 3483-3489.
- King H., Aubert R. E y W. H Herman. 1998. Global burden of diabetes, 1995-2025. *Diabetes Care*. 21: 1414-1431.
- Kiriyama S., Okazaki Y y A. Yoshida. 1968. Hypocholesterolemic effect of polysaccharides and polysaccharide foodstuffs in cholesterol fed rats. *Journal of Nutrition*. 97: 382-388.
- Knopp R. H., Retzlaff B., Aikawa K y S. E Kahn. 2003. Management of patients with diabetic hyperlipidemia. *American Journal of Cardiology* 91: 24 - 28.
- Kurata K., Taniguchii K., Takashima K., Hayashi I y M. Suzuki. 1997.

- Feeding-deterrent bromophenols from *Odonthalia corymbifera*. *Phytochemistry*. 45: 485-487.
- Kwon, M. J y T. J Nam. 2007. A polysaccharide of the marine alga *Capsosiphon fulvescens* induces apoptosis in AGS gastric cancer cells via an IGF-IR-mediated PI3K/Akt pathway. *Cell Biology International*.31: 768–775.
- Lamela M., Awca J., Villar R., Otero J y J. M Calleja. Hypoglycemic activity of several seaweed extracts. 1989. *Journal of Ethnolopharmacology*. 27: 35-43.
- Lee KBB., Bae M y M. Jang. 1999. Effect of sea tangle and metformin on lipid peroxide and antioxidants levels in diabetic rats. *Korean Journal of Nutrition*. 32: 230-238.
- Lee S. H., Han J. S., Heo S. J., Hwang J. Y y Y. J Jeon. 2010. Protective effects of dieckol isolated form *Ecklonia cava* against high glucose-induced oxidative stress in human umbilical endothelial cells. *Toxicology In Vitro*. 24: 375-381.
- Lee S. H., Li Y., Karadeniz F., Kim M. M y S. K Kim. 2008. α -Glucosidase and amylase inhibitory activities of phloroglucinol derivatives from edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 89: 1552-1558.
- Lerman Garber I y J. A Rull Rodrigo. 2001. Epidemiology of diabetes in Mexico and associated coronary risk factors. *Israel Medical Association Journal*. 3: 369-373.
- Lieberman M. M., Patterson G. M y R. E Moore. 2001. In vitro bioassays for

anticancer drug screening: Effects of cell concentration and other assay parameters on growth inhibitory activity. *Cancer Letters*. 173: 21-29.

Littler D. S y M. M Littler. 2000. Caribbean Reef Plants. OffShore Graphics, Washington. 541 p.

Lloyd-Jones D. M., Leip E. P y M. G Larson. 2006. Prediction of lifetime risk for cardiovascular disease by risk factor burden at 50 years of age. *Circulation*. 113: 791-798.

Mabeau S y J. Fleurence. 1993. Seaweed in food products: Biochemical and nutritional aspects. *Trends Food Science & Technology*. 4: 103-107.

Mac Millan C., O. Zapata y L. Escobar. 1980. Sulphated phenolic compounds in seagrasses. *Aquatic Botany*. 8: 267-278.

Mans D. R., da Rocha A. B y G. Schwartzmann. 2000. Anticancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist*. 5:185-198.

Marfaing H y Y. Lerat. 2007. Les algues ont-elles une place en nutrition? *Phytothérapie*. 5: 2-5.

Matanjun P., Mohamed S., Kharidah M y M. M Noordin. 2010. Comparison of cardiovascular protective effects of tropical seaweeds, *Euचेuma cottonii*, *Caulerpa lentillifera*, and *Sargassum polycystum*, on high-cholesterol/high-fat diet in rats. *Journal of Medicinal Food*. 4: 792-800.

McAnuff M. A., Omoruyi F. O., Morrison E. Y y H. N Asemota. 2003. Hepatic function enzymes and lipid peroxidation in streptozotocin induced diabetic rats fed bitter yam (*Dioscorea polygonoides*) steroidal saponin extract,

Diabetología Croatica. 32: 17-22.

Monereo S., Pavón I., Vega B., Elviro R y M. Durán. 1999. Complicaciones de la diabetes mellitus: Impacto sobre los costes hospitalarios. *Endocrinología y Nutrición*. 46: 46-55.

Monks A., Scudiero D y P. Skehan. 1991. Feasibility of a High flux anticancer drug screening using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*. 83: 757-766.

Moo-Puc R., D Robledo y Y. Freile-Pelegrín. 2009. Actividad citotóxica y antiproliferativa *in vitro* de macroalgas marinas de Yucatán, México. *Ciencias Marinas*. 35: 345-358.

Morley J. E. 2008. Diabetes and aging: epidemiologic overview. *Clinics in Geriatric Medicine*. 24: 395-405.

Morantes S. J., Páez A., Cordero C. P., Rincón J y F. A Aristizabal. 2006. Actividad citotóxica y análisis fitoquímico de fracciones aisladas del extracto etanólico total de *Acnistus arborescens*. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 25 : 491-496.

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*. 65: 55-63.

Moteshakeri M., Ebrahimi M y S. Mohamed. 2011. Hypoglycemic and Hypolipidemic Effects of Seaweed (*Sargassum polycystum*) Ethanolic and Water Extracts in Type II Diabetic Rats. *UMTAS 2011. Empowering Science, Technology and Innovation Towards a Better Tomorrow*. 827-830.

Nelson M. M., Phleger C. F & P. D Nichols. 2002. Seasonal lipid

composition in macroalgae of the Northeastern Pacific Ocean. *Botánica Marina*. 45: 58-65.

Nishide E y H. Uchida. 2003. Effects of *Ulva* powder on the ingestion and excretion of cholesterol in rats, Proceedings of the 17th International Seaweed Symposium. Eds. A.R.O. Chapman, R.J. Anderson, V.J. Vreeland y I. R Davisons. Oxford University Press, Oxford. pp. 165-168.

Nuissier G., Rezzonico B y M. Grignon-Dubois. 2008. Bioactive agents from beach waste: *Syringodium flotsam* evaluation as a new source of l-chiro-inositol. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 9: 396-400.

Nuissier G., Rezzonico B y M. Grignon-Dubois. 2010. Chicoric acid from *Syringodium filiforme*. *Food Chemistry*. 120: 783-788.

Nwosu F., Morris J., Lund V. A., Stewart D., Ross H. A y G. J McDougall. 2011. Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae. *Food Chemistry* 126: 1006-1012.

Okai YH-OK y S. Nakamura. 1993. Identification of heterogenous antimutagenic activities in the extract of edible brown seaweeds, *Laminaria japonica* (Makonbu) and *Undaria pinnatifida* (Wakame) by the umu gene expression system in *Salmonella typhimurium* (TA1535/pSK1002). *Mutation Research*. 303: 63-70.

Orozco E. O y P. V Gariglio. 2000. Bases moleculares del Cáncer, in: "Genética y Biomedicina Molecular", Editorial Limusa. Distrito Federal, México. pp 181-189.

Panlasigui L. N., Baello O. Q., Dimatangal J. M y B. D Dumelod. 2003. Blood cholesterol and lipid-lowering effects of carrageenan on human volunteers.

Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. 12: 209-214.

Pesando D y B. Caram. 1984. Screening of marine algae from the French Mediterranean coast for antibacterial and antifungal activity. *Botanica Marina*. 27: 381-386.

Pengzhan Y., Ning L., Xiguang L., Gefei Z., Quanbin Z y L. Pengcheng. 2003. Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Pharmacological Research*. 48: 543–549

Phillips R. C. 1960. Observations on the ecology and distribution of the Florida seagrasses. Florida State Board of Conservation, Marine Laboratory. Prof. Pap. Ser., 2, St. Petersburg. pp 72.

Pineda C. A. 2008. Síndrome metabólico: definición, historia, criterios. *Colombia Médica*. 39: 96-106.

Polat S y Y. Ozogul. 2013. Seasonal proximate and fatty acid variations of some seaweeds from the northeastern Mediterranean coast. *Oceanología*. 375-391.

Prieto S. O y F. A Aristizabal. 2009. Perfil de sensibilidad de Hep-G2 como modelo para evaluación de actividad citotóxica de xenobióticos bioactivados vía CYP450. *VITAE. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 16: 219-227.

Qin B., Nagasaki M., Ren M., Bajotto G., Oshida Y y Y. Sato. 2002. Cinnamon extract (traditional herb) potentiates in vivo insulin-regulated glucose utilization via enhancing insulin signaling in rats. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 62:139-148.

Ranilla L. G., Kwon Y. I., Apostolidis E y K. Shetty. 2010. Phenolic compounds antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology*. 101: 4676-4689.

Ramírez-Mares M. V., Fatell S., Treviño S. V y E. González de Mejía. 1999. Protection of extract from leaves of *Ardisia compressa* against benomyl-induced cytotoxicity and genotoxicity in cultured rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro*. 13: 889-896.

Rajeswari P., Natarajan R., Nadler J. L., Kumar D y V. K Kalra. 1991. Glucose induces lipid peroxidation and inactivation of membrane-associated ion-transport enzymes in human erythrocytes in vivo and in vitro. *Journal of Cell Physiology*. 149:100-109.

Raghavendra B., Rao H., Sathivel A y T. Devaki. 2004. Antihepatotoxic nature of *Ulva reticulata* on acetaminophen induced hepatotoxicity in experimental rats. *Journal of Medicinal Food*. 7: 495-497.

Regalado E. L., Rodríguez M., Menéndez R., Concepción C., Nogueiras-Laguna A. A., Rodríguez D. E., Williams P., Lorenzo-Luaces O., y Y. Hernández. 2009. Repair of UVB-damaged skin by the antioxidant sulphated flavone glycoside thalassiolin B isolated from the marine plant *Thalassia testudinum* Banks ex König. *Marine Biotechnology*. 11: 74-80.

Peterson G. L. 1979. Review of the Folin protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall, *Analytical biochemistry*.100: 201-220.

Repetto M. 2002. Métodos alternativos. Toxicidad in vitro, in: Toxicología Fundamental. Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group. Tercera edición; Sevilla, España. pp 303-305.

Rodríguez B. M., Carrillo D. S., Pérez-Gil R. F., Ávila G. E y V. M Casas. 1995. Efecto sobre la calidad del huevo y cascarón al incluir algas marinas *Sargassum sinicola* y *Ulva lactuca* en raciones para ponedoras. XX Convención de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Acapulco, Guerrero, México.

Rodríguez-Bernaldo de Quiros A., Lage-Yusty M. A y J. López Hernández. 2010. Determination of phenolic compounds in macroalgae for human consumption. *Food Chemistry*. 121: 634-638.

Rodríguez-Yunta E. 2007. Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta Bioethica*. 13: 25-40.

Ros E y J. C Laguna. 2006. Tratamiento de la hipertrigliceridemia: fibratos frente a ácidos grasos omega-3. *Revista Española de Cardiología*. 6:52-61.

Rusche B. 2003. The 3Rs and animal welfare-conflict or the way forward? *Alternative to Animal Experimentation*. 20: 63-76.

Sansón M y J. Reyes. 1996. Sobre la morfología de *Spyridia filamentosa* y *Spyridia hypnoides* en las Islas Canarias (Rhodophyta, Ceramiaceae). *Viaraea* 25: 37-44.

Sanchez-Machado D. I., Lopez-Cervantes J., Lopez-Hernandez J y P. Paseiro-Losada. 2004. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chemistry*. 85: 439-444.

Saudek C. D y H. A Eder. 1979. Lipid metabolism in diabetes mellitus.

American Journal of Medicine. 66: 843-852.

Sausville E. A y J. I Johnson. 2000. Molecules for the millennium: How will they look? New Drug Discovery year 2000. *British Journal of Cancer*. 83: 1401-1406.

Schneider C. W y R. B Searles. 1991. Seaweeds of the Southeastern United States: Cape Hatteras to Cape Canaveral. Duke University Press, Durham. 553 p.

Schnetter R y G. Bula-Meyer. 1982. Algas marinas del litoral Pacífico de Colombia. Ed. Gantner Verlag, Alemania. 287 p.

Sentíes-Granados A y M. T Fujii. 2002. El complejo Laurencia (Rhodomelaceae, Rhodophyta) en el Caribe mexicano. *Monografías Ficológicas* 1: 77-112.

Shaw A. 1994. Definiendo viabilidad celular y citotoxicidad. *ATLA*, 2. 124 – 126 pp.

Silva P. C., Menez, E. y R. L Moe. 1987. Catalog of the Benthic Marine Algae of the Philippines. *Smithsonian Contributions to the Marine Sciences* No. 27.

Silva P.C., Basson, P.W y R.L Moe. 1996. Catalogue of the Benthic Marine Algae of the Indian Ocean. *University of California Publications in Botany*, Berkeley.

Silverberg A. B y K. P Ligaray. 2008. Oral diabetic medications and the geriatric patient. *Clinics in Geriatric Medicine*. 24:541-549.

Skulas-Ray A. C., West S. G., Davidson M. H y P. M Kris-Etherton. 2008. Omega-3 fatty acid concentrates in the treatment of moderate

hypertriglyceridemia. *Expert Opin Pharmacother.* 9:1237-1248

Smith C. M y L. J Walters. 1999. Fragmentation as a strategy for *Caulerpa* species: Fates of fragments and implications for management of an invasive weed. *Marine Ecology* 20: 307-319.

Sotomayor H. 1999. Efectos antitumorales in vivo de los del aceite de hígado de tiburón *Galeocerdo cuvieris* y del 1-O-hexadecilglicerol sintético. Tesis para el título de Maestro en Ciencias. Facultad de Biología. Universidad de la Habana. pp 31-49.

Sotomayor H., Ikasem M., Navarro V., García J., Álvarez José., González F y Y. Rodríguez. 2006. Citotoxicidad de 1-O-decilglicerol y 1-O-dodecilglicerol sintéticos sobre carcinoma humano de mama MCF-7. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 25: 339-343.

Stegenga H., Bolton J y R. Anderson. 1997. Seaweeds of the south African West Coast. Contrib. Bolus Herbarium No. 18, Cape Town.

Strong K., Mathers C., Leeder S y R. Beaglehole. 2005. Preventing chronic diseases: how many lives can we save. *Lancet.* 366: 1578-1582.

Suffness M y J. M Pezzuto. 1990. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann K (ed.), *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity.* Vol. 6. Academic Press, London. pp 71–133.

Takimoto C. H. 2003. Anticancer drug development at the US National Cancer Institute. *Cancer Chemotherapy Pharmacology.* 52: 29-33.

Tamez H., Gutiérrez H y J. Cedillo. 2007. Tratamiento con insulina en paciente hospitalizado con diabetes mellitus tipo 2. ¿Única opción? *Medicina Interna de México.* 23: 196-199.

Tewari N., Tiwari V. K., Mishra R. C., Tripathi R. P., Srivastava A. K., Ahmad R., Srivastava R y B. S Srivastava. 2003. Synthesis and bioevaluation glycosyl ureas as alpha-glucosidase inhibitors and their effect on mycobacterium. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 11: 2911-2922.

Tiedge M., Hohne M y S. Lenzen. 1993. Insulin secretion, insulin content and glucose phosphorylation in RIN m5 f insulinoma cells after transfection with human GLUT2 glucose transporter cDNA. *Biochemical Journal*. 296: 113-118.

Torre-Castro M y P. Rönnbäck. 2004. Links between humans and seagrasses an example from tropical East Africa. *Ocean Coast Manage*. 47: 361-387.

Torre-Núñez E., Rodeiro-Guerra I., Menéndez-Soto R. y D. Pérez-Carrascol. 2012. *Thalassia testudinum*, una planta marina con potencialidades de uso terapéutico. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 17: 288-296

Trainor F. R. 1978. Introductory Phycology. John Wiley & Sons, New York. 525 p.

Triana-Mantilla M. E., Nelson Chirino-Carreño N., Fernández J., Montequín J. I., Zapata-Vinent J., Olga Morejón-Reinoso O., Adan-Simón D; Salgado-Boris L., Rodríguez-Pérez A y A. Fernández-Boloña. 2010. Glibenclamida y lipoproteínas modificadas en diabéticos tipo 2 con macroangiopatía. *Revista Cubana de Angiología y Cirugía Vascul*. 11: 76-88

Tzagournis. M y J. M Falko. 1982. Heart disease and cerebrovascular complications in diabetes. Edited by B. N. Brodoff, and S. J. Bleicher,

Williams and Wilkin Baltimore. Diabetes mellitus and obesity (1st edition), pp 741–748.

Unzueta-Montoya A., Torres-Y Gutiérrez Rubio A., Alberto Unzueta Jr A., Ordoñez-Toquero G., Hernández-Y Hernández H., Escobedo De La Peña J y P. Pérez-Reyes. 2000. Risk factors related to the occurrence of silent myocardial ischemia in Mexicans. *Clinical Cardiology*. 23: 248-252

Van den Hoek C., Mann D. G y H. M Jahns. 1998. Algae: An Introduction to Phycology Cambridge University Press, United Kingdom. 627 p.

Villalpando S., De la Cruz V y R. Rojas. 2010. Prevalence and distribution of type 2 diabetes mellitus in Mexican adult population: a probabilistic survey. *Salud Pública Mexicana*. 52: 19-26.

Wang C y G. Yang. 1997. Comparison of effects of two kinds of soluble algae polysaccharide on blood lipid, liver lipid, platelet aggregation and growth in rats. *Chinese Journal of Preventive Medicine*. 31: 342-345.

Waycot M., Duarteb C. M., Tim J. B., Carruthersc, Robert J. Orthd., William Dennisonc C., Olyarnike S., Calladinea A., James W., Fourqureanf K. L., Heck Jr.g,h., Hughese A. R., Kendrick G. A., Kenworthyj W. J, Shortk F. T y S. L Williams. 2009. Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. *PNAS*. 106: 12377–12381.

West J. A y H. P Calumpong. 1989. On the Reproductive Biology of *Spyridia filamentosa* in culture. *Botanica Marina*. 32: 379-387.

Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R y H. King. 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 27: 1047-1053.

Wong, C.K., Vincent E. C. Ooi y P. O Ang. 2004. Hepatoprotective effect of seaweeds' methanol extract against carbon tetrachloride-induced poisoning in rats. *Hydrobiologia*. 512: 267–270.

Womersley H.B.S. 1998. The Marine Benthic Flora of Southern Australia, part III C. State Herbarium of South Australia, South Australia.

Wynne, M. 1998. A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: first revision. *Nova Hedwigia*, 116: 1-155.

Xu N., Fan X., Yan X., Li X., Niu R y C.K. Tseng. 2003. Antibacterial bromophenols from the marine red algae *Rhodomela confervoides*. *Phytochemistry*. 62: 1221-1224.

Yearley S. 2009. The ethical landscape: identifying the right way to think about the ethical and societal aspects of synthetic biology research and products. *Journal of the Royal Society Interface*. 6: 559-564.

Yki J.H. 1990. Acute and chronic effects of hyperglycemia on glucose metabolism. *Diabetología*. 33: 579-585.

Yoshida, T. 1998. Marine Algae of Japan. Uchida Rokakuho, Tokyo. 1222 p.

Yuan, Y. V., Carrington, M. F y N.A Walsh. 2005. Extracts from dulse (*Palmaria palmata*) are effective antioxidants and inhibitors of cell proliferation in vitro. *Food and Chemical Toxicology*. 43: 1073-1081.

Yuan, Y. 2008. Marine algal constituents. en: *Marine nutraceuticals and functional foods*. Eds. C. Barrow y F. Shahidi. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. 259 p.

Yusuf S., Reddy S., Ôunpuu S y S. Anand. 2001. Global Burden of Cardiovascular Diseases. Part I: General Considerations, the Epidemiologic

Transition, Risk Factors, and Impact of Urbanization. *American Heart Association*. 104: 2746-2753.

Zapata, O y C. Mac Millan. 1979. Phenolic acids in seagrasses. *Aquatic Botany*. 7: 307-317.

Zhang J., Tiller, C., Shen J., Wang C., Girraud G. S y D. Dennis. 2007. Antidiabetic properties of polysaccharide- and polyphenolic-enriched fractions from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 85: 1115-1123.

<http://www.chemspider.com>