



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA  
UNIDAD ENSENADA

**Análisis del efecto antilipidémico de extractos orgánicos  
de las algas marinas *Egrecia menziesii* y *Undaria  
pinnatifida***

Que para obtener el grado de:  
Maestría en Ciencias e Ingeniería

Presenta:

Bioing. Adilene Viridiana Colores Mendoza

Directora de tesis:

Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez

Co-Directora de tesis:

Dra. Tatiana Nenzen Olivares Bañuelos

Ensenada, Baja California, Agosto 2024



**CONAHCYT**  
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES  
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO**

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA**

**Análisis del efecto antilipidémico de extractos orgánicos de las  
algas marinas *Egrecia menziesii* y *Undaria pinnatifida***


**TESIS**

Que para obtener el grado de Maestría en Ingeniería en Ciencias presenta:

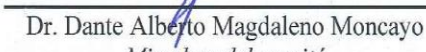
**Adilene Viridiana Colores Mendoza**

Aprobada por:

  
Dra. Claudia M. Gómez Gutiérrez  
*Director de tesis*

  
Dra. Tatiana Nenetzen Olivares Bañuelos  
*Codirector de tesis*

  
Dr. Rubén César Villarreal Sánchez  
*Miembro del comité*

  
Dr. Dante Alberto Magdaleno Moncayo  
*Miembro del comité*

Ensenada Baja California, México. Agosto, 2024

# Índice

## Resumen

<b>1. Introducción</b> .....	<b>7</b>
<b>2. Justificación</b> .....	<b>9</b>
<b>3. Antecedentes</b> .....	<b>9</b>
3.1 Obesidad.....	9
3.1.2 Síntomas de la obesidad.....	12
3.2 Diagnóstico de la obesidad.....	12
3.3 Etiología de la obesidad.....	14
3.3.1 Factores biológicos .....	15
3.3.2 Factores ambientales.....	17
<b>3.3.3 Factores de comportamiento.....</b>	<b>18</b>
3.4 Tratamiento de la obesidad y sobrepeso en adultos .....	19
3.5 Uso de plantas medicinales en México.....	21
3.6 Macroalgas marinas.....	22
3.6.1 Clasificación de las macroalgas marinas.....	23
3.7 Uso de las macroalgas marinas: beneficios en la salud del humano .....	25
3.8 Efectos antilipídemicos de las macroalgas .....	27
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>30</b>
4.1 General .....	30
4.2 Específicos.....	30
<b>5. Hipótesis.....</b>	<b>31</b>
<b>6. Metodología.....</b>	<b>31</b>
<b>6.1 Recolección e identificación de Egregia menziesii y Undaria pinnatifida.....</b>	<b>31</b>
6.2 Elaboración de extractos orgánicos y acuosos de Egregia menziesii y Undaria pinnatifida.....	32
6.3 Determinación de DL50 en Artemia salina y en eritrocitos humanos .....	35
6.3.1 Artemia salina .....	36
6.3.2 Eritrocitos humanos .....	37
6.4 Ensayos celulares en 3T3-NIH .....	40
6.4.1 3T3-NIH línea celular .....	40
6.4.2 Cultivo de células 3T3-NIH .....	40
6.4.3 Diferenciación de fibroblasto en adipocito .....	40
6.4.4 Morfometría celular .....	42
6.4.5 Ensayos de MTT .....	43
6.5 Análisis estadístico.....	44
<b>7. Resultados y discusión.....</b>	<b>44</b>
7.1 Rendimientos de extractos de Egregia menziesii y Undaria pinnatifida .....	44
7.2 Evaluación de extractos en Artemia salina .....	47
7.3 Evaluación de extractos en eritrocitos humanos.....	51
7.4 Ensayos celulares en línea 3T3-NIH.....	53
7.4.1 Morfometría celular .....	53

7.4.2 Ensayo de MTT .....	63
<b>8. Conclusiones y perspectivas .....</b>	<b>68</b>
<b>9. Anexos .....</b>	<b>68</b>
9.1 Cambio de medio de cultivo, mantenimiento. ....	68
9.2 Tripsinización .....	69
9.3 Congelación de células .....	70
9.5 Tinción de rojo Oleoso .....	72
9.6 Protocolo para ensayo MTT .....	73
9.8 Vidrios tratados con Poli-L-lisina.....	74
9.9 Tablas estadísticas largo, ancho y área de células 3T3-NIH.....	74
<b>10. Referencias bibliográfica .....</b>	<b>76</b>

## Índice de Figura

Figura 1. Rangos para determinar el índice de masa corporal (IMC). .....	11
Figura 2. Principales causas de mortalidad en México según el INEGI en el periodo enero-junio 2023. ....	12
Figura 3. Balance de energía metabólica en humanos.....	16
Figura 4. El eje cerebro-intestino y la regulación de la ingesta de alimentos.. ....	17
Figura 5. La obesidad, como una enfermedad multifactorial.. ....	20
Figura 6. Lugar de acción de Orlistat, medicamento aprobado por la FDA . ....	22
Figura 7. Estructura de un alga marina. ....	23
Figura 8. Principales aplicaciones de las macroalgas entre 2010 y 2020, beneficios para la salud, bioactividad y aplicaciones potenciales .....	26
Figura 9. Efectos de las macroalgas sobre la salud y el bienestar humanos. ....	28
Figura 10. Mecanismos de acción antiobesidad descritos en estudios in vitro.....	28
Figura 11. Efectos de las macroalgas marinas en línea celular 3T3-L1. ....	28
Figura 12. Estructura Fucoidan (André, Bourbon & Serralheiro, 2021).....	30
Figura 13. Mapa de Campo 5 Cabo Punta Banda y Ejido Eréndira en Baja California, México.....	32
Figura 14. Proceso para obtener extractos metanólicos y acuosos de Egregia menziesii y Undaria pinnatifida.....	34
Figura 15. Visualización rápida del proceso de extracción metanólico y acuoso por el sistema Soxhlet de las especies Egregia menziesii y Undaria pinnatifida. ....	35
Figura 16. Sistema para eclosionar Artemia salina (a) y placas para ensayos (b).. ....	37
Figura 17. Ensayo de toxicidad en eritrocitos humanos.....	39
Figura 18. Proceso de diferenciación utilizado para las células 3T3-NIH de fibroblastos a células adiposas.....	41
Figura 19. Representación gráfica de los gramos de extracto seco contra el porcentaje de rendimiento para cada extracto de Egregia menziesii y Undaria pinnatifida.....	47
Figura 20. Representación gráfica de la sobrevivencia de Artemia salina expuesta 12 hrs a los extractos de Egregia menziesii y Undaria pinnatifida. ....	48
Figura 21. Representación gráfica de la sobrevivencia de Artemia salina expuesta 24 hrs a los extractos de Egregia menziesii y Undaria pinnatifida. ....	49
Figura 22. Representación gráfica de la sobrevivencia de Artemia salina expuesta 48 hrs a los extractos de Egregia menziesii y Undaria pinnatifida. ....	50
Figura 23. Mediciones de densidad óptica (DO) a 540 nm de hemoglobina libre.....	52
Figura 24. Microfotografías de células 3T3-NIH diferenciadas expuestas a distintos tratamientos.....	56
Figura 25. Mediciones del largo de las células 3T3-NIH diferenciadas tratadas con distintos extractos de macroalgas y con sus respectivos grupos control.....	58
Figura 26. Mediciones de ancho de las células 3T3-NIH diferenciadas tratadas con distintos extractos de macroalgas y con sus respectivos grupos control.....	60
Figura 27. Mediciones de área de las células 3T3-NIH diferenciadas tratadas con distintos extractos de macroalgas y con sus respectivos grupos control.....	62
Figura 28. Viabilidad de las células 3T3-NIH diferenciadas tratadas con distintos extractos de macroalgas y con sus respectivos grupos control.. ....	65

## Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de las macroalgas y sus pigmentos. ....	26
Tabla 2. Grupos experimentales y sus abreviaturas. ....	36
Tabla 3. Concentraciones y controles para ensayo en eritrocitos humanos. ....	38
Tabla 4. Agentes pro diferenciativos. ....	39
Tabla 5. Peso seco total de Egregia menziesii y Undaria pinnatifida. ....	45
Tabla 5. Ensayos realizados en línea celular 3T3-NIH. ....	41
Tabla 6. Peso seco total de Egregia menziesii y Undaria pinnatifida. ....	44
Tabla 7. Cálculos para rendimiento en porcentaje respecto al peso seco inicial. ....	45
Tabla No. 8 Prueba de D'Agostino & Pearson y Shapiro-Wilk para datos de largo en células 3T3-NIH. ....	73
Tabla No. 9 Prueba de D'Agostino & Pearson y Shapiro-Wilk para datos de ancho en células 3T3-NIH. ....	73
Tabla. No 01. Prueba de D'Agostino & Pearson y Shapiro-Wilk para datos de área en células 3T3-NIH. ....	74
Tabla No. 11 Prueba de D'Agostino & Pearson y Shapiro-Wilk para datos de ensayo MTT en células 3T3-NIH. ....	74

## **Análisis del efecto antilipidémico de extractos orgánicos del alga marina *Egregia menziesii* y *Undaria pinnatifida***

---

### **Resumen**

En búsqueda de productos naturales que puedan ayudar al tratamiento de problemas como la obesidad y enfermedades asociadas, como la diabetes, enfermedades cardiovasculares, entre muchas más, se realizaron extractos metanólicos y acuosos de dos macroalgas pardas del pacífico mexicano *Egregia menziesii* y *Undaria pinnatifida*. Se evaluó la letalidad de estos compuestos en *Artemia salina* y eritrocitos donde no presentaron una letalidad significativa a 1000  $\mu\text{g/mL}$ . En conjunto se evaluó el efecto que los extractos metanólicos y acuosos presentaron al ser expuestos a la línea celular NIH/3T3 a una concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , se observaron cambios significativos en la morfología de estas células y se reportó que entre el 90-100% de viabilidad de las células NIH/3T3 se observaron en los grupos de ácido cítrico, tetrahidrolipstatina y control, para el fucoïdan, Em-Met, y Up-Ac tuvieron un porcentaje de viabilidad entre el 50% y el 60%, para el grupo de Up-Met presentó un porcentaje menor al 30% y los grupos tratados con ácido palmítico y Em-Ac presentaron una viabilidad casi nula menor al 1%. Estos resultados sugieren que el cambio morfológico es importante para la evaluación de los extractos orgánicos y la viabilidad que presentan.

**Palabras clave:** Macroalgas pardas; Obesidad; Compuestos bioactivos; Fucoïdan

## 1. Introducción

En México, el uso y conocimiento de plantas medicinales se desarrolló en las culturas prehispánicas y actualmente se acentúa esta práctica por tres razones: la atención a sus enfermedades, la extensa flora, así como una amplitud en número de grupos indígenas que conservan sus propias tradiciones. Debido a esto, el país presenta las condiciones óptimas para la identificación de plantas que podrían fungir como base para el desarrollo de fitofármacos para el tratamiento de distintas patologías (Castro Juárez et al., 2014).

En los últimos años los productos naturales y sus derivados han atraído la atención de la comunidad científica como fuente natural y novedosa de compuestos con potencial uso en la industria farmacéutica, cosmética e incluso alimentaria. Numerosos estudios han demostrado que la ingesta de estos metabolitos con propiedades bioactivas, están asociadas con un menor riesgo en el desarrollo de diversas condiciones crónicas (ej. obesidad, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas) incluso la eliminación del patógeno en enfermedades infecciosas (Batista González et al., 2009; Paola Alejandra Tenorio et al., 2018; Restrepo Garzón, 2015).

Dentro de este grupo de plantas se encuentran las algas marinas. Las algas son organismos autótrofos de estructura simple, con escasa o nula diferenciación celular y de tejidos complejos por lo que son talofitas. Taxonómicamente las macroalgas se clasifican en tres grupos: Chlorophyta o clorofitas, Phaeophyta o feofitas y Rhodophyta o rodofitas, que corresponden a algas verdes, pardas y rojas respectivamente, nombres dados porque presentan pigmentos que predominan sobre los otros (Gutiérrez Cuesta et al., 2016). Las algas marinas se han consumido en Asia desde tiempos remotos, mientras que en países occidentales su principal aplicación ha sido como agente gelificante y coloide para la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética. Las algas son buena fuente de nutrientes como proteínas, vitaminas, minerales y fibra dietética, siendo la fibra dietética de algas particularmente rica en fracción soluble (Quitral R et al., 2012). Si se comparan las algas con vegetales terrestres, se encuentran más componentes beneficiosos para la salud en las primeras, como ácidos grasos omega-3 y moléculas bioactivas. Además, las algas sintetizan diversos metabolitos secundarios que presentan actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena y antidiabética (Ibáñez & Herrero, 2017).

Así, las algas se pueden considerar una fuente natural de gran interés ya que contienen compuestos con numerosas actividades biológicas y pueden ser usadas como ingrediente funcional en muchas aplicaciones industriales como en alimentos funcionales(Olivares-Bañuelos et al., 2019), lo que las convierte en interesantes objetos de estudio.

Considerando el gran potencial de las macroalgas y los problemas de salud relacionados con la obesidad, este trabajo tiene como objetivo principal investigar el efecto antilipídémico de extractos de las macroalgas marinas *Egregia menziesii* y *Undaria pinnatifida*. El conocimiento generado sobre los posibles compuestos con potencial farmacológico para tratar problemas de salud pública como la obesidad, aportará información en la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos contra enfermedades de importancia en nuestro país y en el mundo.

## **2. Justificación**

En México existe una alta tasa de enfermedades relacionadas con la obesidad, cómo la diabetes y la hipertensión, las cuales son enfermedades de salud pública que representan un serio problema en la población de nuestro país. Por lo tanto, es necesario buscar alternativas médicas y nutricionales que disminuyan la acumulación de lípidos y contribuyan a reducir dichos padecimientos. Una de las alternativas que se exploran en la actualidad es buscar compuestos activos de fuentes naturales, los cuales pueden ser consumidos directamente cómo parte de la dieta alimenticia, o bien cómo suplementos o medicamentos que ayuden a reducir dicho problema de salud. En este sentido, las macroalgas marinas representan una importante fuente de compuestos bioactivos con potencial médico. Considerando esto, en el presente proyecto se plantea analizar y evaluar el efecto antilipidémico de extractos de las algas marinas *Egrecia menziesii* y *Undaria pinnatifida* para probar si es posible que el consumo de estas macroalgas tenga beneficios en la salud humana. Además de ayudar a la población a mejorar sus condiciones de vida, los resultados de investigación tendrán también un impacto favorable a los gastos médicos que estas enfermedades generan, tanto a los centros de salud, cómo a los familiares que se encuentren en relación.

## **3. Antecedentes**

### **3.1 Obesidad**

En México el 70% de los mexicanos padece sobrepeso y casi una tercera parte sufre de obesidad, además, esta enfermedad se asocia principalmente con la diabetes y enfermedades cardiovasculares, pero también con trastornos óseos y musculares y algunos tipos de cáncer (Barquera & Rivera, 2020). Los hábitos alimenticios poco saludables y la falta de ejercicio ocasionan el 32% de las muertes de mujeres y el 20% de hombres en el país (La Obesidad En México, 2016).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) el desequilibrio entre el ingreso y el gasto de calorías es la causa fundamental de la obesidad y el sobrepeso: una acumulación anormal y excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. El Índice de Masa Corporal (IMC) es uno de los criterios más importantes para

conocer las condiciones de nutrición, desnutrición, peso adecuado, sobrepeso y obesidad en las personas (Figura 1). Considera tres factores: sexo, peso actual y estatura.

Sobrepeso y obesidad de acuerdo al Índice de Masa Corporal (IMC)	
IMC	
<b>Sobrepeso</b>	Igual o mayor a 25 kg/m <sup>2</sup> y menor a 29.9 kg/m <sup>2</sup> y en las personas adultas de estatura baja, igual o mayor a 23 kg/m <sup>2</sup> y menor a 25 kg/m <sup>2</sup>
<b>Obesidad:</b>	Igual o mayor a 30 kg/m <sup>2</sup> y en las personas adultas de estatura baja igual o mayor a 25 kg/m <sup>2</sup>

Nota. Se considera talla baja a la clasificación que se hace como resultado de la medición de estatura menor a 1.50 metros en la mujer adulta y menor de 1.60 metros para el hombre adulto.

Fuente: Norma Oficial Mexicana NOM-174-SSA1-1998

**Figura 1.** Rangos para determinar el índice de masa corporal (IMC) (Obesidad y Sobrepeso. Menos Kilos, Más Vida, 2021).

Estimaciones realizadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) desde 1975, indican que la obesidad se ha casi triplicado en todo el mundo; en 2016 más de 1900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso, de los cuales, más de 650 millones eran obesos.

La obesidad y el sobrepeso son enfermedades crónico-degenerativas que deben ser tratadas por un médico, idealmente por un médico bariatra, un especialista que atiende este tipo de padecimientos que conllevan a otros como la diabetes, hígado graso e hipertensión (Figura 2). Todo tiene su precio y comer calorías en exceso además del impacto en la salud, deteriora la economía, ya sea en el corto o mediano plazo (Obesidad y Sobrepeso. Menos Kilos, Más Vida, 2021).

Rango	Total	Hombre	Mujer
1	Enfermedades del corazón 97 187 En 2022 fueron 105 752	Enfermedades del corazón 51 184 En 2022 fueron 57 040	Enfermedades del corazón 45 995 En 2022 fueron 48 702
2	Diabetes mellitus 55 885 En 2022 fueron 59 568	Diabetes mellitus 27 469 En 2022 fueron 29 871	Diabetes mellitus 28 415 En 2022 fueron 29 696
3	Tumores malignos 45 409 En 2022 fueron 44 322	Tumores malignos 21 529 En 2022 fueron 21 266	Tumores malignos 23 880 En 2022 fueron 23 054
4	Enfermedades del hígado 19 819 En 2022 fueron 20 547	Accidentes 14 858 En 2022 fueron 14 413	Enfermedades cerebrovasculares 8 682 En 2022 fueron 9 115
5	Accidentes 19 230 En 2022 fueron 18 648	Enfermedades del hígado 14 313 En 2022 fueron 15 030	Influenza y neumonía 7 258 En 2022 fueron 7 094
6	Enfermedades cerebrovasculares 17 766 En 2022 fueron 18 550	Agresiones (homicidios) 13 270 En 2022 fueron 14 020	Enfermedades del hígado 5 503 En 2022 fueron 5 513
7	Influenza y neumonía 16 386 En 2022 fueron 17 103	Influenza y neumonía 9 128 En 2022 fueron 10 004	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas 4 803 En 2022 fueron 4 404
8	Agresiones (homicidios) 15 082 En 2022 fueron 16 316	Enfermedades cerebrovasculares 9 081 En 2022 fueron 9 434	Accidentes 4 353 En 2022 fueron 4 190
9	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas 9 953 En 2022 fueron 9 394	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas 5 149 En 2022 fueron 4 990	Insuficiencia renal 3 454 En 2022 fueron 3 003
10	Insuficiencia renal 7 800 En 2022 fueron 6 897	Insuficiencia renal 4 346 En 2022 fueron 3 894	Septicemia 1 876 En 2022 fueron 1 664

**Figura 2.** Principales causas de mortalidad en México según el INEGI en el periodo enero-junio 2023 (ESTADÍSTICAS DE DEFUNCIONES REGISTRADAS (EDR), 2024).

En la actualidad, la obesidad plantea un dilema. Se consideraba históricamente un problema de los países de altos ingresos, pero hoy los casos están aumentando en los países de ingresos medianos e incluso bajos. En África, el número de menores de 5 años con sobrepeso aumentó un 23% desde el año 2000, según datos de la OMS (Obesidad y Sobrepeso, 2024). Hay países que tienen que luchar a la vez contra dos dramas vinculados a la malnutrición: la desnutrición y también, y cada vez más, la obesidad.

Un estudio realizado en 2014 por el McKinsey Global Institute ya contabilizaba el costo de la obesidad como la tercera carga social que más dinero cuesta en el mundo, después del tabaquismo y la violencia y conflictos armados (La Obesidad y Su Impacto En Los Sistemas de Salud, 2019). Cada año, los sistemas de salud del

mundo gastan un total aproximado de 2 mil millones de dólares en el tratamiento de la obesidad. Otros datos muestran que, a mayor índice de masa corporal, aumenta proporcionalmente el costo de la atención médica (Coutinho, 1999). El mismo estudio de McKinsey plantea la necesidad de establecer estrategias entre todos los actores, tanto públicos como privados, vinculados para atacar el problema de la obesidad (La Obesidad y Su Impacto En Los Sistemas de Salud, 2019; Vilaboa Arroniz et al.,2023).

### **3.1.2 Síntomas de la obesidad**

Alguno de los síntomas que produce la obesidad están provocados por el propio aumento del peso corporal y por las consecuencias y complicaciones que esto conlleva, responsables de la reducción en la expectativa de vida del obeso(Lean, 2000). Entre las características de la obesidad destaca lo siguiente:

- Cansancio y dificultad para el desarrollo de tareas cotidianas con limitaciones frecuentes inducidas por la obesidad
- Complicaciones metabólicas como la diabetes mellitus, aumento de triglicéridos, colesterol y ácido úrico
- Disminución a la tolerancia al esfuerzo
- Favorece la aparición de hipertensión arterial y supone un factor de riesgo vascular para el desarrollo de insuficiencia coronaria y de accidentes vasculares cerebrales
- Complicaciones articulares, especialmente en caderas y rodillas, limitando la actividad física

El exceso de peso es muy importante, puede originar el síndrome de apnea del sueño, el cual reduce el nivel de oxígeno de la sangre y provoca sufrimiento de los tejidos del organismo. Además, los obesos presentan con mayor frecuencia litiasis biliar, esteatosis hepática y hernia de hiato (Silva Froján, n.d.).

### **3.2 Diagnóstico de la obesidad**

No hay síntomas específicos del sobrepeso y la obesidad. El médico puede diagnosticar sobrepeso y obesidad en función de los antecedentes médicos y el índice de masa corporal (IMC) (Perea Martínez, 2014). Para esto se debe tener en cuenta:

1. Historia clínica y dietética personalizada elaborada por especialistas del Departamento de Endocrinología y Nutrición. Se le realizará una historia clínica detallada y las pruebas oportunas de medición: peso, talla y otras medidas complementarias como el perímetro de cintura, pliegue cutáneo, etc.
2. Medición de grasa corporal y una calorimetría indirecta, que permite conocer de manera individualizada el gasto energético de cada paciente.
3. Otras pruebas diagnósticas. Cuando el paciente presenta patologías asociadas, es imprescindible conocer el estado de cada enfermedad para plantear el mejor tratamiento. Para ello, el especialista indicará la realización de otras pruebas como el estudio polisomnográfico, pruebas cardiológicas, ecografía abdominal y densitometría ósea (Silva Froján, n.d.).

### **Índice de masa corporal (IMC)**

El IMC es una medida de la grasa corporal en función del peso y la estatura. Es importante saber que el índice de masa corporal es una herramienta de detección y no necesariamente diagnostica la cantidad de grasa corporal. Se usan otras medidas relacionadas, como la circunferencia de la cintura, para evaluar la salud de una persona y su riesgo de sobrepeso y obesidad (Bautista-Rodríguez et al., 2024).

### **Categorías de IMC**

Para adultos:

- Bajo peso corresponde a un IMC inferior a 18.5
- Peso saludable corresponde a un IMC entre 18.5 y 24.9
- Sobrepeso corresponde a un IMC entre 25 y 29.9
- Obesidad corresponde a un IMC de 30 o más

Para niños:

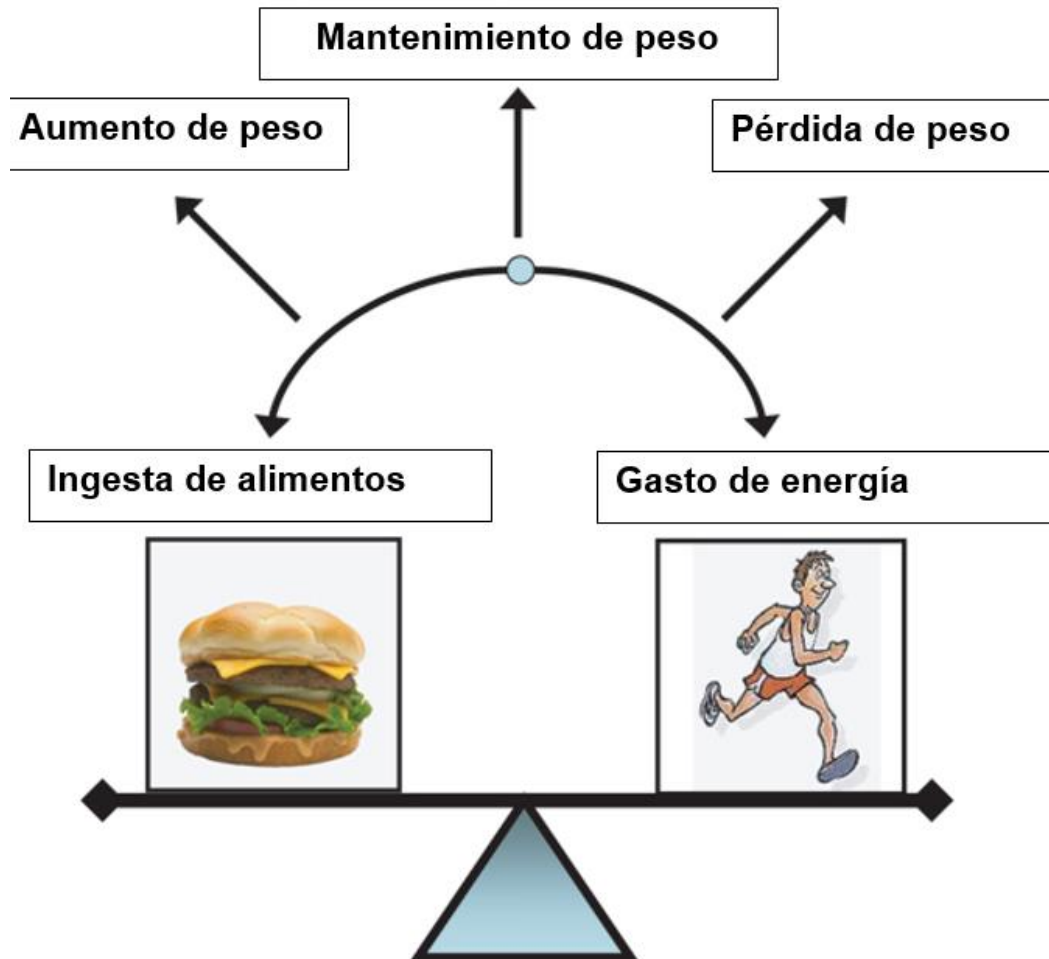
En los niños, la estatura y el peso se muestran en percentiles. El percentil de IMC de un niño se calcula comparando el IMC del niño con tablas de crecimiento para niños de la misma edad y el mismo sexo.

- Bajo peso corresponde a un IMC por debajo del percentil 5
- Peso saludable corresponde a un IMC entre el percentil 5 y el percentil 85
- Sobrepeso corresponde a un IMC entre el percentil 85 y el percentil 95
- Obesidad corresponde a un IMC por encima del percentil 95

El Grupo de Trabajo de Servicios Preventivos de los EE. UU. recomienda que los médicos hagan un examen de detección de obesidad en niños a partir de los 6 años (Sobrepeso y Obesidad; Síntomas y Diagnóstico, 2022).

### **3.3 Etiología de la obesidad**

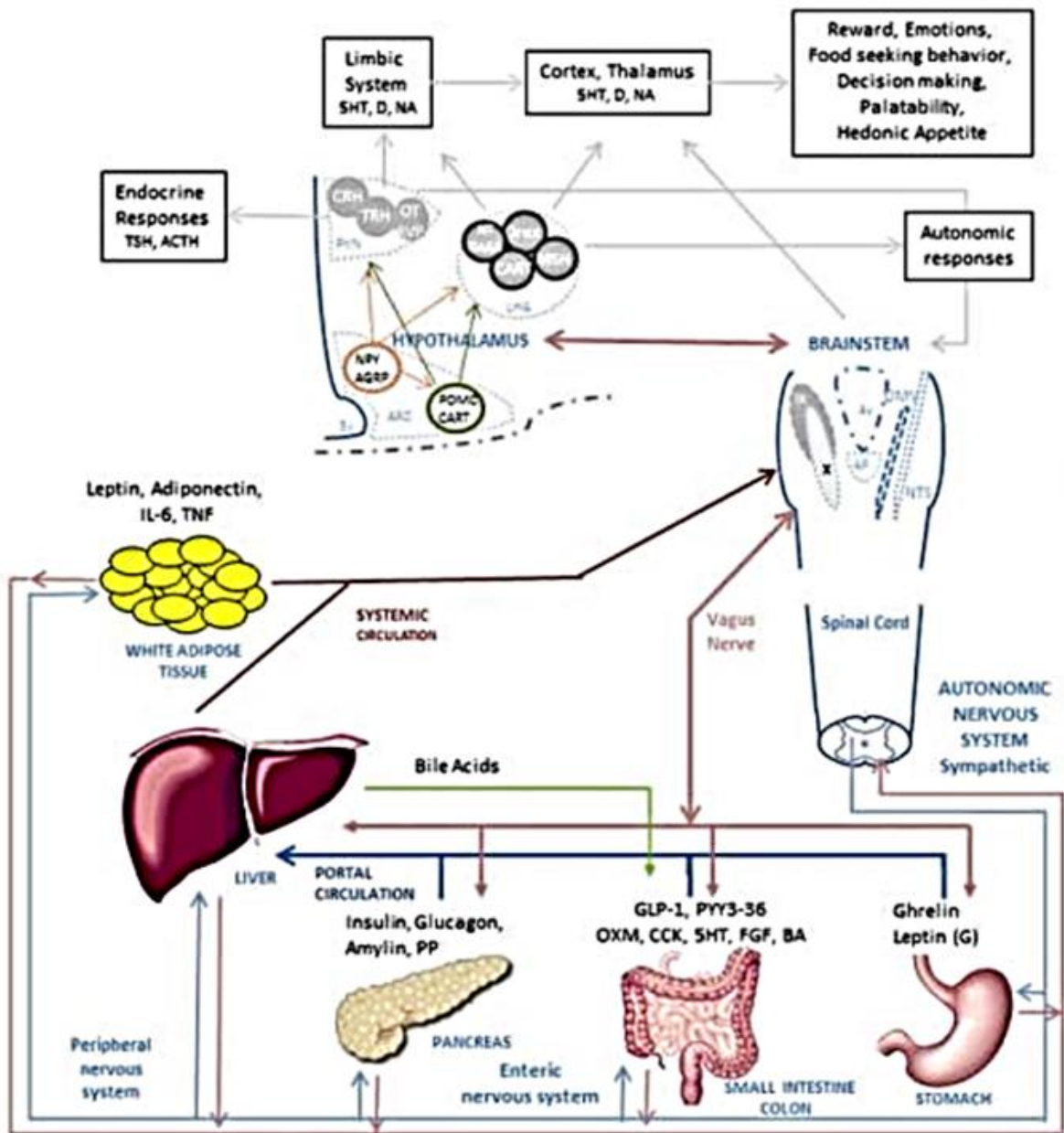
La obesidad es una enfermedad heterogénea donde múltiples factores obesógenos biológicos, ambientales y conductuales interactúan para provocar un estado de equilibrio energético positivo. En una enfermedad multifactorial como la obesidad es clave saber si el consumo de calorías excede o no la capacidad del organismo para gastar energía (Huerta et al., 2021). Si el consumo excede el gasto, se presenta un almacenamiento del exceso de calorías en el tejido adiposo. El balance energético se compone de ingesta de energía, gasto de energía y almacenamiento de energía (Figura 3). La energía se adquiere mediante la ingesta de nutrientes que contienen calorías, como proteínas, carbohidratos y grasas, así como alcohol. La energía se gasta a través de 3 procesos metabólicos: tasa metabólica en reposo (RMR), efecto térmico de los alimentos (TEF) y gasto energético inducido por la actividad física. La RMR determina la cantidad de energía que el cuerpo utiliza para las actividades metabólicas en reposo, y es relativa al peso corporal, principalmente a la masa magra. TEF (8-10% de la ingesta calórica total) representa la energía utilizada para digerir y metabolizar los alimentos ingeridos. La energía gastada a través de la actividad física es el componente más variable del gasto energético, ya que es proporcional a la duración de la actividad física además del costo energético de esa actividad particular (Anderson Vázquez, 2020). La homeostasis energética estable se logra cuando la energía y la ingesta equivale al gasto energético, lo que representa un peso corporal estable. Cambios en el peso corporal ocurre cuando la ingesta y el gasto de energía son desiguales, durante un período de tiempo determinado (González-Jiménez & Río-Valle, 2012). Por lo tanto, una ingesta de energía superior al gasto energético crea un estado de equilibrio energético positivo que conduce a un aumento del peso corporal, predominantemente como masa grasa. Además, los factores biológicos, ambientales o de comportamiento influyen casi por igual en mantener o no el peso corporal (Kadouh & Acosta, 2017).



**Figura 3.** Balance de energía metabólica en humanos. En el cuerpo humano, el equilibrio energético es la relación entre la ingesta de alimentos y bebidas y el gasto de energía a través del organismo. Metabolismo basal y actividad física. Cuando la energía que entra es igual a la energía que sale para un período prolongado, se mantiene el peso corporal. Sin embargo, cuando la ingesta de calorías excede el total de energía que el cuerpo gasta (Energía entrante > Energía saliente) durante un período prolongado, se produce un estado de desequilibrio energético, demostrado por el aumento de peso. De manera similar, la pérdida de peso se produce debido a un balance energético negativo cuando el gasto energético excede la ingesta energética (Energía gastada >Entrada de energía) persistentemente (Modificado de Kadouh & Acosta, 2017).

### 3.3.1 Factores biológicos

En la obesidad diversos factores biológicos están asociados con el padecimiento, entre estos destacan la genética, el eje cerebro-intestino, determinantes prenatales, el embarazo, la menopausia, condiciones neuroendocrinas, medicamentos, discapacidad física, microbioma intestinal y algunas enfermedades virales (Figura 4). Cuando uno o más de estos determinantes están presentes, la interacción con los factores ambientales y de comportamiento contribuyen a la expresión de la obesidad (Kadouh & Acosta, 2017).



**Figura 4.** El eje cerebro-intestino y la regulación de la ingesta de alimentos. Tomado de (Kadouh & Acosta, 2017).

El proceso de ingesta de alimentos se inicia cuando los nutrientes ingresan al tracto gastrointestinal. La digestión comienza cuando los nutrientes ingresan al estómago y producen dilatación mecánica disminuyendo la acil-grelina y aumentando la desacil-grelina y leptina gástrica. La dilatación del estómago envía señales a través del nervio vago y del sistema nervioso periférico hasta el tronco del encéfalo y el hipotálamo. El nutriente digerido pasa al intestino delgado y colon produciendo mayor dilatación mecánica, liberación de hormonas gastrointestinales, ácido biliar y pancreático, secreción de jugos. Estas hormonas gastrointestinales tienen un efecto local (paracrino) y un efecto periférico, cuando es secretada a la circulación, pasa a través

del hígado y afecta el músculo, el tejido adiposo, motilidad y función gastrointestinal, y núcleo del hipotálamo y tronco del encéfalo. El efecto paracrino y endocrino induce saciedad. El músculo y el tejido adiposo, liberan hormonas que afectan a núcleos similares en el cerebro. El efecto sobre el hipotálamo y el tronco encefálico desencadena respuestas más altas en el área del cerebro, modulando el comportamiento y mejorando la absorción de nutrientes, recompensa relacionada. En el hipotálamo, las neuronas de primer orden del núcleo arqueado (ARC) modulan el apetito por la vía NPY/AGRP y saciedad por la vía POMC/CART, las neuronas interactúan con neuronas de segundo orden en el núcleo paraventricular (PVN) y lateral área hipotalámica (LHA) para enviar señales a áreas superiores del cerebro y al tronco del encéfalo. En el tronco del encéfalo, el núcleo del tracto solitario (NST) y el complejo vagal dorsal (DMNV) interactúan con la periferia y el sistema gastrointestinal y lleva señales a las áreas superiores del cerebro y el hipotálamo (Kadouh & Acosta, 2017).

### **3.3.2 Factores ambientales**

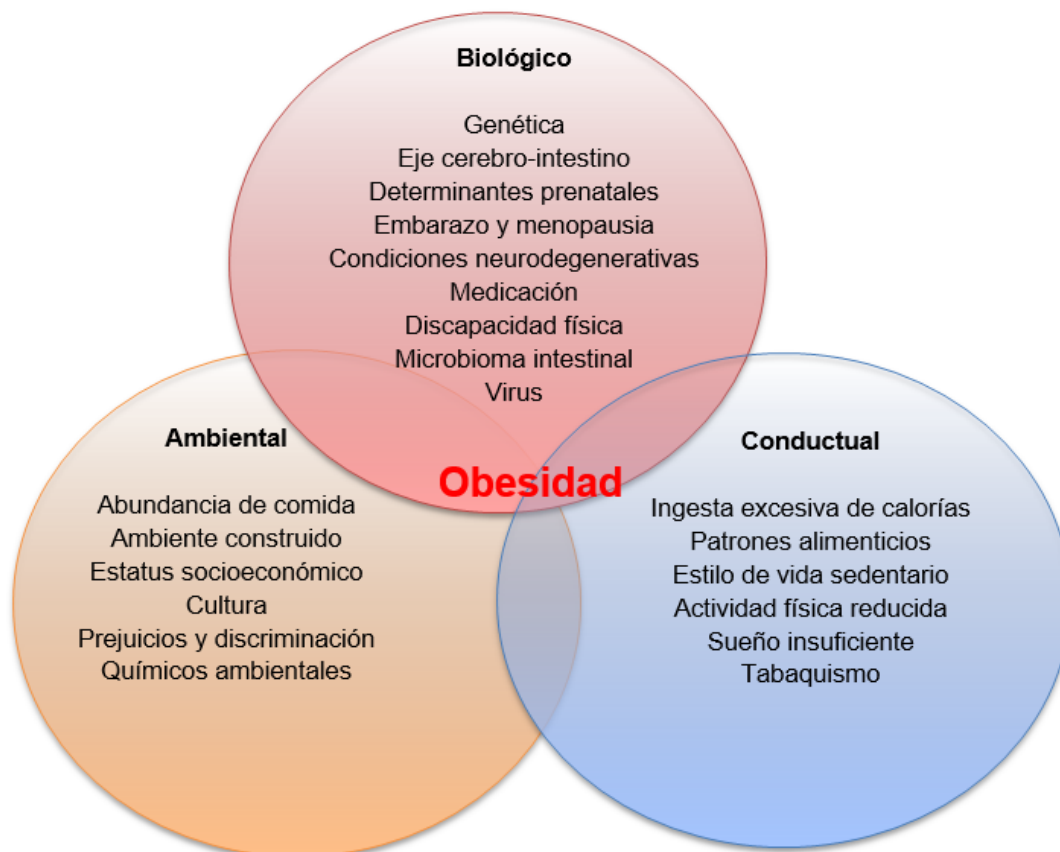
El medio ambiente es un elemento crucial en la etiología de la obesidad. Como se menciona en apartados anteriores, en la mayoría de los casos de obesidad, existe una propensión biológica al desarrollo de la obesidad que requiere de una interacción con factores ambientales para que la obesidad sea expresada. Estos factores deben ser atendidos por parte de los investigadores, los responsables políticos y practicantes en el campo. Los principales determinantes ambientales de la obesidad son el entorno, la sociedad y la cultura obesogénica, y las sustancias químicas ambientales (Kadouh & Acosta, 2017a; Vargas Aguilar et al., 2020).

### **3.3.3 Factores de comportamiento**

Con excepción de los subtipos de obesidad originados por etiologías monogénicas o los factores que causan la reducción del gasto energético, las decisiones individuales y los estilos de vida son esenciales para precipitar la interacción entre factores biológicos y ambientales que conlleven a un estado de obesidad. La obesidad de tipo monogénico tiene su origen en un único gen disfuncional y representa un pequeño número de casos que aparecen en la niñez y que generalmente suelen venir

acompañados de diferentes trastornos neuroendocrinos, del desarrollo y la conducta (González Jiménez et al., 2012).

Por ejemplo, mientras estamos rodeados de una población obesogénica, un entorno alimentario caracterizado por la abundancia, asequibilidad, variedad y conveniencia, las decisiones individuales juegan un papel importante en la medida en que el ambiente afectará la ingesta calórica. De manera similar, otros comportamientos como la reducción de la actividad física, la falta de sueño y el tabaquismo son conductas autoinfligidas a pesar de estar influenciadas por el entorno (Figura 5) (Kadouh & Acosta, 2017).



**Figura 5.** La obesidad, como una enfermedad multifactorial. La obesidad es una enfermedad compleja que resulta de la interacción de múltiples factores. El esquema representa los aspectos biológicos, ambientales y de comportamiento, los factores que contribuyen al equilibrio energético positivo y al aumento excesivo de peso. Todos en cierta medida contribuyen a la obesidad (Modificado de Kadouh & Acosta, 2017).

### 3.4 Tratamiento de la obesidad y sobrepeso en adultos

Los tratamientos comunes para el sobrepeso y la obesidad incluyen perder peso a través de una alimentación saludable, más actividad física y otros cambios en las rutinas habituales. Los programas de control de peso pueden ayudar a algunas

personas a perder peso o a no recuperar el peso perdido (Kaufer-Horwitz & Pérez Hernández, 2021). Estas medidas no son siempre efectivas ya que algunas personas que tienen obesidad no pueden perder suficiente peso para mejorar su salud o no pueden evitar recuperar el peso perdido. En tales casos, un médico puede considerar agregar otros tratamientos, incluso medicamentos para perder peso, dispositivos para perder peso o una cirugía bariátrica.

En personas con cierto grado de obesidad, los expertos recomiendan perder entre el 3 y el 5 por ciento del peso corporal en los primeros 6 meses de tratamiento (Qué Debe Saber Sobre Los Dispositivos Médicos Para La Pérdida y El Control Del Peso, 2022). Perder de 3 a 5 por ciento del peso puede:

- Ayudar a disminuir la posibilidad de desarrollar problemas de salud relacionados con el sobrepeso y la obesidad
- Mejorar los problemas de salud relacionados con el sobrepeso y la obesidad, como la presión arterial alta y las concentraciones altas de colesterol

Además de los principios activos de los medicamentos existentes contra la obesidad, existen numerosas investigaciones enfocadas en buscar y probar el efecto de compuestos de origen natural para el tratamiento de distintas enfermedades, entre las que se incluye la obesidad (San Román Arenas, 2011).

Los medicamentos contra la obesidad, junto con las intervenciones en el estilo de vida, son medios eficaces para inducir y mantener la pérdida de peso en pacientes con obesidad (Im et al., 2024).

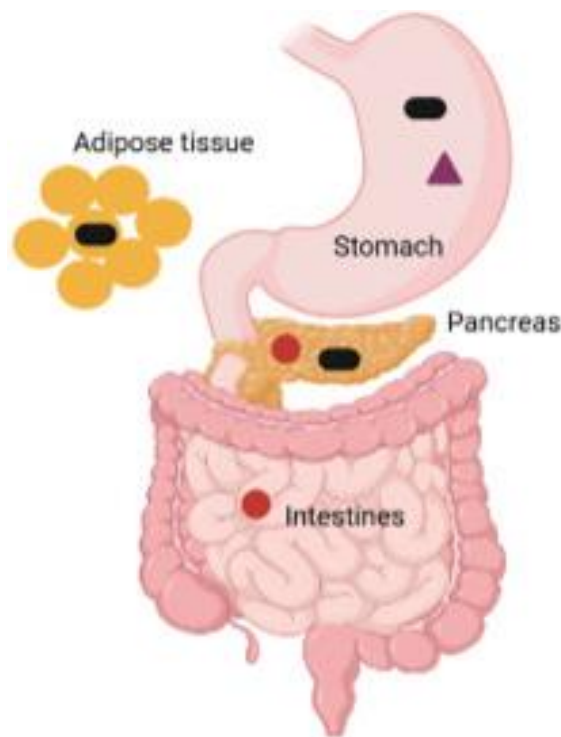
Los medicamentos contra la obesidad tienen un historial de seguridad problemático, y varios medicamentos se retiraron del mercado debido a eventos adversos. La pérdida de peso con medicamentos contra la obesidad rara vez cumple con las expectativas de los pacientes. Además, los médicos recetan medicamentos contra la obesidad con poca frecuencia en relación con el número de adultos que son potencialmente elegibles para su uso (Yanovski & Yanovski, 2021).

A junio de 2021, la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. aprobó un total de 5 medicamentos (orlistat, fentermina y topiramato, naltrexona más

bupropión, liraglutida y semaglutida) para el control de peso a largo plazo en adultos con un índice de masa corporal de al menos al menos 30 o índice de masa corporal de al menos 27 y condiciones comórbidas (Ahmad et al., 2021).

### Orlistat

Dentro de la lista de medicamentos aprobados hemos elegido Orlistat que tiene principalmente un efecto periférico donde inhibe las lipasas gástricas y pancreáticas, disminuyendo así la absorción de grasas de la dieta (Figura 6). Algunos de los efectos adversos que puede presentar son fuga rectal aceitosa, malestar abdominal, dolor abdominal, flatulencia con secreción, urgencia fecal, esteatorrea, incontinencia fecal, aumento de la defecación. Algunas de las contradicciones que se presentan para este medicamento son pacientes con síndrome de malabsorción crónica o colestasis y embarazo(Chakhtoura et al., 2023).



▲ Orlistat

**Figura 6.** Lugar de acción de Orlistat, medicamento aprobado por la FDA (Chakhtoura et al., 2023).

### 3.5 Uso de plantas medicinales en México

Las plantas producen distintos tipos de metabolitos secundarios o principios activos no relacionados con la producción y/o reproducción de las mismas (como aminoácidos, carbohidratos, lípidos o nucleótidos) que presentan beneficios para la

salud (Dar et al., 2023; Mexicana de Fitopatología et al., 2003). Las familias de estos tipos de principios activos se clasifican en alcaloides, terpenos, glicósidos y compuestos fenólicos. La Organización Mundial de la Salud define una planta medicinal como “cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos” (Oliveira Miranda et al., 2005; OMS, 1979; OMS, 2015). Dentro de los fines terapéuticos las plantas se utilizan como antiinflamatorias, antiácidas, astringentes, analgésicas, antibióticas, calmantes, carminativas, digestivas, diuréticas, depurativas, estimulantes, expectorantes, eméticas y emolientes; sus principales demandantes son la industria farmacéutica y la herbolaria (Rivas-Morales et al., 2016).

A pesar de las propiedades atribuidas y las diferentes presentaciones en que se consumen, el uso de las plantas medicinales debe ser consultado con un profesional de la salud, ya que éstas no sustituyen la prescripción médica y los “testimonios de vida” en cuanto a su uso y consumo carecen de rigor científico. En este contexto la FDA (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés) menciona que las plantas medicinales no cuentan con la misma regulación científica, clínica, de suministro y venta como los medicamentos convencionales. Además, pueden conducir a intoxicación o daños en órganos, así como a abortos o a hipertensión arterial ya sea por el suministro de dosis inadecuados, el abuso en el consumo de las mismas o como consecuencia de la combinación con medicamentos prescritos (Vilaboa Arroniz et al., n.d.).

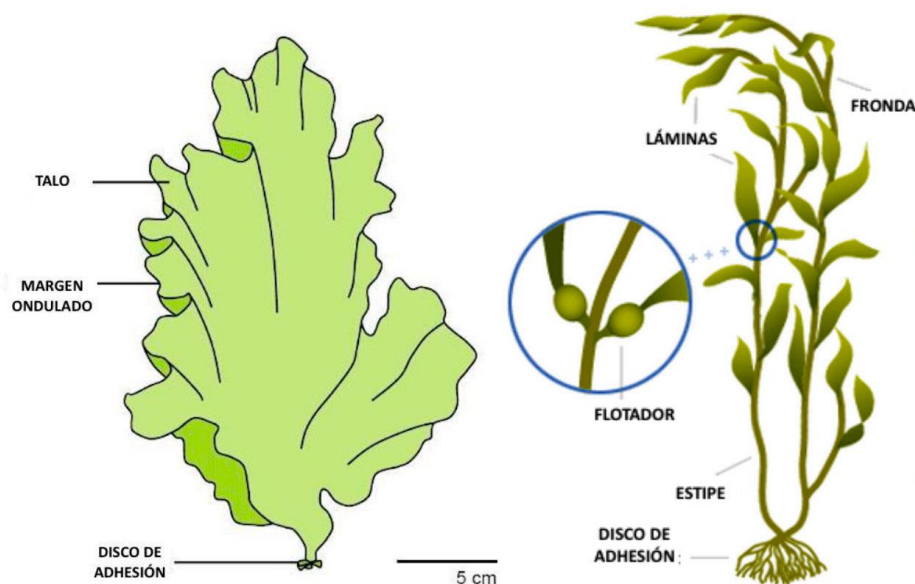
Dentro de las plantas medicinales de interés farmacéutico y comercial se encuentran las macroalgas marinas.

### **3.6 Macroalgas marinas**

Son organismos vegetales de agua salada que hacen fotosíntesis. Existen algas microscópicas unicelulares (microalgas) y grandes algas multicelulares (macroalgas) que pueden formar bosques submarinos. Las macroalgas, a diferencia de las plantas superiores, no poseen un auténtico sistema vascular, tampoco tienen raíces verdaderas, tallos ni hojas, y su cuerpo vegetativo se conoce como “Talo” (base-estipe-lámina) (Figura 7) (Gili, Vendrell, Peral et al., 2022).

La taxonomía junto con la biología molecular, son las ramas de la ciencia que se emplean para clasificar a los organismos animales y vegetales con características comunes. Gracias a estas ciencias las macroalgas se clasifican en tres amplios grupos taxonómicos, llamados Divisiones, Clases, Órdenes, Géneros, hasta llegar al nivel más bajo de clasificación taxonómica llamada Especies (Alfonso Valdés, 2017; Ecología, Biología y Distribución, n.d.).

La biodiversidad algal es muy grande; se han llegado a describir hasta 30,000 especies distintas, quedando muchos taxones por describir científicamente (Romero Santos, 2023). Las algas marinas se dividen en dos grupos de comunidades, según vivan suspendidas en la columna de agua o nadando mediante flagelos (Fitoplancton) o adheridas a un sustrato (Fitobentos). Este último grupo se puede dividir a su vez en algas microscópicas (Microfitobentos) y en aquellas que presentan un tamaño mayor (Macroalgas), visibles sin necesidad de un microscopio (Macrofitobentos).



**Figura 7.** Estructura de un alga marina (Tomado de Ecología, Biología y Distribución, n.d.).

Para clasificar a las algas los botánicos se basan en una de las características comunes según su grupo, la pigmentación (Ecología, Biología y Distribución, n.d.)(Rodríguez Piña, 2021).

### 3.6.1 Clasificación de las macroalgas marinas

De acuerdo a sus pigmentos, las algas marinas se clasifican en algas verdes, algas pardas y en algas rojas (Tabla 1)(Rodríguez Piña, 2021). Las algas verdes pertenecen a las divisiones Chlorophyta y Streptophyta, dentro del clado Viridiplantae, perteneciente al reino Plantae. Es un grupo parafilético de algas estrechamente relacionadas con las plantas verdaderas. Tan sólo un 10% de las especies son marinas, el resto son de agua dulce. Se distribuyen en zonas en las que la luz solar llega eficientemente para realizar la fotosíntesis. La mayor parte de las especies son bentónicas. Sus talos son sencillos, respondiendo a diferentes planos estructurales: hemisifonados, sifonados y parenquimáticos sencillos (Pedroche & Senties, 2020). La reproducción puede ser asexual mediante esporas móviles, o sexual a partir de la fecundación de una oosfera (gameto femenino) por un gameto masculino (flagelado). Regularmente las algas verdes son capaces de tolerar amplias variaciones de salinidad y, además, soportan bien la contaminación; es por ello que algunas especies son utilizadas como bioindicadores. Las algas pardas pertenecen a la clase Phaeophyta de la división Ochrophyta, dentro del reino Cromista. Se caracterizan por presentar clorofila a, c y un pigmento accesorio denominado fucoxantina. Los talos pueden ir desde filamentosos hasta hísticos complejos. Presentan multitud de morfologías, aunque generalmente siguen la estructura rizoide-estipe-filoide. Acumulan sustancias de reserva, como polisacáridos, siendo la laminarina el principal de ellos. Presentan ciclos de vida diversos, tanto monogenético como digenético (iso y heteromórfico) (Spalding et al., 2019).

Las algas rojas pertenecen a la división Rhodophyta, dentro del reino Plantae (subreino Biliphyta, Algas Rojas). Se caracterizan por presentar clorofila a, ficobiliproteínas y carotenoides. Presentan un talo con estructura pseudoparenquimatosa, que se origina a partir de un solo eje cladómico (uniaxiales) o a partir de varios ejes cladómicos (multiaxiales), siendo un cladoma un eje de crecimiento apical que presenta ramificaciones. Son de vida libre, epífitas o epizoicas, y se conocen algunas formas parásitas. Presentan ciclos de vida complejos: puede ser digenético heteromórfico o trigenético, con dos generaciones haploides (gametofito y tetrasporofito) y una diploide (carposporofito), heteromórfico o isomórfico. Algunas de estas algas (especialmente las del género *Gelidium*) secretan una sustancia amorfa llamada galactano, un polisacárido sin ramificaciones de la

pared celular, a partir del cual se obtiene una sustancia de importancia económica, el agar (macroalgas) (Ismail et al., 2020).

**Tabla 1.** Clasificación de las macroalgas y sus pigmentos (Quitral R. et al., 2012).

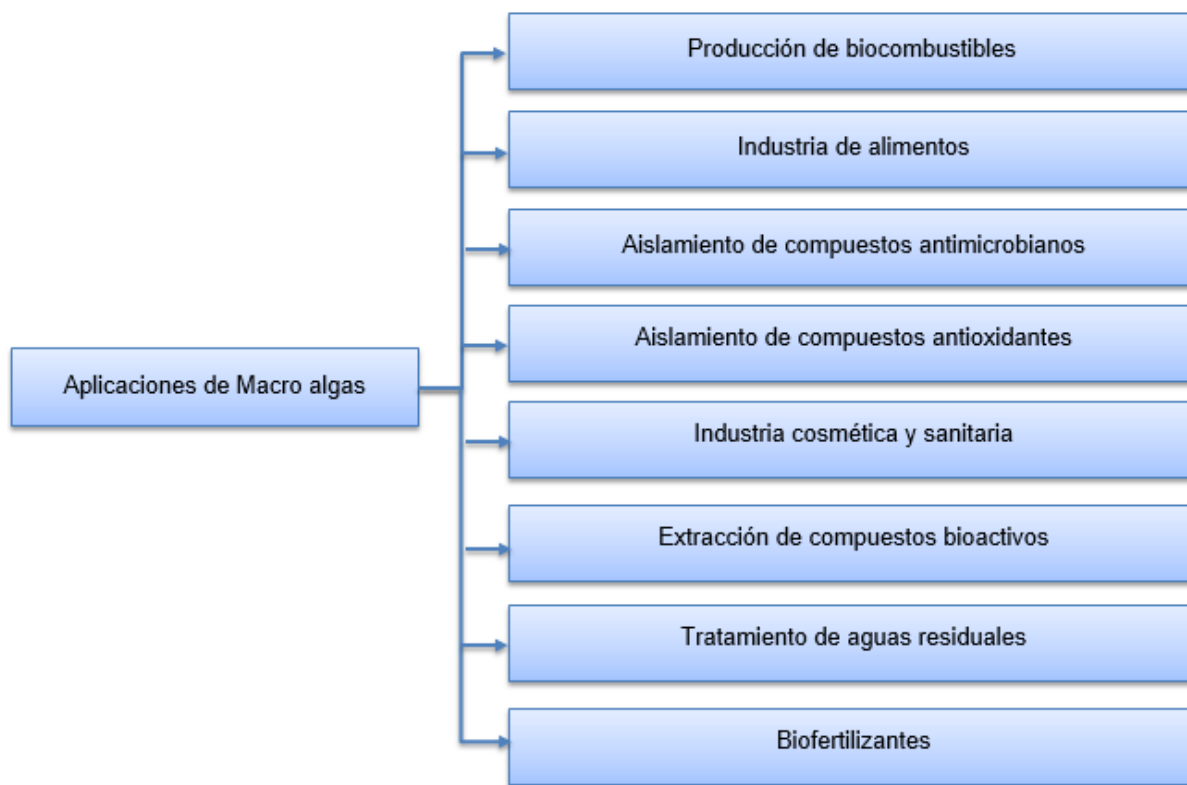
Clasificación de algas y sus pigmentos (1)			
Clasificación	Nombre común	Pigmentos	Ejemplos
Clorophyta	Algas verdes	Clorofilas a y b, Xantófilas (luteína, violaxantina, neoxantina y enteroxantina)	Ulva spp., Codium spp.
Phaeophyta	Algas pardas	Xantofilas (fucoxantina y flavoxantina) y Clorofila a y c	Laminaria spp., Lessonia spp., Sargassum spp., Durvillaea spp.
Rhodophyta	Algas rojas	Ficoeritrina, ficobilina, clorofilas a y d	Gracilaria spp., Palmaria spp., Porphyra spp.

### 3.7 Uso de las macroalgas marinas: beneficios en la salud del humano

Las algas son una fuente de biomasa viable y económica de compuestos valiosos con potenciales aplicaciones en las industrias nutracéutica, farmacéutica, química, alimentaria y cosmética debido a sus propiedades biológicamente activas y regenerativas. Desde tiempos remotos las algas marinas han sido utilizadas como fuente de alimento, especialmente en países asiáticos, y en occidente se había limitado su aplicación solo al campo farmacéutico e industrial (Balladares & D'Armas, 2022; Cornish & Garbary, 2010).

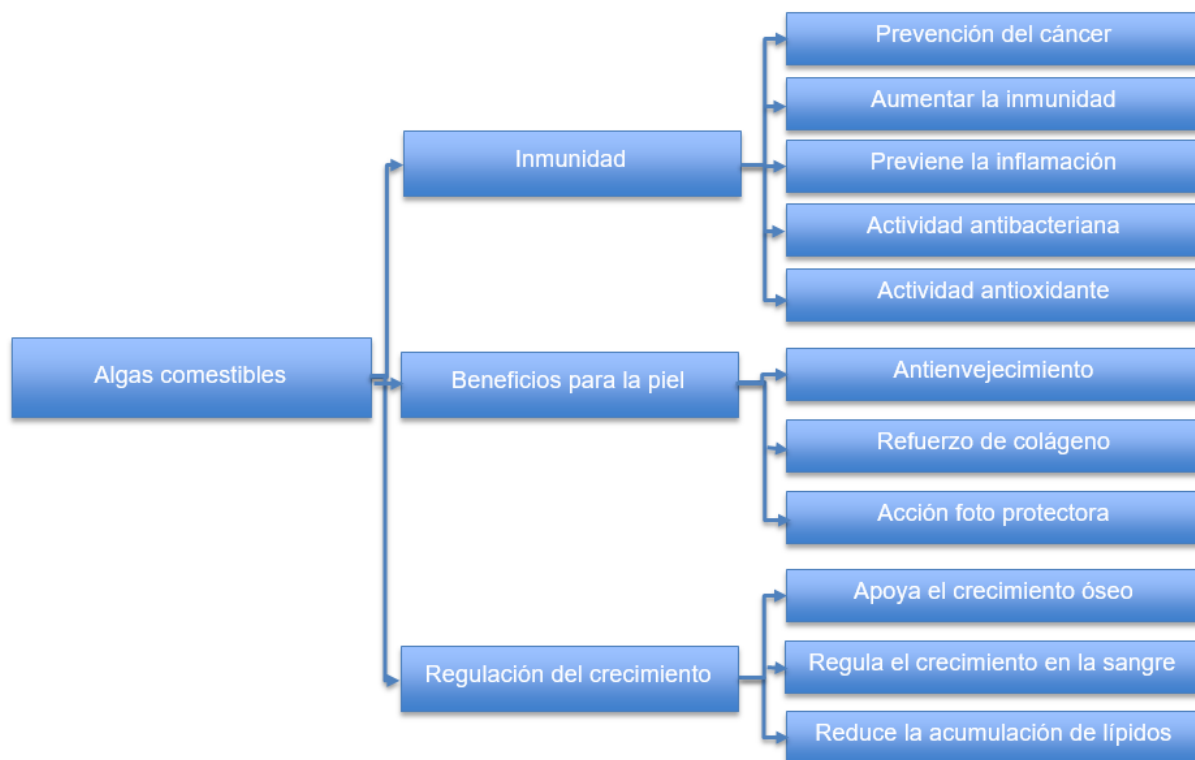
Las algas se distribuyen en ambientes diversos y extremos. Son valiosos por su alto contenido en compuestos con diferentes actividades biológicas, incluidos tanto compuestos orgánicos complejos como metabolitos primarios y secundarios. Entre ellos cabe mencionar los fitopigmentos (xantofilas y carotenoides), ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) que incluyen el ácido docosahexaenoico (DHA), compuestos fenólicos, taninos, péptidos, lípidos, enzimas, vitaminas, carbohidratos, terpenoides y otros (Biris-Dorhoi et al., 2020; Naiel et al., 2021).

Las aplicaciones más importantes de las algas se sintetizan mencionan en la figura 8.



**Figura 8.** Principales aplicaciones de las macroalgas entre 2010 y 2020, beneficios para la salud, bioactividad y aplicaciones potenciales (Modificado de Biris-Dorhoi et al., 2020).

Las algas marinas contienen una gran variedad de compuestos bioactivos que pueden estar implicados en la prevención y el tratamiento de muchas enfermedades, a través de distintos mecanismos celulares (Figura 9). En este sentido, algunos estudios epidemiológicos, clínicos y de metaanálisis asocian la menor incidencia de diferentes enfermedades crónicas, como cáncer, deficiencia cardiovascular, diabetes, enfermedad de Parkinson, trastornos relacionados con la obesidad y síndrome metabólico, con un perfil dietético que incluya consumo de algas (Biris-Dorhoi et al., 2020; Milledge et al., 2015).

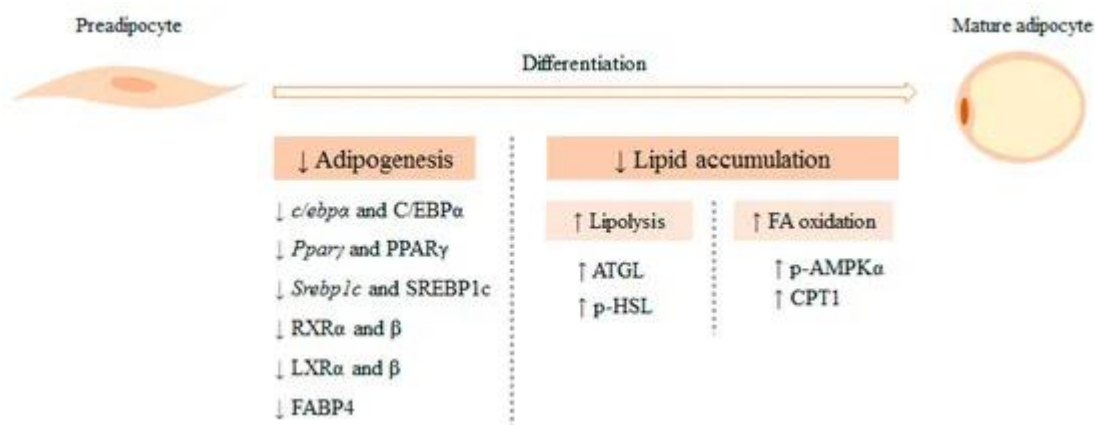


**Figura 9.** Efectos de las macroalgas sobre la salud y el bienestar humanos (Modificado de Biris-Dorhoi et al., 2020).

### 3.8 Efectos antilipidémicos de las macroalgas

Existe evidencia que demuestra que las macroalgas y sus extractos muestran efectos antioxidantes, antimicrobianos, antiinflamatorios, anticancerígenos, antidiabéticos, antihipertensivos, antihiperlipidémicos y antiobesidad. Este escenario enmarca la necesidad de buscar nuevos agentes con actividad antiobesidad, especialmente compuestos de fuentes biológicas (Yuan et al., 2019). Es importante resaltar que hoy en día existen pocos medicamentos disponibles para el tratamiento de la obesidad aprobados por la FDA, como se mencionó anteriormente. Debido a esto la búsqueda de compuestos bioactivos de origen natural ha incrementado.

Hasta la fecha se han realizado varios estudios *in vitro* en preadipocitos y adipocitos maduros de la línea 3T3-NIH (Figura 10), una de las líneas celulares más utilizadas para analizar los efectos de los extractos de algas sobre la adipogénesis y los procesos metabólicos implicados en la acumulación de triglicéridos (TG) (Figura 11) (Gómez-Zorita et al., 2020).



**Figura 10.** Mecanismos de acción antiobesidad descritos en estudios *in vitro* (Gómez-Zorita et al., 2020).

Authors	Cell Line	Seaweed and Doses	Experimental Design	Effects	Mechanisms
Kim et al., 2015	3T3-L1 pre-adipocytes	<i>Sargassum thunbergii</i> (brown seaweed) extract 10, 50 and 100 µg/mL	Cells treated during the 8 days of the differentiation period	↓ Adipogenesis	↓ PPARγ, SREBP1c and C/EBPα gene and protein expressions ↓ RXRα, RXRβ, LXRA, LXRβ protein expression
Kang et al., 2016	3T3-L1 pre-adipocytes	Brown, green and red algae extracts (100 µg/mL) <i>Plocamium telfairiae</i> (red seaweed) extract (25, 50 and 100 µg/L)	Cells treated during the 8 days of the differentiation period	↓ Adipogenesis	↓ PPARγ, C/EBPα, SREBP1c, FABP4 protein expression
Kang et al., 2016	3T3-L1 pre-adipocytes	<i>Gelidium amansii</i> (red seaweed) extract (50 and 100 µg/mL)	Cells treated during the 8 days of the differentiation period	↓ Adipogenesis	↓ PPARγ, C/EBPα (100 µg/mL) and SREBP1c protein expression
Sharma et al., 2017	3T3-L1 pre-adipocytes	<i>Caulerpa okamurae</i> (green seaweed) extract (25, 50, 125, 250 and 500 µg/mL)	Cells treated during the 8 days of the differentiation period	↓ Adipogenesis	↓ PPARγ and C/EBPα protein expression (50 and 250 µg/mL) ↓ SREBP1c protein expression (<250 µg/mL)
Martínez-Villaluenga et al., 2018	3T3-L1 mature adipocytes	<i>Undaria pinnatifida</i> (Brown seaweed) extract (1 and 10 µg/mL)	Cells treated on day 8 of differentiation (during 24 h)	↓ TG accumulation	No information is provided
Seo et al., 2018	3T3-L1 pre-adipocytes	<i>Ishige okamurae</i> (brown seaweed) extract (6.25, 12.5 and 25 µg/mL)	Cells treated during the 8 days of the differentiation period	↓ Adipogenesis	↓ PPARγ, C/EBPα protein expression ↑ phosphorylated-AMPK, ATGL and phosphorylated-HSL protein expression ↑ CPT1 (25 µg/mL)
Lee et al., 2020	3T3-L1 pre-adipocytes	<i>Grateloupia elliptica</i> (red seaweed) extract (25, 50, 100 and 200 µg/mL)	Cells treated during the 8 days of the differentiation period	↓ TG accumulation ↓ Adipogenesis	↓ PPARγ, SREBP1, FABP4 protein expression

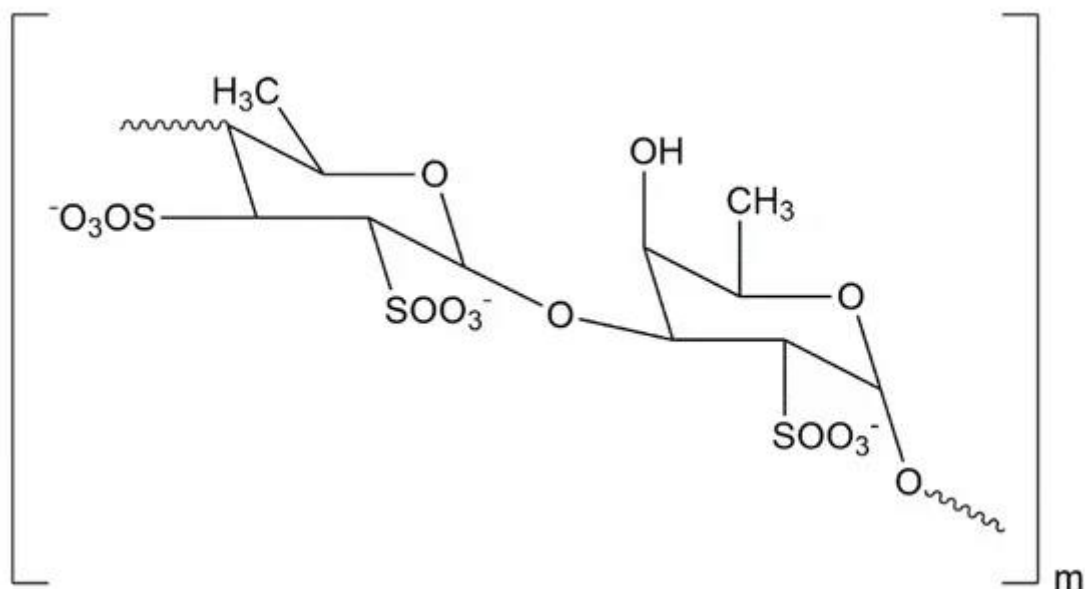
**Figura 11.** Efectos de las macroalgas marinas en línea celular 3T3-L1. (Gómez-Zorita et al., 2020).

En las últimas décadas, los cambios sociales y tecnológicos han traído cambios significativos en el estilo de vida de personas de todo el mundo, cambios asociados en la dieta de las personas. Una de las características de una sociedad en rápido movimiento es la creciente ingesta de alimentos ricos en grasas y energía, que, cuando se combinan con una disminución gradual del nivel físico de actividades, hace que la tasa de obesidad aumente considerablemente (Fontaine & Barofsky, 2001). Un estudio reciente demostró que más del 6% de los hombres y el 9% de las mujeres se

asocian con la obesidad. La obesidad se ha convertido en una gran amenaza para la salud humana, ya que está relacionada con muchas complicaciones graves, como las enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2, hipertensión, dislipidemia y cáncer. En particular, el alginato derivado de algas, el fucoidan, y se sabe que la fucoxantina es eficaz como agente contra la obesidad (Sun et al., 2018).

El Comité de Expertos de la OMS recomendó que se investiguen más a fondo las plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de la diabetes, ya que con frecuencia se considera que tienen efectos adversos menores o nulos. La búsqueda de agentes bioactivos más seguros y eficaces ha seguido siendo un objetivo importante en el campo de la investigación sobre la diabetes. Menos del 1% de las 250,000 plantas superiores estimadas han sido analizadas farmacológicamente y muy pocas en lo que respecta a la diabetes. Información etnobotánica afirman que se han encontrado alrededor de 800 plantas y sus extractos activos que pueden tener potencial hipoglucemiante. En el cual, se han identificado y reportado alrededor de 200 compuestos bioactivos puros por sus posibles efectos antidiabéticos (Zhao et al., 2018).

Los polisacáridos de algas han demostrado la capacidad de disminuir los niveles de lípidos en sangre y colesterol, al tiempo que aumentan los niveles de HDL. Se ha informado que los polisacáridos de las algas pardas disminuyen la absorción de colesterol, ya que estos compuestos tienen la capacidad de unirse al colesterol de la dieta, mejorando la excreción fecal de colesterol. El fucano predominante presente en las algas pardas es el fucoidan. El componente principal del fucoidan es la L-fucosa-4-sulfato, que se presenta en la Figura 12, pero la estructura del fucoidan varía significativamente según las especies de algas y el método de extracción (André et al., 2021).



**Figura 12.** Estructura Fucoidan (André et al., 2021).

También se ha demostrado que fucoidan produce una disminución en la absorción de colesterol al disminuir la expresión de NPC1L1, como ezetimiba, y aumenta la excreción de colesterol al regular positivamente el transportador ABCG8. Además de todas estas características, el fucoidan también afecta la síntesis de colesterol al reducir la expresión del ARNm de la enzima HMG-CoA reductasa, un efecto similar al de las estatinas. La laminarina disminuye los niveles de triglicéridos, colesterol y LDL y aumenta los niveles de HDL. Sin embargo, es necesario investigar más a fondo el efecto hipocolesterolémico y el mecanismo de acción de la laminarina aislada de algas pardas (André et al., 2021).

#### 4. Objetivos

##### 4.1 General

- Analizar el efecto antilipidémico de extractos orgánicos de las algas marinas *Egrecia menziesii* y *Undaria pinnatifida*

##### 4.2 Específicos

- Realizar extractos orgánicos y acuosos del alga marina *Egrecia menziesii* y de *Undaria pinnatifida*

- Realizar ensayos en *Artemia salina* y en eritrocitos humanos para determinar la dosis letal cincuenta (DL<sub>50</sub>) de los extractos obtenidos
- Evaluar el efecto antilipidémico de los extractos de *Egregia menziesii* y de *Undaria pinnatifida* mediante ensayos en la línea celular 3T3-NIH

## 5. Hipótesis

Los extractos orgánicos y acuosos derivados de las algas marinas del Pacífico mexicano *Egregia menziesii* y *Undaria pinnatifida* contienen compuestos bioactivos utilizables como coadyuvantes en el tratamiento de distintos problemas de salud pública, como la obesidad.

## 6. Metodología

A continuación, se describe detalladamente todo el proceso realizado en el curso de esta investigación, donde clasificamos y sistematizamos el conjunto de técnicas que fueron utilizadas, desde la colección de las macroalgas, pasando por el tratamiento por el cual fueron sometidas, hasta la exposición de los extractos obtenidos en la línea celular 3T3-NIH.

### 6.1 Recolección e identificación de *Egregia menziesii* y *Undaria pinnatifida*

La recolecta de *E. menziesii* se realizó en el Campo No. 5, en Cabo Punta Banda, en latitud: 31°44'3.46" N y longitud: 116°43'39.95" O (*Punta Banda, Localidad Ensenada, Baja California, México*). La recolecta de *Undaria pinnatifida* fue realizada por la Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez en el ejido Eréndira en latitud 31° 16' 34" N y longitud 116° 22' 27" O (Figura 13) (*Ejido Eréndira, Pueblo Ensenada, Baja California, México*). Posterior a su recolecta ambos tipos de algas se secaron al sol a temperatura ambiente durante 20-22 días, hasta que los ejemplares estuvieran completamente secos. Con ayuda del Oceanólogo Luis Ernesto Aguilar Rosas se identificaron los ejemplares de *E. menziesii*. Los ejemplares de *U. pinnatifida* fueron identificados con la ayuda de la Dra. Graciela Guerra Rivas.

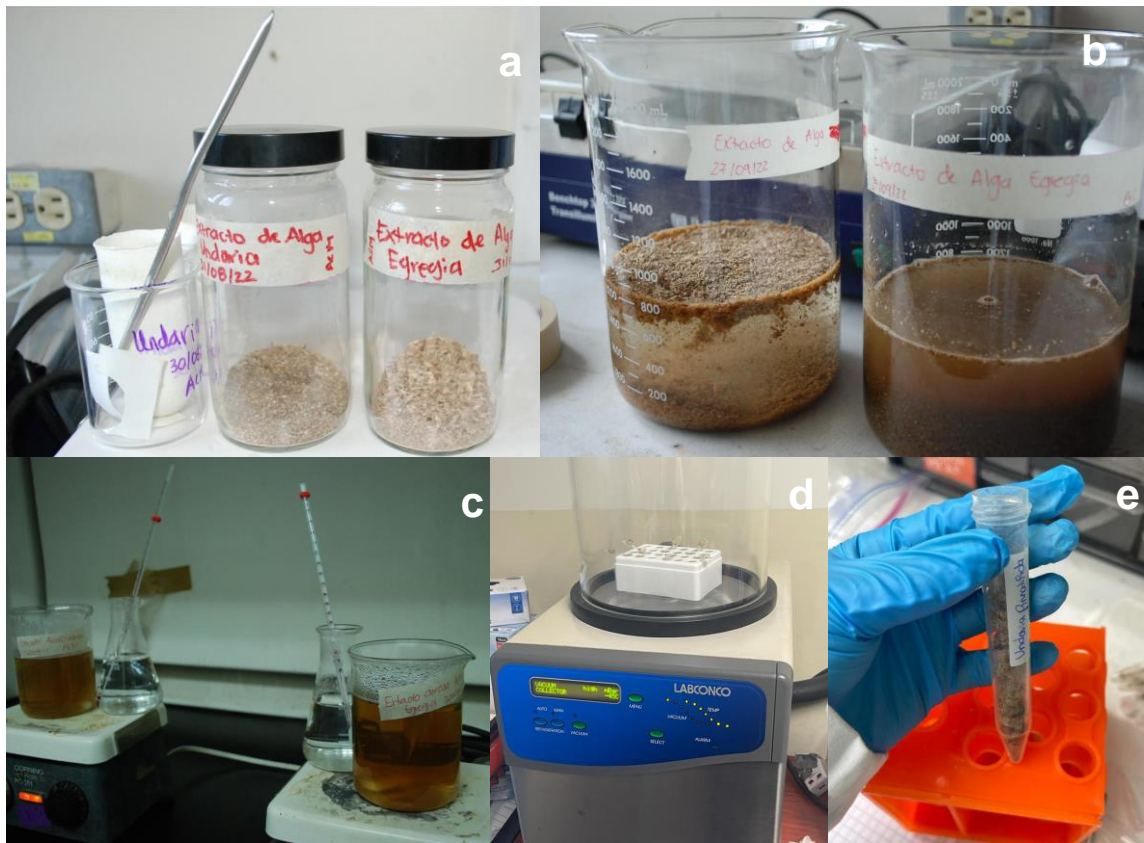


**Figura 13.** Mapa de Campo 5 Cabo Punta Banda y Ejido Eréndira en Baja California, México. (Tomado de Campo 5 Ensenada, 2023, Playa la Escondida; Temperatura de agua en Ejido Eréndira en el Océano Pacífico).

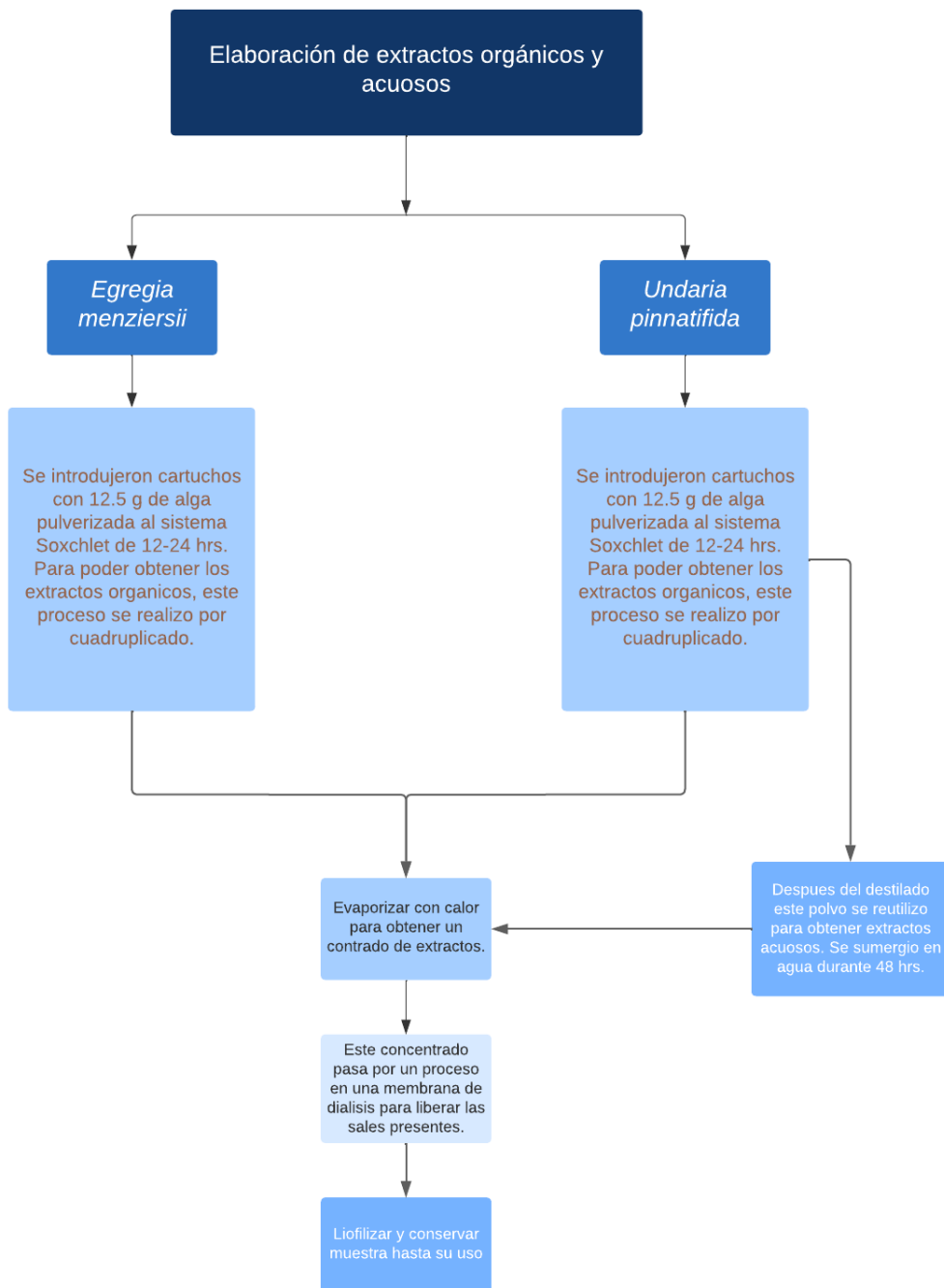
## 6.2 Elaboración de extractos orgánicos y acuosos de *Egrecia menziesii* y *Undaria pinnatifida*

Una vez que los especímenes estuvieron completamente secos, cada especie se trituró mecánicamente por separado utilizando un molino para granos (Sanbar) y se obtuvo por cada alga un polvo homogéneo que contenía tantos los estipes como las frondas de cada especie de macroalga. Los triturados se almacenaron en frascos limpios en un lugar seco y protegido de la luz hasta su uso. Tanto para los extractos orgánicos como para los acuosos el proceso de extracción se llevó a cabo mediante una destilación con el extractor Soxhlet durante un periodo de 12 a 24 horas, utilizando 12.5 g de polvo de alga triturada en 250 mL de solvente metanol al 99.8% para los extractos orgánicos y, agua destilada para los extractos acuosos (Figura 15). El solvente elegido, metanol se seleccionó de acuerdo a los reportes previos realizados en nuestro grupo de investigación (Gutiérrez Rodríguez, 2018). El extracto obtenido se evaporó con ayuda de calor para eliminar la mayor parte de solventes sin llegar al punto de burbujeo, el proceso debió ser lento. En el caso del solvente acuoso, este se hizo con agua destilada para probar el rendimiento y efecto en ambos

tratamientos de un mismo espécimen. Una vez que los extractos (1 metanólico y 1 acuoso de *Egregia menziesii*, y 1 metanólico y 1 acuoso de *Undaria pinnatifida*) fueron evaporados, el concentrado pasó por una membrana de diálisis (membrana Spectrapore, corte molecular 12,00) durante 10-12 horas hasta que no se tuvieron rastros de sales, esto se observó precipitando el dializado con una solución de nitrato de plata al 10% (Cedrola & Charola, n.d.). Los concentrados obtenidos se colocaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL que contenían 1 ml de extracto, las cuales se mantuvieron en congelación a -80°C, y posteriormente fueron liofilizadas con un liofilizador Labconco y, conservadas en seco hasta su uso. En la figura 14 se muestran fotografías del proceso descrito anteriormente.



**Figura 14.** Proceso para obtener extractos metanólicos y acuosos de *Egrecia menziesii* y *Undaria pinnatifida*. El polvo de las algas trituradas se colocó en frascos para su conservación (a). Los extractos acuosos se hidrataron previamente con agua destilada durante 48 hrs (b). Las soluciones obtenidas se evaporaron con calor a temperaturas controladas, aproximadamente de 47°C (c). Las muestras liofilizadas se concentraron y congelaron a -80° C (d). El extracto liofilizado se guardó en un tubo falcon de 15 mL, hasta su uso.



**Figura 15.** Visualización rápida del proceso de extracción metanólico y acuoso por el sistema Soxhlet de las especies *Egregia menziesii* y *Undaria pinnatifida*.

### 6.3 Determinación de DL<sub>50</sub> en *Artemia salina* y en eritrocitos humanos

Para evaluar los efectos tóxicos potenciales de un químico (u otro agente) sobre la biota, es necesario establecer una relación cuantitativa reproducible entre la exposición a las sustancias químicas y alguna medida de daño al organismo o grupo

de organismos bajo investigación (Peluso, n.d.). Es por eso que en esta investigación utilizamos un organismo completo *Artemia salina*. También utilizamos eritrocitos humanos, ambos ensayos son un método válido y eficaz para evaluar la citotoxicidad y toxicidad *in vitro* de productos vegetales (Canuto et al., 2019). En todos los ensayos realizados para determinar DL<sub>50</sub> los grupos experimentales fueron los que se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2.** Grupos experimentales y sus abreviaturas.

Control (+): DMSO
Control (-): H <sub>2</sub> O <sub>m</sub> (Agua de mar estéril y filtrado)
Up-Ac: <i>Undaria pinnatifida</i> acuoso
Up-Met: <i>Undaria pinnatifida</i> metanólico
Em-Ac: <i>Egregia menziesii</i> acuoso
Em-Met: <i>Egregia menziesii</i> metanólico

### 6.3.1 *Artemia salina*

El método para determinar la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) consiste en que los huevos de *Artemia salina* se incubaron en una solución de agua de mar a temperatura ambiente durante 48 hrs, bajo aireación e iluminación constante. Los extractos se solubilizaron en agua de mar a concentraciones de 50, 500 y 1000 µg/mL. Los ensayos se realizaron en cajas de Petri previamente esterilizadas. Una vez que eclosionaron los organismos de *Artemia salina*, en cada caja se pusieron 10 individuos en contacto con la solución de extracto cómo se muestra en la figura 16 ("Identificación de resinas glucosídicas", 2018). El monitoreo para la determinación del número de organismos vivos y muertos se realizó a través de una lupa comercial de 5 aumentos a las 12, 24 y 48 horas. Se empleó como control negativo DMSO al 10% para obtener una mortalidad del 100% (sobrevivencia del 0%); el grupo control fue tratado con agua de mar estéril y filtrada.



**Figura 16.** Sistema para eclosionar *Artemia salina* (a) y placas para ensayos (b). Se muestra el sistema para eclosión de *Artemia salina* y las placas multipozos para evaluar sobrevivencia a las 12, 24 y 48 hrs.

### 6.3.2 Eritrocitos humanos

Para el aislamiento de eritrocitos se realizó lo siguiente:

1. Se recolectaron muestras de sangre de una persona sana donador voluntario. Para la toma de la muestra se empleó jeringa estéril de 5 mL y tubos heparinizados de 5 mL.
2. La muestra se centrifugó a 3500 rpm y se retiró el suero.
3. La muestra se suspendió en PBS al 1 X, posterior a esto se centrifugó nuevamente.
4. El paso 3 se realizó 5 veces o hasta que el sobrenadante fuera totalmente transparente.
5. Una vez que realizamos los lavados se preparó un stock, que es una solución de eritrocitos al 2%, y esta solución fue la que se utilizó en los ensayos (Zohra & Fawzia, 2014).

Preparación de muestras:

1. El vehículo que se utilizó fue Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS) a 1 X.

2. Se realizaron los cálculos pertinentes para obtener concentraciones de 50, 500 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en 300  $\mu\text{L}$ , el volumen final que se colocó en las placas de 96 fue de 300  $\mu\text{L}$  c/u. Este se realizó por cuadruplicado.

Los cálculos para las tres concentraciones diferentes 50, 500 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extractos de *Egregia menziesii* y *Undaria pinnatifida*, disueltas en 400  $\mu\text{L}$  de PBS se hicieron de acuerdo a lo siguiente:

Para 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ :

$50 \mu\text{g} - 1000 \mu\text{L}$

20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  – 400  $\mu\text{L}$ ; estos 400  $\mu\text{L}$  se utilizaron para el ensayo, agregando 100  $\mu\text{L}$  a cada uno.

$$20 \mu\text{g} \times 4 = 80 \mu\text{g} = 0.00016 \text{ g}$$

---

Para 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  :

$500 \mu\text{g} - 1000 \mu\text{L}$

200  $\mu\text{g}$  – 400  $\mu\text{L}$  ; estos 400  $\mu\text{L}$  se utilizaron para el ensayo, agregando 100  $\mu\text{L}$  a cada uno.

$$200 \mu\text{g} \times 4 = 800 \mu\text{g} = 0.0008 \text{ g}$$

---

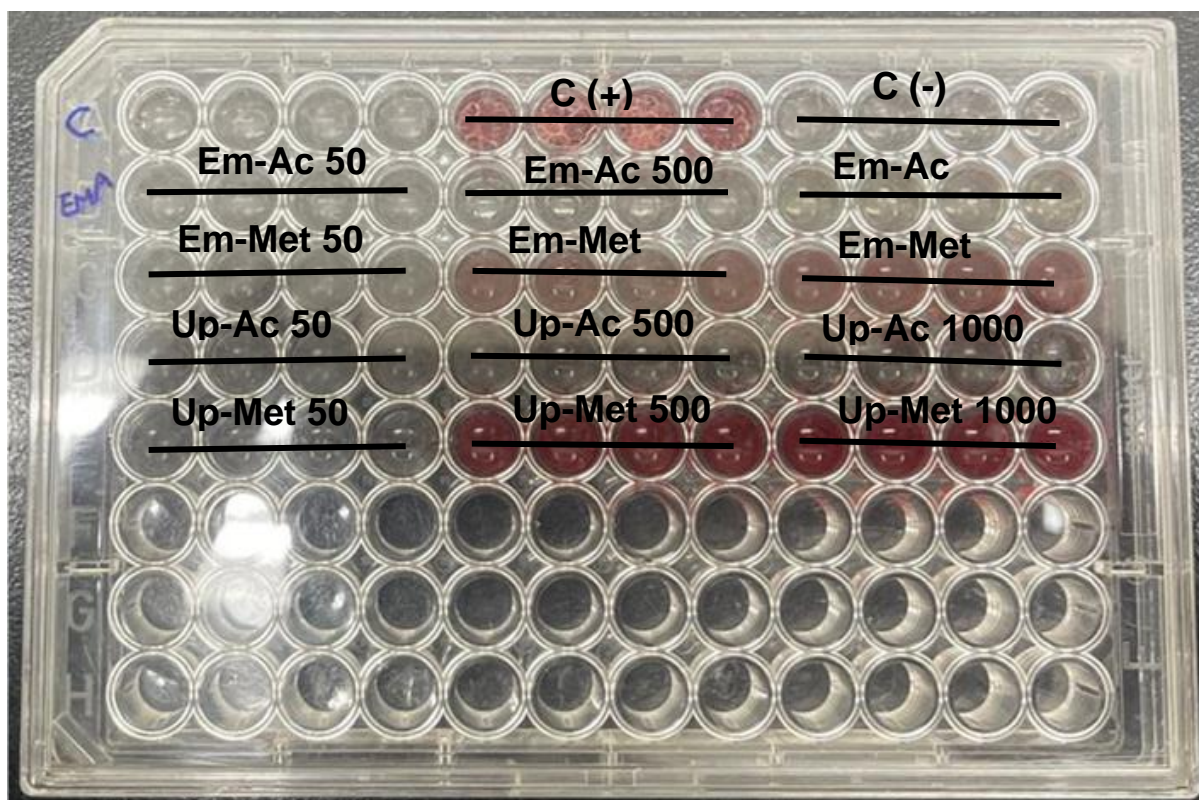
Para 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ :

$1000 \mu\text{g} - 1000 \mu\text{L}$

400  $\mu\text{g}$  – 400  $\mu\text{L}$  ; estos 400  $\mu\text{L}$  se utilizaron para el ensayo, agregando 100  $\mu\text{L}$  a cada uno.

$$400 \mu\text{g} \times 4 = 1600 \mu\text{g} = 0.0016 \text{ g}$$

En una placa de 96 pozos se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de la solución de eritrocitos y se le agregaron 100  $\mu\text{L}$  de disolución de los extractos. En la figura 17 se muestra cómo se colocaron las muestras en la placa de 96 pozos.



**Figura 17.** Ensayo de toxicidad en eritrocitos humanos. Visualización de cómo los tratamientos fueron colocados en placa de 96 pozos a diferentes concentraciones, utilizando cómo control positivo (C+) Tritón X-100 para obtener una lisis del 100%, cómo control negativo (C-) PBS: Phosphate Buffered Saline por sus siglas en inglés, Em-Ac: *Egrecia menziesii* acuoso, Em-Met: *Egrecia menziesii* metanólico, Up-Ac: *Undaria pinnatifida* acuoso y Up-Met: *Undaria pinnatifida* metanólico.

**Tabla 3.** Concentraciones y controles para ensayo en eritrocitos humanos.

Concentración de extractos	Control (+)	Control (-)
50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Solución al 2%	Triton X-1000 al 0.1%
500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Solución al 2%	Triton X-1000 al 0.1%
1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Solución al 2%	Triton X-1000 al 0.1%

El equipo que se utilizó para llevar a cabo la lectura fue Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA); la placa se leyó a 540 nm de acuerdo a protocolos anteriores (Zohra & Fawzia, 2014).

## 6.4 Ensayos celulares en 3T3-NIH

En este proyecto se utilizó la línea celular 3T3-NIH que originalmente fue aislada de un embrión de ratón (3T3-L1 - CL-173; ATCC Manassas, Virginia, USA) y que fue amablemente donada por el Dr. Arturo Ortega Soto.

### 6.4.1 3T3-NIH línea celular

Para poder manejar esta línea celular estableceremos algunas metodologías para mantener el cultivo celular y otros procesos que se llevaron a cabo a lo largo de la diferenciación de estos fibroblastos a células adiposas, los protocolos descritos detalladamente se encuentran en el apartado de anexos.

### 6.4.2 Cultivo de células 3T3-NIH

Las células se descongelaron lentamente (Ver anexo 9.4), se sembraron en placas de 6 cm con medio de cultivo suplementado con antibiótico/antimicótico, SFB al 15 %, y glutamina (Ver anexo 9.1). El mantenimiento de las células depende del tiempo en que se trabaje con ellas, regularmente el cambio de medio lo realizamos cada 5-6 días. Realizamos varios pases celulares por medio de tripsinización (Anexo 9.2) para poder tener una mayor cantidad de células; los 9 ensayos se realizaron por cuadruplicado requiriendo llevar a confluencia las células varias veces hasta obtener una mayor cantidad de células y con ello dar inicio a los ensayos.

### 6.4.3 Diferenciación de fibroblasto en adipocito

Para diferenciar las células 3T3-NIH de su fenotipo fibroblástico en adipocitos, generalmente se tratan las células después de que se detiene su crecimiento, con agentes pro diferenciativos. Los agentes que usamos en el presente trabajo son los que se describen en la tabla 4, y el procedimiento utilizado se presenta en la figura 18.

**Tabla 4.** Agentes pro diferenciativos (Zebisch et al., 2012a).

Insulina	La concentración varía dependiendo el lote
----------	--

Dexametasona	Disolvente: Agua
IBMX	Disolvente: DMSO



**Figura 18.** Proceso de diferenciación utilizado para las células 3T3-NIH de fibroblastos a células adiposas.

La línea celular 3T3-NIH se utilizó para evaluar el efecto de los extractos que obtuvimos de las macro algas *Egrecia menziesii* y *Undaria pinnatifida*, tanto acuosos como metanólico, también evaluamos otros reactivos que en conjunto con los extractos mejoran nuestros resultados y comparación de los mismos. En la tabla 5 se muestra la lista de ensayos realizados.

**Tabla 5.** Ensayos realizados en línea celular 3T3-NIH.

1. Control de células normales	<p>Todas las pruebas se realizaron por cuadruplicado y se evaluó en cada condición:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Morfometría de las células (visualización bajo microscopio)</li> <li>● Ensayos de MTT</li> <li>● Tinción de rojo O (evaluación de acumulación de triglicéridos en células adiposas o no)</li> </ul>
2. Fucoïdan -Grado reactivo 99% pureza	
3. Ac. Palmítico- Evaluar respuesta ante un ácido graso	
4. Ac. cítrico - Evaluar ante antioxidante	
5. E.1 Acuoso <i>Egrecgia menziesii</i>	
6. E.2 MeOH <i>Egrecgia menziesii</i>	
7. E.3 Acuoso <i>Undaria pinnatifida</i>	
8. E.4 MeOH <i>Undaria pinnatifida</i>	
9. Antilipídémico Medicamento utilizado para tratar la obesidad	

#### 6.4.4 Morfometría celular

Para evaluar la morfometría las células se sembraron en placas multipozos de 12 que contenían vidrios tratados con Poli-L-lisina (Ver anexo 9.8) para una mejor adherencia. Las células 3T3-NIH de tipo fibroblasto se mantuvieron por 5 días hasta llegar a confluencia, una vez que nuestras células están en punto de confluencia inició el proceso de diferenciación. Ya que las células se diferenciaron en adipocitos se agregaron los diferentes tratamientos por un periodo de 6 días. Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>; todos los tratamientos fueron realizados por cuadruplicado. Los diferentes grupos fueron: a) grupo control, las células no recibieron ningún tratamiento después del proceso de diferenciación; b) las células adiposas fueron expuestas con fucoïdan con 99% de pureza a concentración de 1000 µg/mL; c) tratamiento con ácido graso, en este caso se probó ácido palmítico a una

concentración de 25  $\mu\text{M}$  cómo lo describieron los autores Moreno Castellanos et al., 2021; d) se expusieron al antioxidante ácido cítrico a una concentración de 21  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Correa Lozano, 2023); e) y f) (Em) se refiere a *Egregia menziesii* en este caso dos extractos de *E. menziesii* acuoso y *E. menziesii* metanólico, ambos extractos en la misma concentración de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  cómo se ha reportado en otros estudios (Gutiérrez Rodríguez, 2018); g) y h) *Undaria pinnatifida* acuoso (Up-Ac) y *Undaria pinnatifida* metanólico (Up-Met), también cómo se describió anteriormente la concentración utilizada fue de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; i) se utilizó un fármaco conocido para el tratamiento de la obesidad con nombre científico Tetrahidrolipstatina (Orlistat de nombre comercial) a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  (Celis et al., 2008a).

Una vez pasado el tiempo de exposición bajo los tratamientos los vidrios que contienen las células fueron fijados y después teñidos por el método de tinción con Rojo Oleoso, o Rojo O (Véase en anexo 9.5), tinción que es utilizada para la detección de grasas neutras o gránulos de polietileno en tejidos histológicos, en la patología articular, así como en material de muestra citológico (Fisher Scientific, n.d). La tinción de rojo oleoso proporciona una intensa y luminosa coloración en rojo de los lípidos. El rojo oleoso es un colorante lipófilo que, debido a su comportamiento de solución se difunde hacia los lípidos del tejido.

Con ayuda del microscopio Nikon binocular Eclipse E200 (Nikon Instruments Inc) se evaluó la forma celular utilizando un objetivo de 100X y aceite de inmersión.

Para las mediciones de área de las células 3T3-NIH se utilizó el Software ImageJ (Carl Zeiss Microscopy, Axiovision Software, White Plains, USA), el cual también realiza conteo de células y calcula el área de cada una de ellas. Para las mediciones de largo y ancho utilizamos el Software Axiovision (Carl Zeiss Microscopy GmbH).

#### **6.4.5 Ensayos de MTT**

El ensayo con MTT se utilizó para medir la actividad metabólica celular como indicador de la viabilidad, la proliferación y la citotoxicidad celulares. Este ensayo colorimétrico se basa en la reducción de una sal de tetrazolio amarilla (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT) a cristales de formazán de color morado por las células metabólicamente activas. Las células viables contienen enzimas oxidorreductasas dependientes del NAD(P)H que reducen el TTM a formazán. Cuanto

más oscura sea la disolución, mayor será el número de células metabólicamente activas viables (Mosmann, 1983).

Se sembraron células 3T3-NIH en placas de 96 pozos, y una vez que alcanzaron la confluencia a los 5 días se le agregaron los diferentes tratamientos de macroalgas por un periodo de 6 días; cada tratamiento se realizó por cuadruplicado.

Una vez que el tratamiento finalizó, se retiró el medio que contenía cada pozo y se agregó 10  $\mu\text{L}$  de marcaje MTT, se mantuvo en incubadora durante las 4 horas posteriores; pasado el tiempo se agregó 100  $\mu\text{L}$  disolución solubilizadora a cada pozo y se dejó reposar durante toda la noche (Anexo 9.6). Una vez transcurrido el tiempo se midió la absorbancia en un lector de placas multipozo a 570 nm Thermo Scientific™ Multiskan™ GO.

## 6.5 Análisis estadístico

Todos los ensayos se hicieron por cuadruplicado y se reportó el promedio más menos la desviación estándar ( $\pm\text{SD}$ ) de cada valor. A los datos obtenidos se le realizaron pruebas de normalidad, homogeneidad y homocedasticidad. Dado que ninguno de los ensayos presentó un comportamiento normal con las pruebas de D'Agostino & Pearson y Shapiro-Wilk realizadas con ayuda del Software GraphPad (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA), se realizaron análisis no paramétricos con una posterior prueba de comparación de Dunns. Los valores obtenidos más menos su desviación estándar ( $\pm\text{SD}$ ) se reportan en las tablas y gráficas que se presentan en el apartado de resultados. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando P presentó una significancia de 0.05.

## 7. Resultados y discusión

### 7.1 Rendimientos de extractos de *Egregia menziesii* y *Undaria pinnatifida*

Después de seguir la metodología descrita en los puntos 6.1 y 6.2 se realizó un registro del rendimiento de las muestras, y los resultados se muestran en la tabla 6. Los resultados muestran que el peso seco total obtenido de *Egregia menziesii* y *Undaria pinnatifida* en medio acuoso y metanólico después del proceso de liofilización, varía entre los 0.7914 y el 1.5659 g, lo que representa un rendimiento entre el 1.583 y el 3.134% (Tabla 6 y Figura 19).

**Tabla 6.** Peso seco total de *Egregia menziesii* y *Undaria pinnatifida*.

Tipo de muestra	Cantidad de tubos con 1 mL c/u	Peso seco total de extracto
Em-Ac	17 tubos	PST: 1.4615 g
EM-Met	24 tubos	PST: 0.7914 g
UP A	37 tubos	PST: 1.1988 g
UP M	24 tubos	PST: 1.5659 g

En estudios similares se reporta que en general los extractos etanólicos promueven los porcentajes de extracción más altos para la mayoría de las especies de algas. Silva y colaboradores (2021) hicieron un estudio en el que hablan de rendimientos en 9 tipos distintos de algas pardas, dentro de esas se encuentra una del orden laminaria y también está *Undaria pinnatifida*; los autores realizaron pruebas utilizando como solvente el etanol, la acetona, el acetato de etilo, el cloroformo y el hexano. Encontraron que el mayor porcentaje de rendimiento fue con etanol en *Undaria pinnatifida* con un 38.8% y, el más bajo de 2.20% con acetato de etilo; en *Laminaria ochroleuca*, el porcentaje más alto se obtuvo con etanol (19.2%) y el más bajo con hexano (0.60%). En comparación con estos resultados nosotros obtuvimos un mayor rendimiento con *Undaria pinnatifida* cómo se puede observar en la gráfica 1, con la diferencia que el solvente en uso fue metanol, aunque el método de extracción que describen estos autores es muy similar al usado en el presente trabajo.

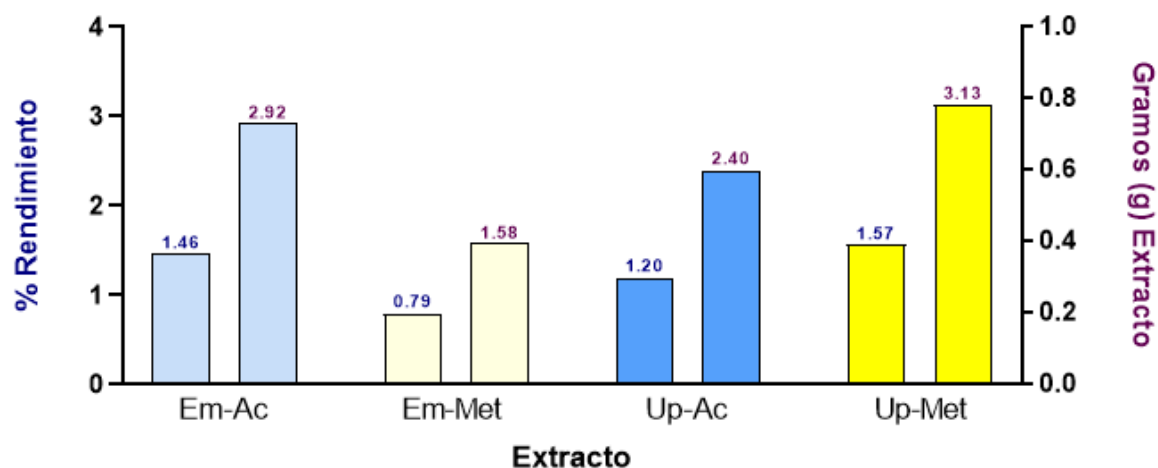
**Tabla 7.** Cálculos para rendimiento en porcentaje respecto al peso seco inicial.

Rendimiento total respecto a cantidad inicial	
50 g de macro alga EM A	100 %
1.4615 g de extracto EM A	2.923% rendimiento

50 g de macro alga EM M	100 %
0.7914 g de extracto EM M	1.5826% rendimiento
50 g de macro alga UP A	100 %
1.1988 g de extracto UP A	2.3976% rendimiento
50 g de macro alga UP M	100 %
1.5669 g de extracto UP M	3.1338% rendimiento

Como se observa, los resultados de rendimiento que obtuvimos con nuestros extractos se encuentran dentro de los parámetros que han sido reportados por otros autores, aún con el mismo tipo de macroalga (colectada en sitios distintos) y utilizando otros solventes orgánicos. No podemos decir que tenemos los mismos resultados ya que cada proceso fue elaborado con distintos parámetros (como temperatura, tiempo de extracción, solvente y equipo utilizado), y cómo se mencionó antes, depende mucho de la especie y factores ambientales del sitio de recolecta de las algas. En este sentido se sabe que el cambio estacional en la temperatura del agua de mar es un factor ambiental importante para el cambio en la distribución de las macroalgas y la composición de sus compuestos bioactivos (Garcia-Vaquero et al., 2021; Konstantin et al., 2023). Los estudios demuestran que hay una evidente alternancia estacional de macroalgas y que existen diferencias en el número de especies y biomasa de macroalgas en distintas estaciones (J. Guo et al., 2022). Además, diversos estudios hablan acerca de cómo influyen factores ambientales en la composición de estos bioactivos particularmente en los presentes en las macroalgas pardas (Veršić Bratinčević et al., 2023; Almeida et al., 2021); esto puede ir desde la estación en que se encuentre, la zona intermareal, la temperatura del mar, o diferencias entre subespecies (Zubia et al., 2020; Kammler et al., 2024). Debido a estos cambios en la composición de las macroalgas, hay estudios que sugieren el hacer pruebas cada vez que se experimente con ellas, ya que aun siendo de la misma especie podrían presentar cambios en las concentraciones de los compuestos que

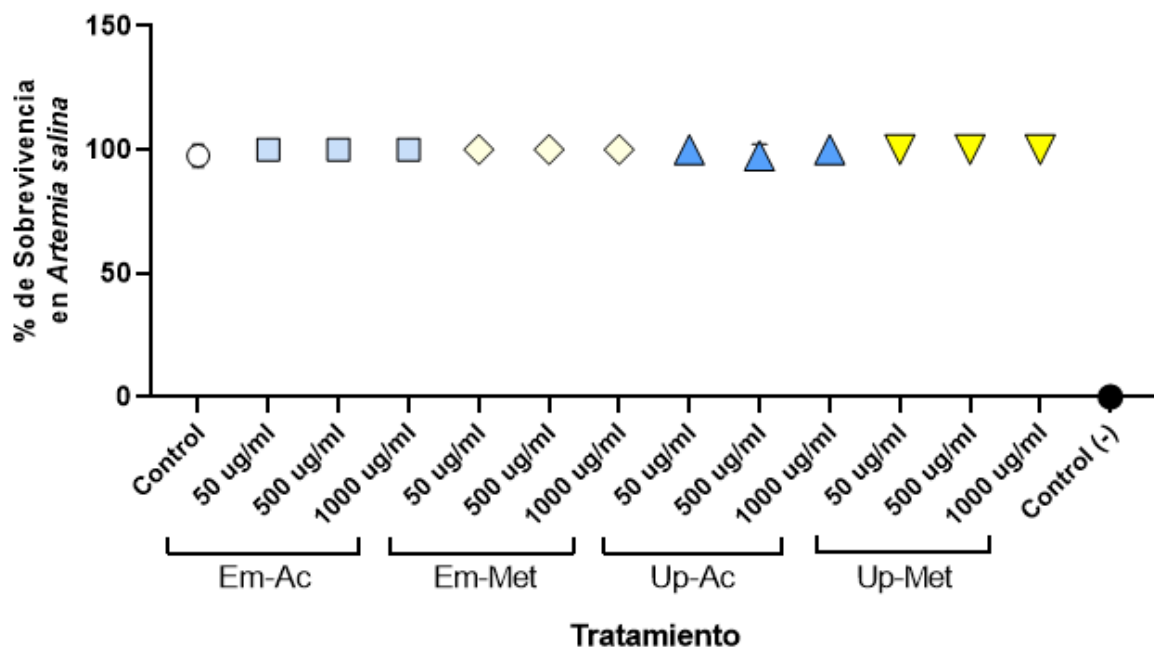
éstas puedan tener (Rachanamol et al., 2016).



**Figura 19.** Representación gráfica de los gramos de extracto seco contra el porcentaje de rendimiento para cada extracto de *Egrecia menziesii* y *Undaria pinnatifida*, partiendo de 50 g de polvo seco por extracto.

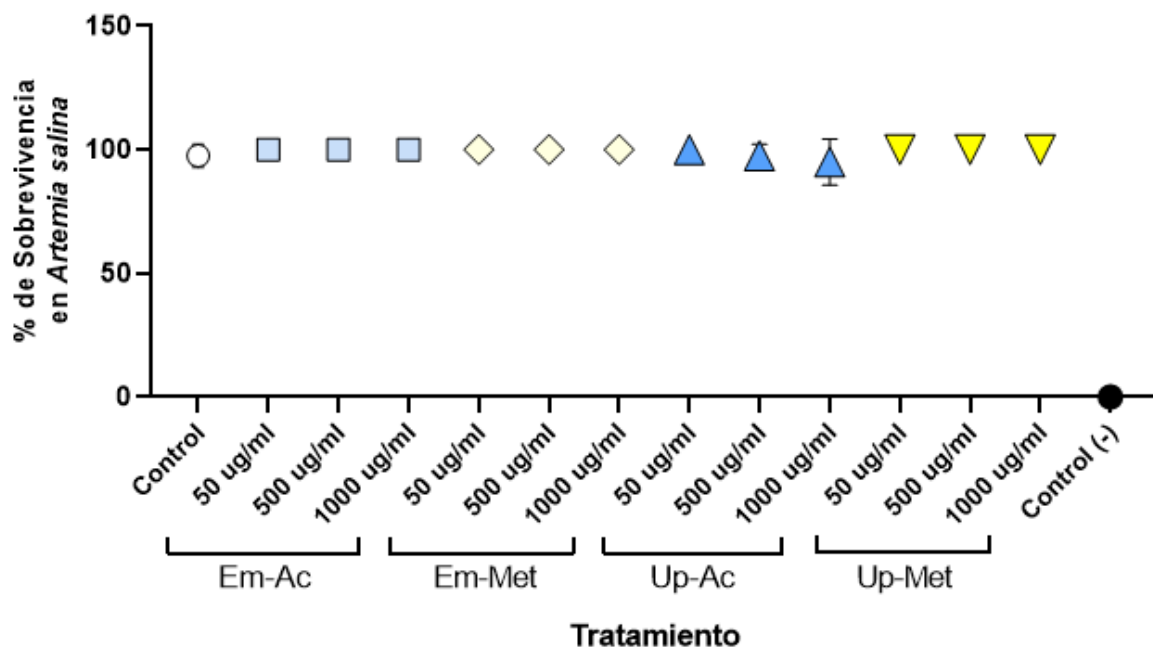
## 7.2 Evaluación de extractos en *Artemia salina*

La toxicidad resultante de los 4 extractos de *Egrecia menziesii* y *Undaria pinnatifida* en el modelo *Artemia salina* se presenta en la figura 20, donde podemos observar que no existe una letalidad significativa en los ensayos a las 12 horas; el extracto Up-Ac a  $500 \mu\text{g/mL}$  tuvo un valor de sobrevivencia del 97.5% y el resto de ensayos se mantuvieron al 100%; en el control (C) la sobrevivencia fue del 97.5% y en el control negativo (C -, tratadas con DMSO al 10%) de un 0%.



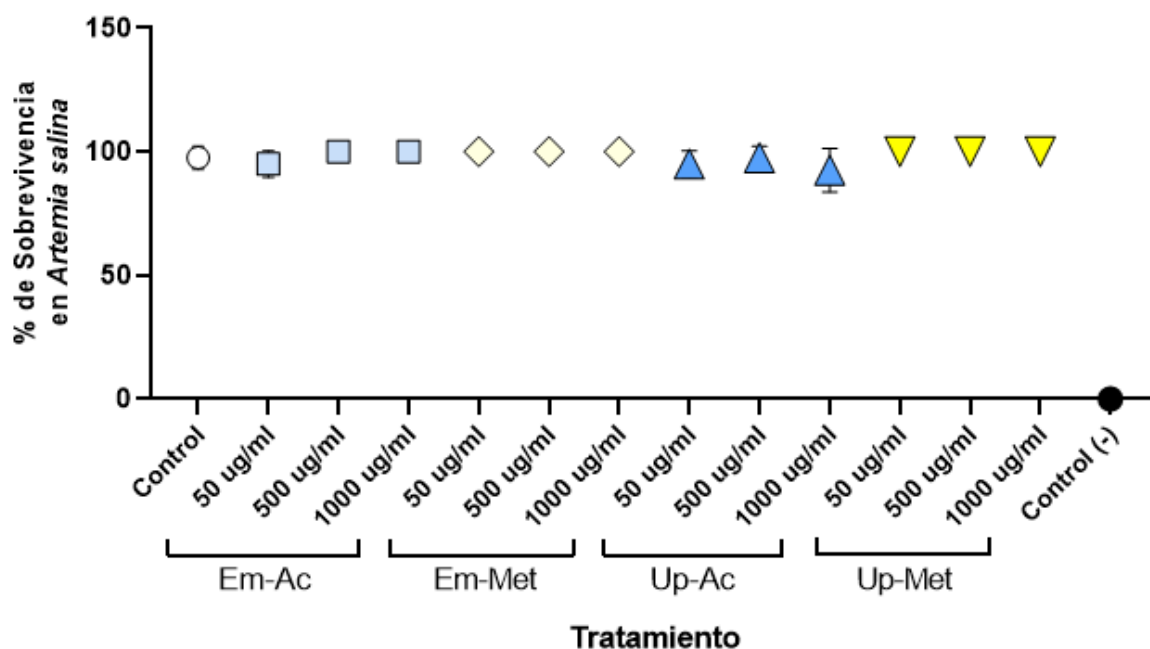
**Figura 20.** Representación gráfica de la supervivencia de *Artemia salina* expuesta 12 horas a los extractos de *Egregia menziesii* y *Undaria pinnatifida*.

La figura 21 muestra los resultados de toxicidad de los extractos con las artemias a las 24 horas de exposición; se observa que las supervivencias se mantienen sin diferencia significativa con un 97.5% para el extracto de Up-Ac 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y un 95% de supervivencia para el extracto de Up-Ac 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; los grupos control se mantienen en el mismo valor que el mencionado para las 12 horas.



**Figura 21.** Representación gráfica de la supervivencia de *Artemia salina* expuesta 24 horas a los extractos de *Egrecia menziesii* y *Undaria pinnatifida*.

A las 48 horas de exposición (Figura 22) se observa que no hay diferencia significativa en la supervivencia de *Artemia salina* expuesta a los extractos de los distintos grupos experimentales; se obtuvieron valores de 92.5% de supervivencia para el grupo Up-Ac a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , siendo este el valor más bajo, 95% para los grupos Up-Ac 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y Em-Ac 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 97.5% para el grupo Up-Ac a 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; los valores de los controles se mantuvieron igual que a las 12 y 24 horas de tratamiento: control 97.5% y en el control negativo de un 0%.



**Figura 22.** Representación gráfica de la supervivencia de *Artemia salina* expuesta 48 horas a los extractos de *Egrecia menziesii* y *Undaria pinnatifida*.

Los resultados de *Artemia* coinciden con los estudios realizados por Gutiérrez Rodríguez (2018) a concentraciones iguales o mayores a 1000 µg/mL, en donde los organismos no presentaron toxicidad ante extractos de la especie *Egrecia menziesii*. En el caso de los ensayos con los extractos de *Undaria pinnatifida* tampoco se observó toxicidad a dichas concentraciones, y a la fecha no hay estudios reportados con este organismo modelo y esta especie de macroalga.

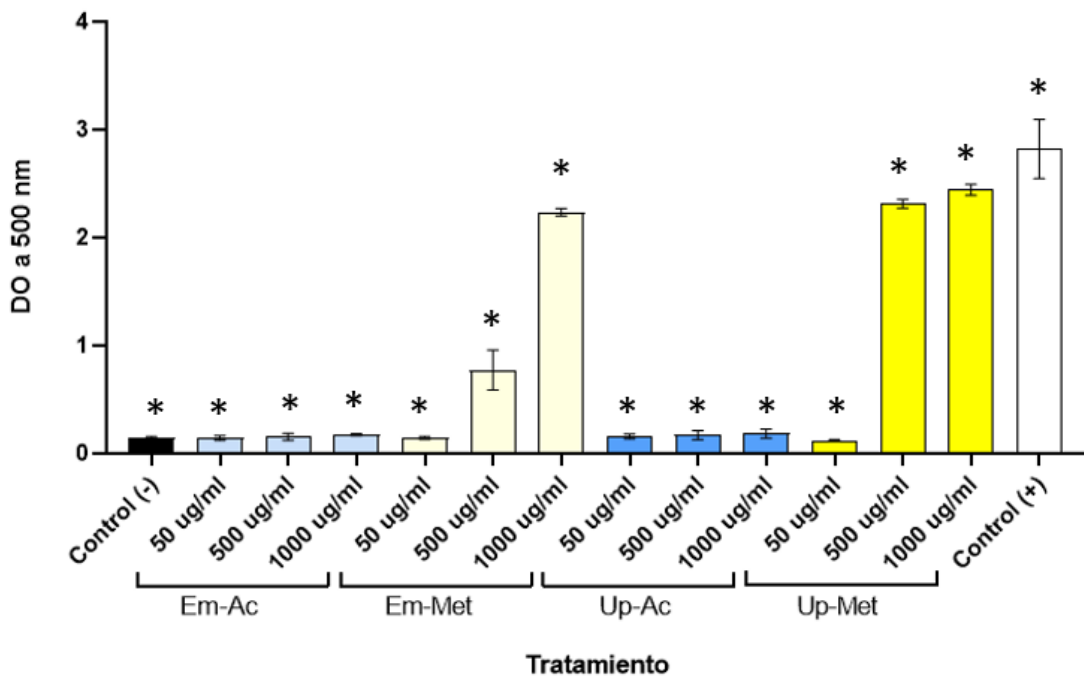
Cabe mencionar que este tipo de ensayos en *Artemia salina* se utilizan ampliamente en el análisis de compuestos bioactivos para plantas terrestres (Castañedo et al., 2019). Para el caso de las algas marinas, existen reportes donde se evalúa el efecto de letalidad de las macroalgas en *Artemia salina* como organismo de prueba (Dini et al., 2019) mientras que en otros estudios de compuestos bioactivos la toxicidad de las algas marinas se evalúa directamente en la línea celular de estudio (Shunmugiah Mahendran et al., 2024).

En los diferentes tiempos en que se evaluó la viabilidad de *Artemia salina* bajo los

diferentes extractos y controles, no se mostró una letalidad significativa en concentraciones de 50, 500 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , lo cual nos resulta favorable para los ensayos posteriores y, nos permitió continuar ya que por medio de esta prueba podemos inferir que los extractos no generarán una toxicidad aguda en la línea celular 3T3-NIH. Cabe mencionar que en nuestro grupo de trabajo se evalúa la toxicidad de los extractos generados mediante este tipo de ensayos, como se explicará más adelante. Aunado a esto, la NOM-Y-302-1988 (Norma Oficial Mexicana, DOF 2024) establece que para los agentes xenobióticos se deben realizar pruebas preclínicas en modelos como la *Artemia salina*, si el objetivo final es que dicho compuesto sea utilizado en humanos.

### **7.3 Evaluación de extractos en eritrocitos humanos**

Los resultados de la prueba hemolítica (Figura 23) muestran que los extractos de Em-Ac a concentraciones de 50, 500 y 1000  $\text{g}/\text{mL}$ , Em-Met a concentraciones de 50, 500  $\text{g}/\text{mL}$ , Up-Ac a concentraciones 50, 500 y 1000  $\text{g}/\text{mL}$  y Up-M a 50  $\text{g}/\text{mL}$  no presentan liberación de hemoglobina (hemólisis). El control positivo como se esperaba presenta una densidad óptica superior a 2.5 nm y el negativo menor a 0.25 nm, debido a la liberación de hemoglobina en cada caso. Dados los resultados obtenidos, es recomendable que para los extractos de Em-Met 1000  $\text{g}/\text{mL}$ , Up-Met 500 y 1000  $\text{g}/\text{mL}$  se realicen pruebas adicionales, en caso de que se desee trabajar con concentraciones mayores a éstas, para encontrar la concentración que no cause el rompimiento de los eritrocitos.



**Figura 23.** Mediciones de densidad óptica (DO) a 540 nm de hemoglobina libre en una solución de eritrocitos humanos al 2% tratados con diferentes concentraciones de los extractos de *Egrecia menziesii* y *Undaria pinnatifida*. Las barras representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 4 réplicas realizadas.

El efecto hemolítico que observamos con algunas concentraciones de extractos de *U. pinnatifida* y *E. menziesii* lo presentan también muchas plantas que contienen sustancias químicas que pueden tener un efecto hemolítico o antihemolítico sobre los eritrocitos humanos (Pagano & Faggio, 2015). Varios informes indican que las membranas de los eritrocitos humanos de distintos tipos de sangre tienen una estabilidad variable determinada a partir de la fragilidad corpuscular media (Baumann et al., 2000; von Petersdorff-Campen & Schmid Daners, 2022). Particularmente, los extractos de plantas pueden afectar positivamente la membrana de los glóbulos rojos y muchas plantas tienen efectos adversos graves, que incluyen la inducción de anemia hemolítica (Sharma & Sharma, 2001; Santos-Filho, 2016). Por lo tanto, es necesario evaluar la actividad hemolítica potencial de muchas de las plantas comúnmente utilizadas como lo realizaron Zohra y Fawzia (2014) y de igual manera, el de los extractos de algas marinas. El realizar este tipo de ensayos con eritrocitos humanos tiene la ventaja de que las evaluaciones de toxicidad se pueden hacer de

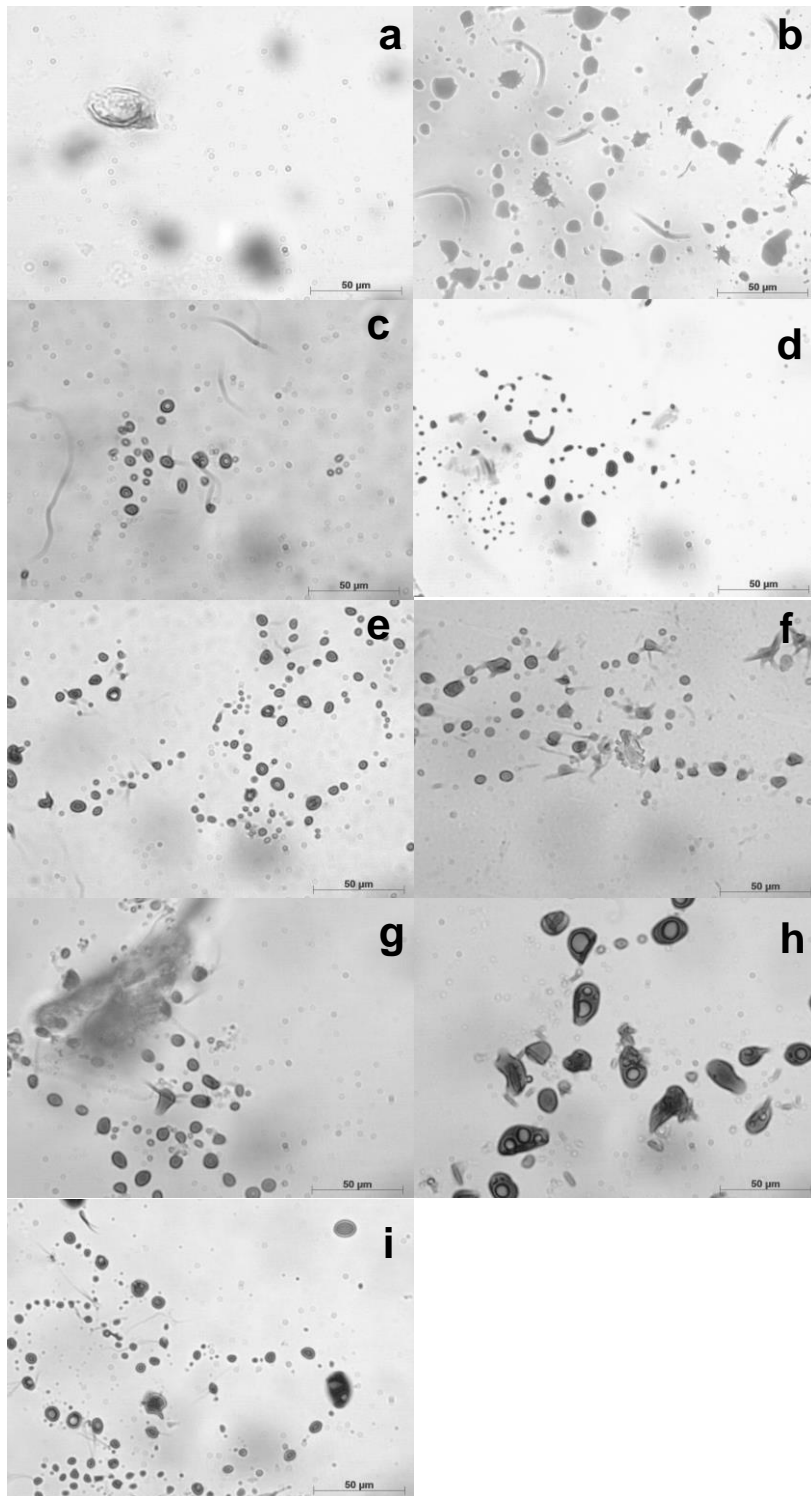
forma más económica, rápida y reproducible.

## **7.4 Ensayos celulares en línea 3T3-NIH**

### **7.4.1 Morfometría celular**

Al observar bajo el microscopio los cultivos de células 3T3-NIH tratadas con los extractos obtenidos de macroalgas, se detectaron diferencias en la forma y tamaño de éstas. En la figura 24 se observa que las células control presentan un mayor tamaño en comparación con los otros 8 tratamientos (Figura 24-a); además se observa que las células de este grupo tienen una forma alargada. Con el tratamiento de fucoïdan (Figura 24-b) las células se ven más pequeñas en comparación con el control y su forma es semi redondeada. Para el caso del ácido cítrico (Figura 24-d) las células redujeron considerablemente su tamaño en comparación con lo observado en el tratamiento de fucoïdan y el grupo control, presentando una forma redondeada y una evidente disminución en el número de células. En el tratamiento con ácido palmítico (Figura 24-c) se pueden observar células redondas de pequeño tamaño. Con el extracto de Em-Ac (Figura 24-e) se observa un mayor número de células pequeñas, en comparación al control, pero con una forma más redondeada. Para el extracto Em-Met (Figura 24-f) el tamaño celular es mayor en comparación al extracto Em-Ac (Figura 24-e) y con una forma no completamente redondeada. Con el extracto Up-Ac (Figura 24-g) las células se observan con forma semi redondeada y algunas alargadas, con un tamaño similar al de tratamiento con fucoïdan (Figura 24-b). El extracto Up-Met (Figura 24-h) a diferencia de la mayoría de los tratamientos presenta células más grandes, pero de menor tamaño a las células del control y además con este extracto, tienen formas diversas no observadas con otros tratamientos (Figura 24). En el tratamiento con Tetrahidrolipstatina (Figura 24-i) se ve un mayor número de células en el campo seleccionado, pero es evidente que los tamaños celulares son muy variados y, la mayoría tienen un tamaño menor al del resto de los tratamientos. Cabe mencionar que hasta el momento no se encontraron reportes descriptivos sobre la morfología de la línea celular 3T3-NIH, que incluyan fotografías nítidas de cómo cambia la forma de estas células cuando se exponen a distintos compuestos. Una posible explicación de esto es que la mayoría de los estudios en estas células buscan entender el proceso celular y molecular de diferenciación que sufren las células 3T3-NIH cuando cambian de forma fibroblástica a célula adiposa (Zebisch et al., 2012b;X.

Guo & Liao, 2000; MADSEN et al., 2003). Si bien sí existen reportes de células 3T3-NIH tratadas con distintos compuestos entre los que se incluyen nanopartículas (Alves et al., 2022), extractos de plantas (Farràs et al., 2023) y, extractos de macroalgas (Múzquiz de la Garza et al., 2019) estos reportes no presentan una descripción detallada de los cambios morfológicos que se generan con un tratamiento en particular, y en muchos casos no se hace mención del microscopio con que se observaron las células ni del objetivo utilizado (Giaccio et al., 2023). Considerando esto y el hecho de que las células cambian sustancialmente su forma dependiendo del tratamiento al que sean expuestas, el análisis morfométrico resulta ser bastante interesante y útil para próximas investigaciones con ésta y otras líneas celulares o cultivos celulares expuestos a extractos de macroalgas marinas.



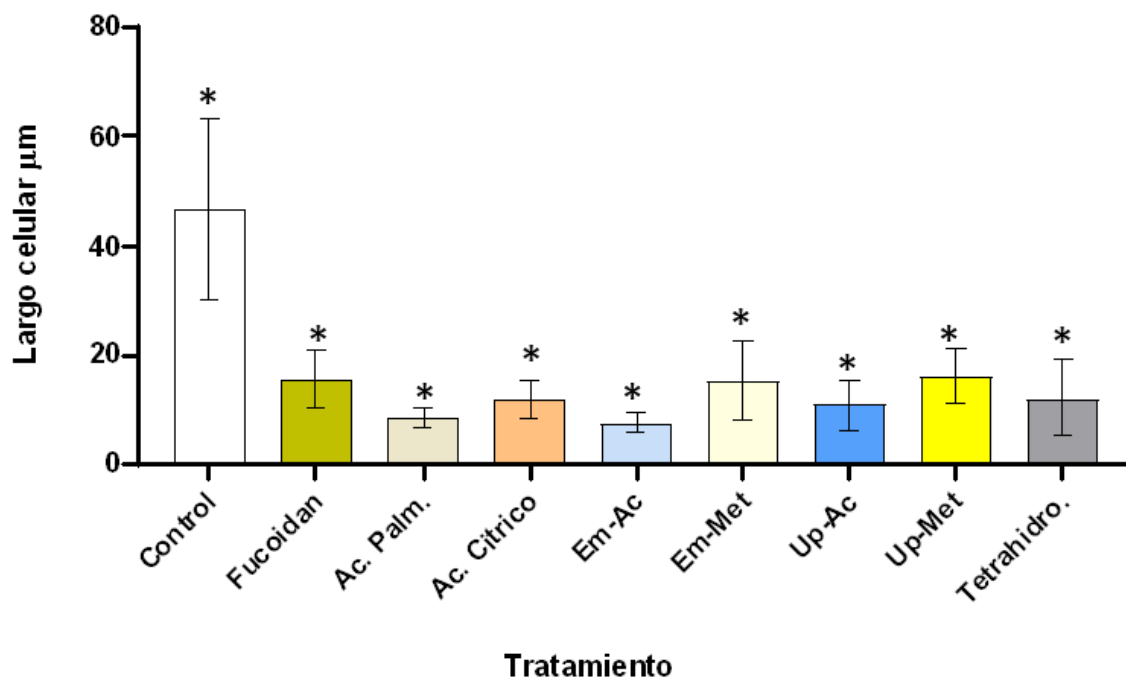
**Figura 24.** Microfotografías de células 3T3-NIH diferenciadas expuestas a distintos tratamientos. La figura muestra células control, sin ningún tratamiento (a), tratadas con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de fucoidan 99% puro (b), con 500  $\mu\text{m}$  de ácido palmítico (c), con 21  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ácido cítrico (d), con 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Em-Ac (e), con 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Em-Met (f), con 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Up-Ac (g), con 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Up-Met (h) y, con 50  $\mu\text{m}$  de Tetrahidrolipstatina (Orlistat de nombre comercial) (i). Las imágenes fueron tomadas utilizando un objetivo de 100X y cada microfotografía cuentan con barra de escala equivalente a 50  $\mu\text{m}$ .

Dado que los cambios morfológicos en las células 3T3-NIH fueron muy notorios entre tratamientos, se procedió a medir tanto el tamaño de las células, considerando su largo y ancho (Figura 25 y 26), como el área interna de las mismas (Figura 27) en cada uno de los tratamientos experimentales. Los datos del tamaño celular y del área de cada grupo experimental presentaron una distribución no gaussiana, por lo cual en todos los casos se realizaron análisis estadísticos no paramétricos (ver anexo 9.9). En la figura 25 se puede observar que hay una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.0001$ ) en el largo celular entre las células del grupo control ( $46.87 \pm 16.51 \mu\text{m}$ ) y las células de los demás tratamientos, ya que las células con fucoidan tuvieron un largo de  $15.71 \pm 5.09 \mu\text{m}$ , las tratadas con ácido palmítico midieron  $8.62 \pm 1.87 \mu\text{m}$ , las del tratamiento de ácido cítrico midieron  $11.92 \pm 3.55 \mu\text{m}$  de largo, mientras que las del extracto de Em-Ac midieron  $7.71 \pm 1.69 \mu\text{m}$ , las de Em-Met tuvieron un largo de  $15.38 \pm 7.34 \mu\text{m}$ , las de Up-Ac  $10.89 \pm 4.36 \mu\text{m}$ , las tratadas con Up-Met  $16.23 \pm 5.05 \mu\text{m}$  y, las que recibieron el tratamiento con tetrahidrolipstatina tuvieron un largo de  $12.21 \pm 6.93 \mu\text{m}$ . El largo de las células entre tratamientos también presentó diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.0001$ ); tal fue el caso para los grupos de fucoidan vs. ácido palmítico y vs. Em-Ac; el grupo de ácido palmítico vs. Em-Met y vs. Up-Met; ácido cítrico vs. Em-Ac; grupo Em-Ac vs. Em-Met y Up-Met; y Up-Ac vs. Up-Met. Además de las mencionadas diferencias a lo largo de las células de los tratamientos, también se observaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo de fucoidan vs. Up-Ac ( $P < 0.0002$ ) y vs. tetrahidrolipstatina ( $P < 0.0005$ ); fucoidan vs. tetrahidrolipstatina ( $P < 0.0014$ ), ácido palmítico vs. ácido cítrico ( $P < 0.0064$ ) y, Em-Ac vs tetrahidrolipstatina ( $P < 0.003$ ), con valor de ( $P < 0.0321$ ) Ac. Cítrico vs. Up-Met y Em-Ac vs. Up-Ac ( $P < 0.0161$ ); el resto de grupos no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

El control presenta un largo aproximado de  $50 \mu\text{m}$  respecto a la media, a diferencia de las demás células bajo su respectivo tratamiento, se observa que ninguna es inferior a los  $20 \mu\text{m}$ , y que los grupos que presentaron un mayor largo son fucoidan, ácido cítrico, Em-Met y Up-Met, y con menor largo ácido palmítico, Em-Ac, Up-Ac y tetrahidrolipstatina.

Hasta el momento no se encontraron reportes donde se realicen mediciones del largo o del ancho de esta línea celular expuestas bajo algún tratamiento, ni con algún

tratamiento de macroalgas o con algún otro compuesto al que las células 3T3-NIH han sido expuestas. Los reportes existentes sobre el largo de estas células se enfocan en evidenciar las características que presentan las células cuando se diferencian en adipocitos (Shao et al., 2013a) y también en comparar la morfometría que estas células presentan contra células tumorales (Radhakrishnan et al., 2017). Cabe mencionar que las medidas del largo de las células 3T3-NIH son consideradas sólo como un referente del cambio morfológico que sufren estas células al diferenciarse (Jessen & Stevens, 2002). En estudios con otro tipo de células las medidas de largo y ancho de ellas se consideran dentro de los parámetros morfológicos a evaluar tras el crecimiento de células tumorales, tal es el caso de las células BEAS-2B y NCI-H522 teñidas con feulgen para evaluar el crecimiento de estas y comparar las diferencias que presentaron (Wolfe et al., 2004)(Wolfe, P., Murphy & et al, 2004), o de las células MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231 en estados fibroquísticos o metastásicos evaluando los métodos de diferenciación morfométrica de cada línea celular (Radhakrishnan et al., 2017). Considerando estos reportes, la medición del largo y ancho en cualquier tipo celular es un parámetro importante a considerar para evaluar el efecto y la toxicidad de distintos compuestos, incluyendo los obtenidos de las macroalgas marinas.

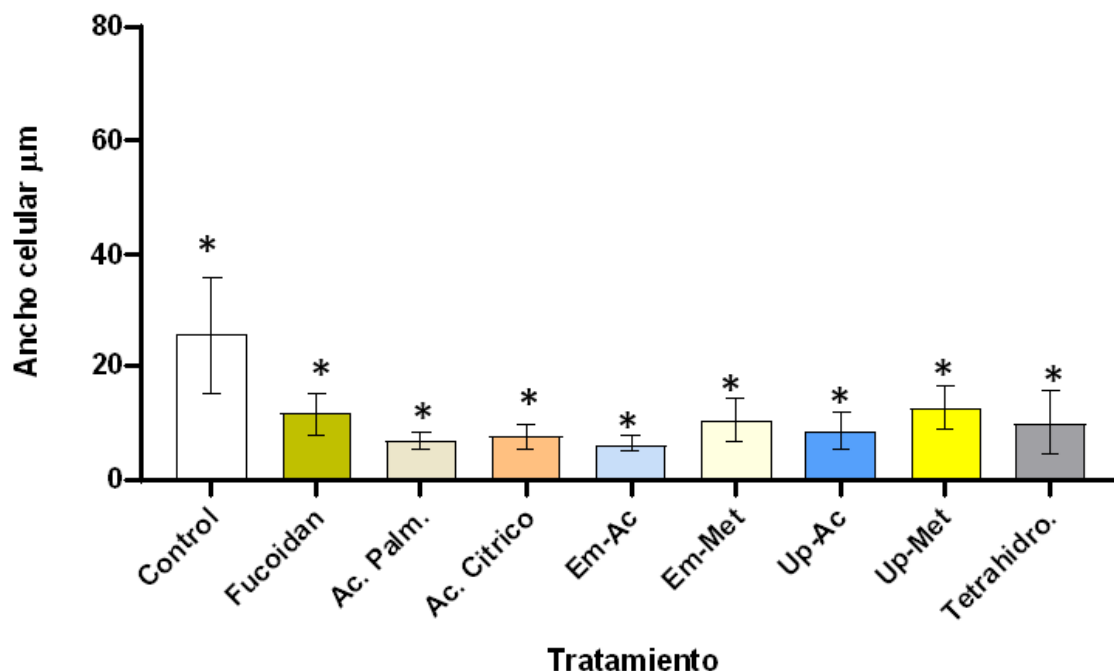


**Figura 25.** Mediciones del largo de las células 3T3-NIH diferenciadas tratadas con distintos extractos de macroalgas y con sus respectivos grupos control. El largo de las células en cada tratamiento, y en el grupo control, se midió con el Software Axiovision (Carl Zeiss Microscopy, Axiovision Software, White Plains, USA) y los datos se procesaron con el programa estadístico GraphPad Prism (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA). Control: células diferenciadas sin tratamiento alguno; Fucoïdan: 100 μg/mL de fucoïdan 99% puro; Ác. Palm.: 500 μm de ácido palmítico; Ác. Cítrico: 21 μg/mL de ácido cítrico; Em-Ac: 1000 μg/mL de extracto acuoso de *Egrecgia menziesii*; Em-Met: 1000 μg/mL de extracto metanólico de *Egrecgia menziesii*; Up-Ac: 1000 μg/mL de extracto acuoso de *Undaria pinnatifida*; Up-Met 1000 μg/mL de extracto metanólico de *Undaria pinnatifida*; Tetrahidro.: 50 μm de Tetrahidrolipstatina (Orlistat de nombre comercial).

En lo referente al ancho de las células 3T3-NIH, en la figura 26 se puede observar que hay una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.0001$ ) entre las células del grupo control ( $25.77 \pm 10.24 \mu\text{m}$ ) y las células de los demás tratamientos, a excepción del control vs. Up-Met ( $P < 0.0042$ ), ya que las células con fucoïdan tuvieron un ancho de  $11.66 \pm 3.76 \mu\text{m}$ , las tratadas con ácido palmítico midieron  $6.97 \pm 1.46 \mu\text{m}$ , las del tratamiento de ácido cítrico midieron  $7.69 \pm 2.09 \mu\text{m}$  de largo, mientras que las del extracto de Em-Ac midieron  $6.48 \pm 1.35 \mu\text{m}$ , las de Em-Met tuvieron un ancho de  $10.54 \pm 3.71 \mu\text{m}$ , las de Up-Ac  $8.87 \pm 3.24 \mu\text{m}$ , las tratadas con Up-Met  $12.92 \pm 3.85 \mu\text{m}$  y, las que recibieron el tratamiento con tetrahidrolipstatina tuvieron un ancho de

10.25±5.448  $\mu\text{m}$ . Los datos obtenidos nos muestran que existe diferencia en cuanto al ancho de las células 3T3-NIH expuestas a los diferentes tratamientos.

Tras medir el ancho de las células en cada tratamiento se realizó una comparación entre todos los grupos que presentan datos estadísticamente significativos ( $P < 0.0001$ ); tal fue el caso para fucoidan vs. ácido palmítico, ácido cítrico, y Em-Ac, ácido palmítico vs. Em-Met y Up-Met, ácido cítrico vs. Up-Met, Em-Ac vs. Em-Met y Up-Met, Up-Ac vs. Up-Met, con valor de ( $P < 0.0006$ ) tenemos Em-Ac vs. tetrahidrolipstatina, tenemos ácido cítrico vs. Em-Met ( $P < 0.0072$ ) y Up-Met vs. tetrahidrolipstatina ( $P < 0.0034$ ), con valor de ( $P < 0.0105$ ) fucoidan vs. Up-Ac, ácido palmítico vs, tetrahidrolipstatina ( $P < 0.0308$ ), y Em-Ac vs. Up-Ac ( $P < 0.0178$ ), el resto de grupos no presentó diferencias estadísticamente significativas.

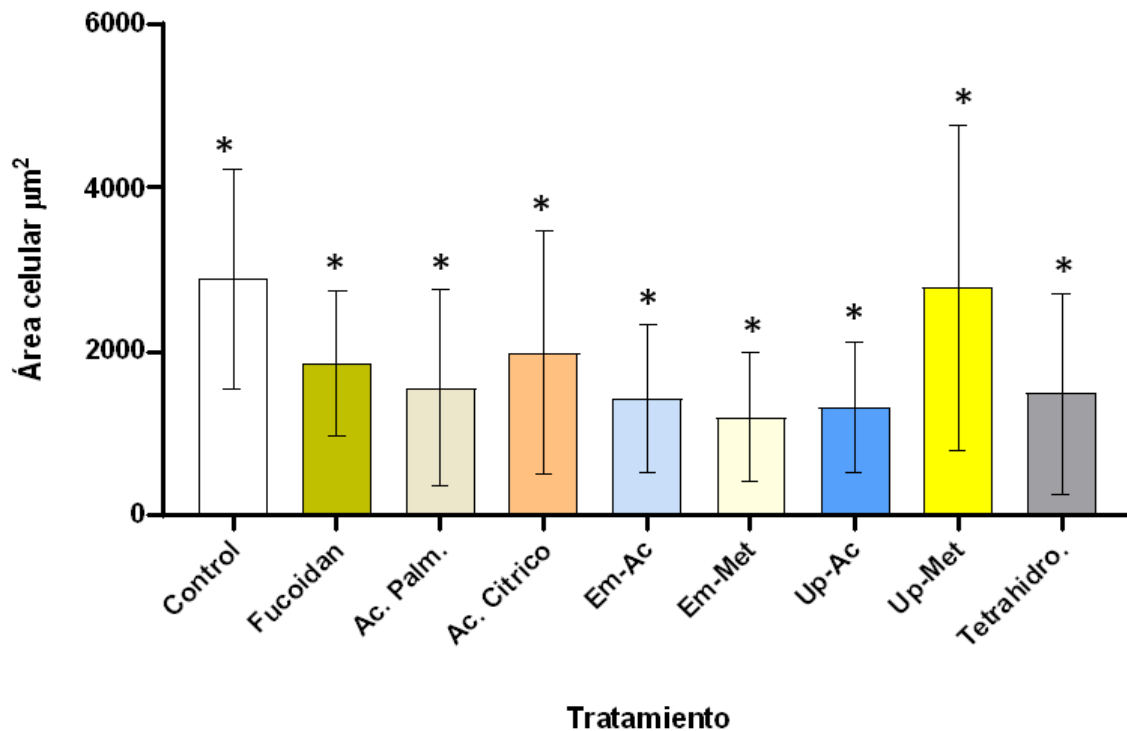


**Figura 26.** Mediciones de ancho de las células 3T3-NIH diferenciadas tratadas con distintos extractos de macroalgas y con sus respectivos grupos control. El ancho de las células en cada tratamiento, y en el grupo control, se midió con el Software Axiovision (Carl Zeiss Microscopy, Axiovision Software, White Plains, USA) y los datos se procesaron con el programa estadístico GraphPad Prism (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA). Control: células diferenciadas sin tratamiento alguno; Fucoidan: 100  $\mu\text{g/mL}$  de fucoidan 99% puro; Ác. Palm.: 500  $\mu\text{m}$  de ácido palmítico; Ác. Cítrico: 21  $\mu\text{g/mL}$  de ácido cítrico; Em-Ac: 1000  $\mu\text{g/mL}$  de extracto acuoso de *Egregia menziesii*; Em-Met: 1000  $\mu\text{g/mL}$  de extracto metanólico de *Egregia menziesii*; Up-Ac: 1000  $\mu\text{g/mL}$  de extracto acuoso de *Undaria pinnatifida*; Up-Met 1000  $\mu\text{g/mL}$  de extracto metanólico de *Undaria pinnatifida*; Tetrahidro.: 50  $\mu\text{m}$  de Tetrahidrolipstatina (Orlistat de nombre comercial). Nota: el asterisco (\*) significa que hay diferencia estadísticamente significativa del grupo señalado con el grupo control y/o con alguno de los otros grupos experimentales; para más detalles, consultar el texto dónde se describen los resultados.

Con las mediciones de área (Figura 27) para las células 3T3--NIH observamos que hay una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.0001$ ) en el área celular entre las células del grupo control ( $2889 \pm 1352 \mu\text{m}^2$ ) vs. ácido palmítico, Em-Ac, Em-Met, Up-Ac y tetrahidrolipstatina, también las células con fucoidan tuvieron un área de  $1847 \pm 879.4 \mu\text{m}^2$ , las tratadas con ácido palmítico midieron  $1555 \pm 1196 \mu\text{m}^2$ , las del tratamiento de ácido cítrico midieron  $1986 \pm 1488 \mu\text{m}^2$  de área, mientras que las del extracto de Em-Ac midieron  $1416 \pm 912.3 \mu\text{m}^2$ , las de Em-Met tuvieron un área de  $1193 \pm 789.2 \mu\text{m}^2$ , las de Up-Ac  $1309 \pm 804.6 \mu\text{m}^2$ , las tratadas con Up-Met  $2785 \pm 1994$

$\mu\text{m}^2$  y, las que recibieron el tratamiento con tetrahidrolipstatina tuvieron un área de  $1476 \pm 1237 \mu\text{m}^2$ .

El área de las células entre tratamientos también presentó diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.0001$ ); Em-Met vs. Up-Met, Up-Ac vs. Up-Met, con valor de  $P < 0.0007$ ; Em-Ac vs. Up-Met y Up-Met vs. tetrahidrolipstatina ( $P < 0.0003$ ); con  $P < 0.0039$  tenemos a fucoidan vs. Em-Met, y una  $P < 0.0021$  para ácido palmítico vs. Up-Met; con una  $P < 0.0334$  observamos diferencias entre el grupo de ácido cítrico vs. Em-Met; el resto de grupos no presentó diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 27.** Mediciones de área de las células 3T3-NIH diferenciadas tratadas con distintos extractos de macroalgas y con sus respectivos grupos control. El área de las células en cada tratamiento, y en el grupo control, se midió con el Software ImageJ (Carl Zeiss Microscopy, Axiovision Software, White Plains, USA) y los datos se procesaron con el programa estadístico GraphPad Prism (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA). Control: células diferenciadas sin tratamiento alguno; Fucoïdan: 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de fucoïdan 99% puro; Ác. Palm.: 500  $\mu\text{m}$  de ácido palmítico; Ác. Cítrico: 21  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ácido cítrico; Em-Ac: 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extracto acuoso de *Egregia menziesii*; Em-Met: 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extracto metanólico de *Egregia menziesii*; Up-Ac: 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extracto acuoso de *Undaria pinnatifida*; Up-Met 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extracto metanólico de *Undaria pinnatifida*; Tetrahidro.: 50  $\mu\text{m}$  de Tetrahidrolipstatina (Orlistat de nombre comercial).

A la fecha no hay reportes donde se mida el área del soma de las células 3T3-NIH con un tratamiento específico. Sin embargo, sabemos que el proceso de diferenciación de estas células de su forma fibroblástica a adiposa, genera cambios morfológicos en el soma de las células (Shao et al., 2013b). En algunos casos, se ha observado que ciertos compuestos resultan citotóxicos para las células 3T3-NIH, lo cual se observa con una reducción considerable del soma celular (Lamers et al., 2011). En éste y otros tipos celulares, el proceso de diferenciación mediante el cual las células precursoras multipotenciales dan origen a células adiposas maduras se conoce con el nombre de adipogénesis y ocurre por la activación de un programa coordinado de expresión génica mediado por factores de transcripción, el cual conduce a cambios en la actividad, en la cantidad, o ambos, de proteínas claves en la fisiología del adipocito como por ejemplo, las implicadas en la homeostasis de los

lípidos y la glucosa (Clavijo et al., 2007). Existen reportes con extractos de plantas donde se muestra que algunos componentes pueden interrumpir el proceso de adipogénesis, y esto dependerá de con qué compuesto se esté trabajando (Ambati et al., 2007; Harmon & Harp, 2001). Por el contrario, se han reportado protocolos que evalúan el proceso de diferenciación y a su vez se intenta conocer cómo es que ocurre dicho proceso y cuál es la cascada de señalización, esto también dependerá de cuál sea la línea fibroblástica con la que se intenta llevar a cabo el proceso de diferenciación a célula adiposa (Fauziah et al., 2021).

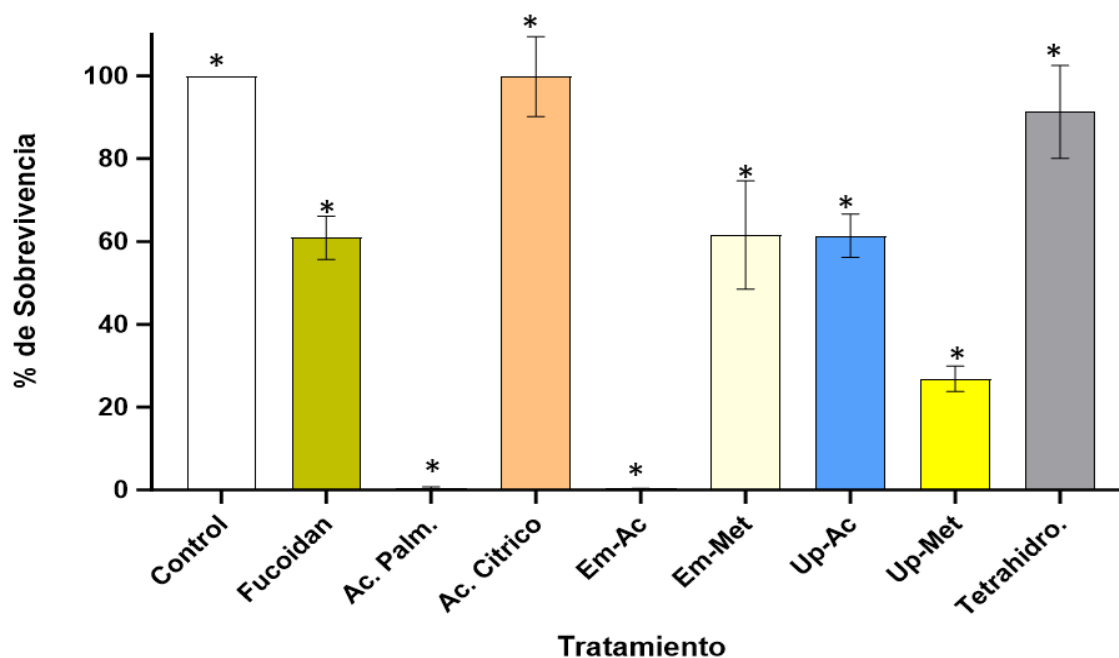
Dada la posible citotoxicidad de los compuestos a evaluar en las líneas celulares y, los cambios morfológicos cuando células como las 3T3-NIH se diferencian, resulta importante evaluar el crecimiento y cambio morfológico en el soma de cada línea celular. Como ya se mencionó anteriormente hemos realizado mediciones de largo (Figura 25), ancho (Figura 26) y área (Figura 27), con la finalidad de tener registro de los efectos que los extractos de las macroalgas *Egregia menziesii* y *Undaria pinnatifida* pudieran tener sobre la morfometría celular.

#### **7.4.2 Ensayo de MTT**

En la figura 28 se puede observar que hay una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.0001$ ) entre la viabilidad de las células del grupo control ( $100 \pm 0\%$ ) vs. ácido palmítico y Em-Ac, ya que las células con fucoidan tuvieron un porcentaje de viabilidad de  $60.91 \pm 5.221\%$ , las tratadas con ácido palmítico  $0.4582 \pm 0.2686\%$ , las del tratamiento de ácido cítrico  $99.83 \pm 9.676\%$ , mientras que las del extracto de Em-Ac  $0.331 \pm 0.0439\%$ , las de Em-Met tuvieron un porcentaje de  $61.6 \pm 13.07\%$ , las de Up-Ac  $61.39 \pm 5.233\%$ , las tratadas con Up-Met  $26.87 \pm 3.065\%$  y, las que recibieron el tratamiento con tetrahidrolipstatina tuvieron un porcentaje de viabilidad del  $91.32 \pm 11.22\%$ .

La viabilidad de las células entre tratamientos también presentó diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.0001$ ); tal fue el caso para el grupo de ácido palmítico vs. ácido cítrico, ácido cítrico vs. Em-Ac y el grupo Em-Ac vs. tetrahidrolipstatina. Además de las diferencias mencionadas en la viabilidad de las células de los tratamientos, también se observaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo de ácido palmítico vs. tetrahidrolipstatina ( $P < 0.0002$ ) y ácido cítrico vs. Up-Met ( $P < 0.0057$ ). También se observaron diferencias con valor de

$P < 0.0173$  entre Up-Met y. tetrahidrolipstatina. El resto de grupos no presentaron diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 28.** Viabilidad de las células 3T3-NIH diferenciadas tratadas con distintos extractos de macroalgas y con sus respectivos grupos control. La viabilidad de las células en cada tratamiento, y en el grupo control, se midió con el lector de placas (Carl Zeiss Microscopy, Axiovision Software, White Plains, USA) y los datos se procesaron con el programa estadístico GraphPad Prism (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA). Control: células diferenciadas sin tratamiento alguno; Fucoïdan: 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de fucoïdan 99% puro; Ác. Palm.: 500  $\mu\text{m}$  de ácido palmítico; Ác. Cítrico: 21  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ácido cítrico; Em-Ac: 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extracto acuoso de *Egrecgia menziesii*; Em-Met: 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extracto metanólico de *Egrecgia menziesii*; Up-Ac: 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extracto acuoso de *Undaria pinnatifida*; Up-Met 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extracto metanólico de *Undaria pinnatifida*; Tetrahidro.: 50  $\mu\text{m}$  de Tetrahidrolipstatina (Orlistat de nombre comercial).

Datos reportados por Gutiérrez Rodríguez, (2018) reportan la viabilidad en células 3T3-L1 de extractos metanólicos, hexánicos y cloroformicos donde observaron un mayor decremento en la actividad celular a las 48 horas de exposición, mostrando un porcentaje igual o menor al 50 % de viabilidad. Otros autores como Kang et al., (2017) han evaluado la viabilidad de las células adiposas en el proceso de diferenciación de preadipocitos a adipocitos con algunos derivados de *Sargassum thunbergii* expuestas tras 48 horas, presentaron un porcentaje muy bajo de letalidad que ronda entre el 90-100%. También existen reportes donde hacen extracciones de la esporofila de

*Undaria pinnatifida* con potencial farmacéutico en adipocitos 3T3-NIH y en ellos no hubo un efecto inhibitorio significativo sobre la viabilidad celular durante 72 horas a concentraciones igual o menores a 100  $\mu\text{g/mL}$  (Kim & Lee, 2012).

Cómo es bien sabido las macroalgas marinas representan una rica fuente de compuestos bioactivos que pueden implementarse en diversos productos alimenticios, cosméticos y farmacéuticos para mejorar la salud. Se ha demostrado que algunos de estos compuestos bioactivos son los polifenoles, polisacáridos, el fucoidan, los carotenoides y algunos ácidos grasos  $\omega$ -3 (Cikoš et al., 2018).

El fucoidan es un polisacárido compuesto principalmente de L-fucosa sulfatada y se encuentra comúnmente en las algas pardas y los algunos equinodermos marinos. Esperando obtener un extracto con una composición similar se probó a la par de los 4 extractos, un ácido graso (Ácido palmítico), un agente antioxidante (Ácido cítrico) y un medicamento que se utiliza para tratamiento en paciente obesos (Orlistat).

Decidimos evaluar el efecto que podrían tener compuestos cómo el fucoidan que fue extraído de una macroalga parda de orden laminarial al igual que las utilizadas en este proyecto, con la finalidad de tener una comparativa entre un compuesto puro, uno orgánico y acuoso. Investigaciones recientes centran su atención en compuestos bioactivos cómo polifenoles, polisacáridos, carotenoides y ácidos grasos poliinsaturados (Cikoš et al., 2018). Es por esto que nosotros empleamos el tratamiento con fucoidan puro al 99% extraído de *Fucus serratus*, una macroalga parda que está vinculada genéticamente con *Undaria pinnatifida*. También planteamos la idea de utilizar un agente antioxidante cómo el ácido cítrico y evaluar qué efectos tendría sobre esta línea celular.

Otro de los compuestos prueba fue aplicar un tratamiento con un ácido graso, hemos probado el ácido palmítico a una concentración conocida, con la cual nosotros obtuvimos los resultados esperados, ya que se reporta que el ácido palmítico puede inhibir el proceso de la adipogénesis. Otro de los compuestos que decidimos probar fue un medicamento comercial que se utilice para los pacientes con diabetes, este compuesto es la tetrahidrolipstatina que ayuda al proceso de reducción de triglicéridos. Hemos encontrado que los ácidos grasos saturados desempeñan un papel central como modelos de adipocitos obesos debido a sus características asociadas con su estructura química. En este estudio nosotros hemos optado por probar el efecto que puede tener el ácido palmítico en esta línea celular. Los ácidos

grasos saturados están ligados a la resistencia a la insulina (IR) induciendo una respuesta de estrés celular relacionada con el retículo endoplasmático, y un estado inflamatorio crónico por el patrón alterado de adipocinas en el tejido adiposo. Estudios realizados por Moreno Castellanos *et al.*, (2021) mencionan que células adiposas tratadas con ácido palmítico pueden inducir resistencia a la insulina, estrés mitocondrial y estrés del retículo en las células grasas.

Se ha probado que el medicamento Orlistat (Tetrahidrolipstatina) en varias líneas celulares sugieren que este compuesto es capaz de activar la expresión de la proteína Sirt1, la cual juega un papel crucial en el metabolismo energético, puesto que modula la expresión de la insulina y la secreción de la adiponectina; adipocitoquina que fortalece la sensibilidad a la insulina. En dicha investigación las células se tiñeron para cuantificar el contenido de triglicéridos, donde hubo una fuerte reducción en grasa observada en las células tratadas con este medicamento. Este efecto fue debido posiblemente a la activación de Sirt1 que actúa como un represor de genes que dirigen la diferenciación del adipocito y el almacenamiento de ácidos grasos. Dado que tetrahidrolipstatina tiene múltiples blancos es difícil comprender del todo en qué forma actúa sobre las Sirtuinas; una posibilidad es que estabiliza la unión de un péptido fluoróforo a la Sirtuina que es necesario para su activación. Sin embargo, el mecanismo de acción por el cual este medicamento y otros polifenoles actúan sobre Sirt1 sigue siendo desconocido (Celis *et al.*, 2008b).

Los compuestos que presentaron una sobrevivencia menor al 50% fueron los grupos de ácido palmítico, Em-Ac y Up-Met, respecto al tratamiento con ácido palmítico se esperaba un resultado similar ya que como mencionamos se ha demostrado que puede reducir significativamente el proceso de la adipogénesis, para los extractos podríamos plantear evaluar ensayos de toxicidad a diferentes concentraciones o caracterizar estos compuestos y evaluar la diferencia entre cada uno de ellos para poder identificar la causa de la disminución de sobrevivencia que se presentó.

## **8. Conclusiones y perspectivas**

- a. Los extractos de las macroalgas marinas del pacífico mexicano *Egrecia menziesii* y *Undaria pinnatifida* presentaron un porcentaje de rendimiento bajo, por lo cual sugerimos que, si este protocolo se quisiera escalar para darle alguna aplicación

diferente al de este proyecto, se recomienda hacer mejoras en el proceso de extracción y valorar el rendimiento que podrían ofrecer otros solventes

- b. Los ensayos preclínicos que se realizaron con los diferentes extractos en *Artemia salina* y eritrocitos humanos, no presentaron una letalidad significativa a concentraciones de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en la mayoría de los casos; si se quisiera determinar la dosis letal media ( $\text{DL}_{50}$ ) se recomienda realizar estos ensayos con cantidades mayores a las utilizadas en este trabajo
- c. El análisis morfométrico presentó diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos experimentales respecto al grupo control; los campos celulares observados presentaron diferencias morfológicas visibles, al igual que las mediciones de largo, ancho y el área; estos datos serán de gran utilidad para futuros trabajos ya que hasta el momento no existen reportes que se enfoquen en la morfometría por imagen con la línea celular NIH/3T3
- d. Los mayores porcentajes de viabilidad (90-100%) de las células 3T3-NIH se observaron en los grupos de ácido cítrico, tetrahidrolipstatina y control; los grupos de fucoidan, Em-Met, y Up-Ac tuvieron un porcentaje de viabilidad el entre el 50% y el 60%; el grupo de Up-Met tuvo un menor porcentaje de viabilidad (~30%); y los grupos tratados con ácido palmítico y Em-Ac presentaron una viabilidad casi nula (menor al 1%). Para entender el mecanismo celular que éstos compuestos generan en las células 3T3-NIH, es recomendable caracterizar los componentes de los diferentes extractos y, mediante ensayos farmacológicos evaluar la acumulación de lípidos y/o el estrés celular.

## 9. Anexos

### 9.1 Cambio de medio de cultivo, mantenimiento.

Materiales	
DMEM al 10-20% de SFB	En baño a 37°C por 30 minutos previosal cambiode medio
Frasco de cultivo	Sin filtro; 5 mL o 10 mL (según corresponda)

Pipetas	Frasco con línea celular previamente obtenida de incubadora de CO <sub>2</sub>
---------	--

Pasos:

1. Aspirar el medio dejando un poco del medio antiguo, dependiendo la línea celular con la que se esté trabajando se aconseja dejar el 30-50% de medio en uso. El motivo es mantener sustancias positivas para el crecimiento, si el medio está completamente nuevo, inducirá una parada o retraso en su crecimiento.
2. Aspirar medio usado
3. Incorporar DMEM al frasco
4. Dejar frasco en incubadora de CO<sub>2</sub>

## 9.2 Tripsinización

Materiales	
DMEM al 10% de SFB	En baño a 37°C por 30 minutos previos.
PBS	
Tripsina	
Pipetas	Sin filtro; 5 mL o 10 mL (según corresponda)
Frasco de cultivo celular	Frasco nuevo para pase celular
Frasco de cultivo	Frasco con línea celular mantenido en incubadora con CO <sub>2</sub>

Pasos:

1. Aspirar el medio de cultivo del frasco previamente obtenida de la incubadora con CO<sub>2</sub>
2. Lavar por 1 vez con 4 mL de PBS para contribuir a debilitar la adherencia de las células en el frasco de cultivo celular (así se elimina el suero del medio que contiene inhibidor de tripsina).
3. Incorporar al frasco de cultivo 1 o 2 mL de Tripsina según tamaño del frasco. Mover horizontalmente por 1 minuto para cubrir toda la superficie
4. Aspirar Tripsina dejando un pequeño volumen
5. Incubar frasco con línea celular más Tripsina por 5 minutos a 37°C

6. Diluir en el frasco de cultivo tripsinizadas 5 mL de DMEM
7. Pipetear por 2 veces la suspensión para acabar de levantar las células (pipetear arriba y abajo, esparciendo la suspensión por toda la superficie del frasco). Por tercera vez, pipetear hacia arriba todo el contenido y soltar desde una esquina del frasco con el fin de evitar aglomeración en un frasco para centrifugar.
8. Centrifugar medio y celular a 1000 rpm por 10 minutos
9. Una vez centrifugado, retirar lo mayor posible del tubo dejando solo el pellet formado en el fondo del tubo.
10. Agregar medio de cultivo, el volumen dependerá del tamaño de frasco con que se esté trabajando
11. Transferir volumen de frasco de cultivo tripsinizadas y centrifugado al nuevo frasco de cultivo
12. Incubar células.

### 9.3 Congelación de células

Materiales	
DMEM al 10% de SFB	En baño a 37°C por 30 minutos previos.
PBS	
Tripsina	
DMSO	Frasco
Vial (Criotubo)	Según necesidad (2-3 por frasco de cultivo)
Micropipetas	200 ul
Puntas	100 a 200 ul
Pipetas	Sin filtro; 5 mL o 10 mL (según corresponda)
Frasco de cultivo	Frasco con línea celular mantenido en incubadora con CO <sub>2</sub>
Falcon 15 mL	Según necesidad

Pasos:

1. Realizar tripsinización del cultivo celular (hasta paso de centrifugación).
2. Al pellet agregar 4.5 mL de DMEM. Resuspender 3 veces.
3. A cada vial (3 unidades) agregar 1.5 mL de suspensión celular.
4. Agregar a cada vial 75 µl de DMSO (di-metil-sulfóxido) como agente Crioprotector. El DMSO es bastante tóxico, para minimizar el tiempo que las células pasan a temperatura ambiente en presencia de DMSO se debe enfriar las células lo antes posible (4°C).
5. Etiquetar viales con línea celular, número de pase y fecha.
6. Enfriar viales en hielo a 4°C por 5 minutos.
7. Congelar viales a -20°C por 2 horas.
8. Congelar a -80°C.

#### 9.4 Descongelación de células

Pasos:

1. Sacar el criotubo con las células del medio de congelación.
2. Descongelar en la mano (hasta que queden algunos trocitos de hielo).
3. Con ayuda de la pipeta, poner las células en un tubo de 15 mL (Falcon) cónico y añadir 5 mL de medio a 37°C.
4. Centrifugar 5 minutos, 1000 rpm, 37°C.
5. Retirar sobrenadante con ayuda de la pipeta. - Añadir al pellet 3 mL de medio y resuspender con la pipeta recogiendo todo el contenido y soltar a cierta distancia del fondo para ayudar a que se retire el botón del fondo, varias veces.
6. Verter todo el contenido en el frasco de cultivo.
7. Añadir medio dependiendo el tamaño de frasco a utilizar.
8. Rotular indicando: Tipo de línea celular, fecha y noº de pase. - Estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

#### 9.5 Tinción de rojo Oleoso

Materiales
PBS
Formaldehido al 10 %
Rojo oleoso
Isopropanol al 99%
Isopropanol al 60%

Pasos:

Fijación de cultivo adipogénico:

1. Previamente se incubaron células en placas que contenían vidrios tratados con Poli-L-lisina, este tratamiento se realizó para obtener una mejor adherencia de células en los vidrios donde hicimos la fijación de células.
2. Retire las células de la incubadora y colóquelas en campana extractora. Todos los procedimientos que involucran la formalina deben realizarse en una campana extractora.
3. Primero retira el material del control y luego fuera de los pozos inducidos de la post inducción lámina. Asegúrese de no dejar que las células permanezcan secas por más de 30 segundos en cualquier punto durante el ensayo.
4. Enjuague suavemente la placa con 2 mL de solución esterilizada PBS a lo largo de los lados de cada pocillo para no perturbar la monocapa.
5. Aspirar el PBS y agregar 2 mL de 10% formalina a lo largo de los lados de cada pocillo, nuevamente teniendo cuidado de no perturbar la monocapa.
6. Incubar las placas durante 30-60 min. en la habitación temperatura.

Preparación de Rojo Oleoso:

1. Prepare la solución madre pesando 300 mg de Oil Red O en polvo y añadiendo este a 100 mL de isopropanol al 99%. Esta solución es estable durante un año a partir de la fecha en que fue hecho.
2. En la campana extractora, mezcle 3 partes de Oil Red O solución madre con 2 partes de agua desionizada y deje reposar a temperatura ambiente durante 10 min. La solución de trabajo sólo es estable durante 2 horas así que solo prepare lo que usará en ese momento.
3. Coloque un trozo de papel de filtro en un embudo y coloca el embudo en una botella filtrar la solución de trabajo Oil Red O completamente a través del embudo de filtración. Agregar la solución lentamente para que no se desborde el embudo.

Tinción de cultivos adipogénicos:

1. Retire con cuidado toda la formalina bien de cada pozo y deséchalo en un recipiente designado. Recipiente para residuos de formalina. Recuerda retirar la formalina de los pozos control primero.
2. Enjuague suavemente cada pocillo con 2 mL de agua esterilizada.
3. Retire el agua y deséchela en el recipiente para residuos de formalina.

4. Agregue 2 mL de isopropanol al 60 % a cada pocillo y déjelo reposar durante 2-5 min.
5. Aspire el isopropanol y pipetear 2 mL de la solución de trabajo Oil Red O a lo largo de cada pozo. Gire lentamente el plato para asegurar una distribución uniforme por todos los pozos y dejar reposar durante 5 min.
6. Enjuague con agua del grifo por el centro de cada plato hasta que el agua salga clara. Estar seguro de No agregar agua corriente directamente al pozo, ya que esto puede alterar la monocapa.
7. Ver las placas en contraste de fases en un microscopio, los lípidos aparecerán rojos. No debe dejar secar las placas ya que esto podría ocasionar la degradación de las células.

## 9.6 Protocolo para ensayo MTT

Numero de catalogo: 11465007001 Sigma Aldrich

1. Incube los cultivos celulares durante 24 horas a +37°C y CO<sub>2</sub> al 5-6,5 %.
2. Después del período de incubación, añada 10 µl del reactivo de marcaje MTT (concentración final 0.5 mg/mL) a cada pocillo.
3. Incube la microplaca durante 4 horas en una atmósfera humidificada (p. ej., +37 °C, CO<sub>2</sub> al 5-6,5 %).
4. Añada 100 µl de la disolución de solubilización a cada pocillo.
5. Deje la placa reposar toda la noche en la incubadora en una atmósfera humidificada (por ejemplo, +37 °C, CO<sub>2</sub> al 5-6,5 %).
6. Compruebe la solubilización completa de los cristales de formazán morados y mida la absorbancia de las muestras con un lector de microplacas. La longitud de onda para medir la absorbancia del producto formazán es de 550 a 600 nm en función de los filtros disponibles para el lector ELISA utilizado. La longitud de onda de referencia debe ser superior a 650 nm.

## 9.8 Vidrios tratados con Poli-L-lisina

1. Lavar los cubreobjetos con etanol (100%). 15 minutos.
2. Lave los cubreobjetos con H<sub>2</sub>O, tres veces.
3. Deje secar los cubreobjetos.
4. Cubra los cubreobjetos durante 5 minutos con 120 ul de solución de poli-L-lisina (PM 70.000-120.000: 0,01%, Sigma).
5. Lavar 3 veces con H<sub>2</sub>O.
6. Deje secar los cubreobjetos.

## 9.9 Tablas estadísticas largo, ancho y área de células 3T3-NIH

**Tabla 8.** Prueba de D'Agostino & Pearson y Shapiro-Wilk para datos de largo en células 3T3-NIH.

	Control	Fucoidan	Ac. Palm.	Ac. Citrico	Em-Ac	Em-Met	Up-Ac	Up-Met	Tetrahidro
Test for normal distribution									
D'Agostino & Pearson test									
K2	Invalid input	0.5391	1.045	2.123	2.601	1.749	2.37	2.502	1.338
P value		0.7637	0.5931	0.346	0.2724	0.4171	0.3058	0.2862	0.5123
Passed normality test	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Shapiro-Wilk test									
W	Invalid input	0.8666	0.9276	0.7779	0.7143	0.8152	0.7665	0.8618	0.8393
P value		0.1395	0.4943	0.0165	0.0033	0.0415	0.0124	0.1252	0.074
Passed normality test	Yes	Yes	No	No	No	No	No	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	*	**	*	*	*	ns	ns

**Tabla 9.** Prueba de D'Agostino & Pearson y Shapiro-Wilk para datos de ancho en células 3T3-NIH.

	Control	Fucoidan	Ac. Palm.	Ac. Citrico	Em-Ac	Em-Met	Up-Ac	Up-Met	Tetrahidro.
Test for normal distribution									
D'Agostino & Pearson test									
K2	14.48	24.12	17.95	11.37	4.357	12.79	5.497	3.734	20.12
P value	0.0007	<0.0001	0.0001	0.0034	0.1132	0.0017	0.064	0.1546	<0.0001
Passed normality test (alpha)	No	No	No	No	Yes	No	Yes	Yes	No
P value summary	***	****	***	**	ns	**	ns	ns	****
Shapiro-Wilk test									
W	0.8908	0.9097	0.898	0.9	0.9582	0.8693	0.9166	0.9443	0.7891
P value	0.0002	0.001	0.0004	0.0005	0.0744	<0.0001	0.0018	0.0201	<0.0001
Passed normality test (alpha)	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No
P value summary	***	**	***	***	ns	****	**	*	****
Number of values	50	50	50	50	50	50	50	50	50

**Tabla 10.** Prueba de D'Agostino & Pearson y Shapiro-Wilk para datos de área en células 3T3-NIH.

	Control	Fucoidan	Ac. Palm.	Ac. Citrico	Em-Ac	Em-Met	Up-Ac	Up-Met	Tetrahidro.
Test for normal distribution									
D'Agostino & Pearson test									
K2	6.58	4.25	28.26	24.71	11.28	9.523	5.346	9.406	42.82
P value	0.0373	0.1194	<0.0001	<0.0001	0.0036	0.0086	0.069	0.0091	<0.0001
Passed normality test	No	Yes	No	No	No	No	Yes	No	No
P value summary	*	ns	****	****	**	**	ns	**	****
Shapiro-Wilk test									
W	0.8925	0.9307	0.7466	0.7515	0.8868	0.8435	0.8919	0.7458	0.7589
P value	0.0003	0.0059	<0.0001	<0.0001	0.0002	<0.0001	0.0003	<0.0001	<0.0001
Passed normality test	No	No	No	No	No	No	No	No	No
P value summary	***	**	****	****	***	****	***	****	****
Number of values	50	50	50	50	50	50	50	50	50

**Tabla 11.** Prueba de D'Agostino & Pearson y Shapiro-Wilk para datos de ensayo MTT en células 3T3-NIH.

	Control	Fucoidan	Ac. Palm.	Ac. Citrico	Em-Ac	Em-Met	Up-Ac	Up-Met	Tetrahidro
Test for normal distribution									
D'Agostino & Pearson test									
K2	Invalid input	0.5391	1.045	2.123	2.601	1.749	2.37	2.502	1.338
P value		0.7637	0.5931	0.346	0.2724	0.4171	0.3058	0.2862	0.5123
Passed normality test	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Shapiro-Wilk test									
W	Invalid input	0.8666	0.9276	0.7779	0.7143	0.8152	0.7665	0.8618	0.8393
P value		0.1395	0.4943	0.0165	0.0033	0.0415	0.0124	0.1252	0.074
Passed normality test	Yes	Yes	No	No	No	No	No	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	*	**	*	*	ns	ns	ns

Los resultados obtenidos de la hipótesis específica en ambas pruebas siguen una distribución diferente. Debido a que tenemos 50 datos, procedemos a emplear la prueba de Shapiro Wilks.

## 9. Referencias bibliográficas

- Ahmad, N. N., Robinson, S., Kennedy-Martin, T., Poon, J. L., & Kan, H. (2021). Clinical outcomes associated with anti-obesity medications in real-world practice: A systematic literature review. *Obesity Reviews*, 22(11), e13326. <https://doi.org/10.1111/OBR.13326>
- Alfonso Valdés, Y. (2017). ALGAE, ALLIES IN THE PAST AND SUPPORT FOR THE FUTURE. *Tecnología Química*, 28. <https://doi.org/10.1590/2224-6185.2008.3.%25x>
- Almeida, B., Barroso, S., Ferreira, A. S. D., Adão, P., Mendes, S., & Gil, M. M. (2021). Seasonal Evaluation of Phlorotannin-Enriched Extracts from Brown Macroalgae *Fucus spiralis*. *Molecules*, 26(14), 4287. <https://doi.org/10.3390/molecules26144287>
- Alves, M. F., Paschoal, A. C. C., Klimeck, T. D. F., Kuligovski, C., Marcon, B. H., de Aguiar, A. M., & Murray, P. G. (2022). Biological Synthesis of Low Cytotoxicity Silver Nanoparticles (AgNPs) by the Fungus *Chaetomium thermophilum*—Sustainable Nanotechnology. *Journal of Fungi*, 8(6), 605. <https://doi.org/10.3390/jof8060605>
- Ambati, S., Kim, H.-K., Yang, J.-Y., Lin, J., Della-Fera, M. A., & Baile, C. A. (2007). Effects of leptin on apoptosis and adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical Pharmacology*, 73(3), 378–384. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.10.009>
- Anderson Vazquez, H. E. (2020). ¿Qué dieta seleccionar en el tratamiento de la obesidad? *Scielo*, 33, 41–50. [https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0798-07522020000100041&script=sci\\_abstract](https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0798-07522020000100041&script=sci_abstract)

- André, R., Pacheco, R., Bourbon, M., & Serralheiro, M. L. (2021). Brown Algae Potential as a Functional Food against Hypercholesterolemia: Review. *Foods* 2021, Vol. 10, Page 234, 10(2), 234. <https://doi.org/10.3390/FOODS10020234>
- Balladares, P. V., & D'Armas, H. (2022). Potencial nutracéutico de macroalgas marina - Ecuador. *FACSALUD-UNEMI*, 6(11), 42–52. <https://doi.org/10.29076/issn.2602-8360vol6iss11.2022pp42-52p>
- Barquera, S., & Rivera, J. A. (2020). Obesity in Mexico: rapid epidemiological transition and food industry interference in health policies. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 8(9), 746–747. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(20\)30269-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(20)30269-2)
- Batista González, A. E., Charles, M. B., Mancini-Filho li, J., Vidal, A., & Iii, N. (2009). Las algas marinas como fuentes de fitofármacos antioxidantes. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14(2), 0–0. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962009000200009&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962009000200009&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Baumann, E., Stoya, G., Völkner, A., Richter, W., Lemke, C., & Linss, W. (2000). Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. *Acta Histochemica*, 102(1), 21–35. <https://doi.org/10.1078/0065-1281-00534>
- Bautista-Rodríguez, M. L., Guadarrama Guadarrama, R., Veytia-López, M., & Gallosso Méndez, A. C. (2024). Actitudes hacia la obesidad: un estudio desde la satisfacción corporal y diferencias por sexo. *Revista de PSICOLOGÍA DE LA SALUD*, 12(1), 104–111. <https://doi.org/10.21134/pssa.v12i1.108>
- Biris-Dorhoi, E. S., Michiu, D., Pop, C. R., Rotar, A. M., Tofana, M., Pop, O. L., Socaci, S. A., & Farcas, A. C. (2020). Macroalgae—A Sustainable Source of Chemical Compounds with Biological Activities. *Nutrients* 2020, Vol. 12, Page 3085, 12(10), 3085. <https://doi.org/10.3390/NU12103085>
- Canuto, E., Júnior, F., Palmeira Costa, B., Cariry, J., Freire, P., Ohana De Sousa Melo, W., De Luna Freire Pessôa, H., Queiroga, D., Gomes, C., Melo De Brito Costa, M., Jozinete, & Pereira, V. (2019). Utilización de eritrocitos en ensayos de citotoxicidad y toxidez de extractos de plantas medicinales: análisis de su aplicación y estudio bibliométrico. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 18(4), 359–377. <https://doi.org/10.35588/blacpma.19.18.4.23>
- Castañedo, Z. A., Águila, E., Marrero, O., Meneses-Marcel, A., Sifontes, S., Seijo, M., & Santana, A. (2019). Bioensayo de toxicidad aguda en tres biomodelos utilizando compuestos de referencia. *Revista de Toxicología*, 32. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=91967023007>
- Castro Juárez, C. J., Villa Ruano, N., Ramírez García, S. A., & Mosso González, C. (2014, January). *Uso medicinal de plantas antidiabéticas en el legado etnobotánico oaxaqueño*. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962014000100012](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962014000100012)
- Cedrola, M. L., & Charola, A. E. (n.d.). *PL 3-DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE SULFATOS Y CLORUROS POR REACCIONES DE TOQUE Materiales a utilizar*.
- Celis, L. G., Rozo, C., Garay, J., Vargas, D., & Lizcano, F. (2008a). Efecto lipolítico del Resveratrol en células 3T3-L1. *Redalyc*, 165–171. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=817224020>
- Celis, L. G., Rozo, C., Garay, J., Vargas, D., & Lizcano, F. (2008b). Lipolitic effect of Resveratrol in cells 3T3-L1. *Scielo*, 24. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-55522008000200002](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-55522008000200002)

- Chakhtoura, M., Haber, R., Ghezzawi, M., Rhayem, C., Tcheroyan, R., & Mantzoros, C. S. (2023). Pharmacotherapy of obesity: an update on the available medications and drugs under investigation. *EClinicalMedicine*, 58, 101882. <https://doi.org/10.1016/J.ECLINM.2023.101882/ATTACHMENT/D28621A2-1891-4E0A-913D-EBCD11367A98/MMC1.DOCX>
- Cikoš, A.-M., Jokić, S., Šubarić, D., & Jerković, I. (2018). Overview on the Application of Modern Methods for the Extraction of Bioactive Compounds from Marine Macroalgae. *Marine Drugs*, 16(10), 348. <https://doi.org/10.3390/md16100348>
- Clavijo, M. A., Gómez Camargo, D., & Gómez Alegria, C. (2007). IN VITRO ADIPOGENESIS OF 3T3-L1 CELLS. *Dialnet*, 15, 170–176. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2474045>
- Cornish, M. L., & Garbary, D. J. (2010). Antioxidants from macroalgae: potential applications in human health and nutrition. *ALGAE*, 25(4), 155–171. <https://doi.org/10.4490/algae.2010.25.4.155>
- Correa Lozano, C. A. (2023). *Estudio químico de los compuestos con actividad citotóxica presentes en la fruta de uva caimarona (Pourouma cecropiifolia)*. [Maestría, Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/84865>
- Coutinho, W. (1999). Consenso latino-americano de obesidade. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 43(1), 21–67. <https://doi.org/10.1590/S0004-27301999000100003>
- Dar, R. A., Shahnawaz, M., Ahanger, M. A., & Majid, I. ul. (2023). Exploring the Diverse Bioactive Compounds from Medicinal Plants: A Review. *The Journal of Phytopharmacology*, 12(3), 189–195. <https://doi.org/10.31254/phyto.2023.12307>
- Dini, I., Soekamto, N. H., Firdaus, & Supratman, U. (2019). Antibacterial and cytotoxic activities assay from the extract of macroalga Halimeda cylindracea from Gulf of Boni, Indonesia. *Journal of Physics: Conference Series*, 1341(3), 032035. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1341/3/032035>
- Ecología, Biología y distribución – Wikincar*. (n.d.). Retrieved December 20, 2023, from <https://wikincar.cl/produccion-y-tecnicas-de-cultivo/>
- ESTADÍSTICAS DE DEFUNCIONES REGISTRADAS (EDR)*. (2024). chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcglcfindmkaj/[https://www.inegi.org.mx/contenidos/sala-deprensa/boletines/2024/EDR/EDR2023\\_En-Jn.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/sala-deprensa/boletines/2024/EDR/EDR2023_En-Jn.pdf)
- Farràs, A., Mitjans, M., & López, V. (2023). *Bioactive Compounds in Polypodium vulgare L. (Polypodiaceae)* (pp. 1–15). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-97415-2\\_22-1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-97415-2_22-1)
- Fauziah, R. R., Chin, R., Ogita, S., Yoshino, T., & Yamamoto, Y. (2021). Antiadipogenic Effects of Different Molecular Forms of Conjugated Linoleic Acid on 3T3-L1 Cells: Comparison between Free Fatty Acid and Phosphatidylcholine Forms. *Journal of Oleo Science*, 70(12), ess21180. <https://doi.org/10.5650/jos.ess21180>
- Fontaine, K. R., & Barofsky, I. (2001). Obesity and health-related quality of life. *Obesity Reviews*, 2(3), 173–182. <https://doi.org/10.1046/j.1467-789x.2001.00032.x>
- García-Vaquero, M., Rajauria, G., Miranda, M., Sweeney, T., Lopez-Alonso, M., & O'doherty, J. (2021). Seasonal Variation of the Proximate Composition, Mineral Content, Fatty Acid Profiles and Other Phytochemical Constituents of Selected Brown Macroalgae. *Marine Drugs*, 19(4), 204. <https://doi.org/10.3390/MD19040204/S1>
- Giaccio, P., Charou, D., Diakaki, D.-I., Chita, A., Gravanis, A., Charalampopoulos, I., Roussis, V., & Ioannou, E. (2023). Butanolides and Butenolides from a Marine-Derived *Streptomyces* sp. Exert Neuroprotective Activity through Activation of the TrkB Neurotrophin Receptor. *Marine Drugs*, 21(9), 465. <https://doi.org/10.3390/md21090465>

- Gómez-Zorita, S., González-Arceo, M., Trepiana, J., Eseberri, I., Fernández-Quintela, A., Milton-Laskibar, I., Aguirre, L., González, M., & Portillo, M. P. (2020). Anti-Obesity Effects of Macroalgae. *Nutrients* 2020, Vol. 12, Page 2378, 12(8), 2378. <https://doi.org/10.3390/NU12082378>
- González Jiménez, E., Aguilar Cordero, M. J., Padilla López, C. A., & García García, I. (2012). Obesidad monogénica humana: papel del sistema leptina-melanocortina en la regulación de la ingesta de alimentos y el peso corporal en humanos. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, 35(2), 285–293. <https://doi.org/10.4321/S1137-66272012000200010>
- González-Jiménez, E., & Río-Valle, J. S. (2012). Regulación de la ingesta alimentaria y del balance energético; factores y mecanismos implicados. *Scielo*, 27. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6099>
- Grizett Gutiérrez Rodríguez Dra Rossana Citlali Zepeda Hernández Dra Tatiana Olivares Bañuelos, A. (n.d.). *Caracterización de las propiedades anti-hiperglicémicas de los extractos derivados del alga marina Egregia menziesii*.
- Guo, J., Qi, M., Chen, H., Zhou, C., Ruan, R., Yan, X., & Cheng, P. (2022). Macroalgae-Derived Multifunctional Bioactive Substances: The Potential Applications for Food and Pharmaceuticals. *Foods* 2022, Vol. 11, Page 3455, 11(21), 3455. <https://doi.org/10.3390/FOODS11213455>
- Guo, X., & Liao, K. (2000). Analysis of gene expression profile during 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Gene*, 251(1), 45–53. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00192-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00192-X)
- Gutiérrez Cuesta, R., González García, K. L., Valdés Iglesias, O. del R., Hernández Rivera, Y., & Acosta Suárez, Y. (2016). *ALGAS MARINAS COMO FUENTE DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN BENEFICIO DE LA SALUD HUMANA: UN ARTÍCULO DE REVISIÓN*.
- Harmon, A. W., & Harp, J. B. (2001). Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 280(4), C807–C813. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.4.C807>
- Huerta, S. L., Víctor, J., Rovira, M., Tovilla, Y. M., Hugo, J., & Meléndez Aguilar, E. (2021). Revisión de la obesidad como concepto científico. *Retos: Nuevas Tendencias En Educación Física, Deporte y Recreación*, ISSN-e 1988-2041, ISSN 1579-1726, Nº. 42, 2021, Págs. 365-374, 42, 365–374. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7986365&info=resumen&idioma=SPA>
- Ibañez, E., & Herrero, M. (2017). *¿Qué sabemos de? Las algas que comemos*.
- Im, S. T., Kang, H., Kim, J., Kim, S.-R., Kim, K.-N., & Lee, S.-H. (2024). Narirutin-Rich Celluclast Extract from Mandarin (Citrus unshiu) Peel Alleviates High-Fat Diet-Induced Obesity and Promotes Energy Metabolism in C57BL/6 Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(8), 4475. <https://doi.org/10.3390/ijms25084475>
- Ismail, M. M., Alotaibi, B. S., & EL-Sheekh, M. M. (2020). Therapeutic Uses of Red Macroalgae. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 4411, 25(19), 4411. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25194411>
- Jessen, B. A., & Stevens, G. J. (2002). Expression profiling during adipocyte differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. *Gene*, 299(1–2), 95–100. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)01017-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)01017-X)
- Kadouh, H. C., & Acosta, A. (2017a). Current paradigms in the etiology of obesity. *Techniques in Gastrointestinal Endoscopy*, 19(1), 2–11. <https://doi.org/10.1016/J.TGIE.2016.12.001>

- Kadouh, H. C., & Acosta, A. (2017b). Current paradigms in the etiology of obesity. *Techniques in Gastrointestinal Endoscopy*, 19(1), 2–11. <https://doi.org/10.1016/J.TGIE.2016.12.001>
- Kammler, S., Malvis Romero, A., Burkhardt, C., Baruth, L., Antranikian, G., Liese, A., & Kaltschmitt, M. (2024). Macroalgae valorization for the production of polymers, chemicals, and energy. *Biomass and Bioenergy*, 183, 107105. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2024.107105>
- Kang, M.-C., Ding, Y., Kim, E.-A., Choi, Y. K., De Araujo, T., Heo, S.-J., & Lee, S.-H. (2017). Indole Derivatives Isolated from Brown Alga *Sargassum thunbergii* Inhibit Adipogenesis through AMPK Activation in 3T3-L1 Preadipocytes. *Marine Drugs*, 15(4), 119. <https://doi.org/10.3390/md15040119>
- Kaufer-Horwitz, M., & Pérez Hernández, J. F. (2021). La obesidad: aspectos fisiopatológicos y clínicos. *INTER DISCIPLINA*, 10(26), 147. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485705e.2022.26.80973>
- Kim, K.-J., & Lee, B.-Y. (2012). Fucoidan from the sporophyll of *Undaria pinnatifida* suppresses adipocyte differentiation by inhibition of inflammation-related cytokines in 3T3-L1 cells. *Nutrition Research*, 32(6), 439–447. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.04.003>
- Konstantin, B., Anastasia, P., Nikolay, I., & Daria, P. (2023). Seasonal variations in the chemical composition of Arctic brown macroalgae. *Algal Research*, 72, 103112. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103112>
- La obesidad en México*. (2016). <https://www.gob.mx/issste/articulos/la-obesidad-en-mexico>
- La obesidad y su impacto en los sistemas de salud*. (2019). <https://www.caeme.org.ar/la-obesidad-y-su-impacto-en-los-sistemas-de-salud/>
- Lamers, M. L., Almeida, M. E. S., Vicente-Manzanares, M., Horwitz, A. F., & Santos, M. F. (2011). High Glucose-Mediated Oxidative Stress Impairs Cell Migration. *PLoS ONE*, 6(8), e22865. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022865>
- Lean, M. E. J. (2000). Pathophysiology of obesity. *Proceedings of the Nutrition Society*, 59(3), 331–336. <https://doi.org/10.1017/S0029665100000379>
- MADSEN, L., PETERSEN, R. K., SØRENSEN, M. B., JØRGENSEN, C., HALLENBORG, P., PRIDAL, L., FLECKNER, J., AMRI, E.-Z., KRIEG, P., FURSTENBERGER, G., BERGE, R. K., & KRISTIANSEN, K. (2003). Adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipocytes is dependent on lipoxygenase activity during the initial stages of the differentiation process. *Biochemical Journal*, 375(3), 539–549. <https://doi.org/10.1042/bj20030503>
- Mexicana de Fitopatología, S., México Sepúlveda Jiménez, A., Ducoing, P., & Sosa, R. (2003). *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21, 355–363. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221317>
- Milledge, J. J., Nielsen, B. V., & Bailey, D. (2015). High-value products from macroalgae: the potential uses of the invasive brown seaweed, *Sargassum muticum*. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology 2015 15:1*, 15(1), 67–88. <https://doi.org/10.1007/S11157-015-9381-7>
- Moreno Castellanos, N. R., Angel Martin, A., & Mantilla Mora, G. (2021a). Efectos de los ácidos grasos oleico (18 : 1n-9) y palmítico (16 : 0) en el estado metabólico del adipocito. *Salud UIS*, 53(1). <https://doi.org/10.18273/saluduis.53.e:21009>
- Moreno Castellanos, N. R., Angel Martin, A., & Mantilla Mora, G. (2021b). Efectos de los ácidos grasos oleico (18 : 1n-9) y palmítico (16 : 0) en el estado metabólico del adipocito. *Salud UIS*, 53(1). <https://doi.org/10.18273/saluduis.53.e:21009>



- Quitral R., V., Morales G., C., Sepúlveda L., M., & Schwartz M., M. (2012). Propiedades nutritivas y saludables de algas marinas y su potencialidad como ingrediente funcional. *Revista Chilena de Nutrición*, 39(4), 196–202. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182012000400014>
- Rachanamol, R. S., Lipton, A. P., & Thankamani, V. (2016). *Antibacterial and Antifouling activity of the Marine Sponge Callyspongia diffusa collected from south-west coast of India - CMFRI Repository*. <http://eprints.cmfri.org.in/15025/>
- Radhakrishnan, A., Damodaran, K., Soylemezoglu, A. C., Uhler, C., & Shivashankar, G. V. (2017). Machine Learning for Nuclear Mechano-Morphometric Biomarkers in Cancer Diagnosis. *Scientific Reports*, 7(1), 17946. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17858-1>
- Restrepo Garzón, N. (2015). *Extracción, purificación y análisis del contenido de Fucoxantina en Algas Pardas del Caribe colombiano*. <https://expeditiorepositorio.utadeo.edu.co/handle/20.500.12010/1773>
- Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M. A., & Verde-Star, M. J. (2016). Metodología científica para el estudio de plantas medicinales. *Investigación En Plantas de Importancia Médica, 2016, ISBN 9788494467370, Págs. 1-40, May 2017, 1–40*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8595968&info=resumen&idioma=SPA>
- Rodríguez Piña, L. (2021). *Algas pardas macroscópicas de la Península Ibérica* [Universidad de Sevilla ]. <https://hdl.handle.net/11441/133198>
- San Román Arenas, B. (2011). *Búsqueda de extractos naturales para el tratamiento de la obesidad*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=61524&info=resumen&idioma=SPA>
- Santos-Filho, S. D. (2016). Erythrocyte Membrane and Hemolysis: Effects of Natural Products. *ResearchGate*. [http://www.researchgate.net/profile/Sebastiao-David-Santos-Filho-3/publication/309717191\\_Erythrocyte\\_Membrane\\_and\\_Hemolysis\\_Effects\\_of\\_Natural\\_Products/links/581e04b408ae12715af5cbea/Erythrocyte-Membrane-and-Hemolysis-Effects-of-Natural-Products.pdf](http://www.researchgate.net/profile/Sebastiao-David-Santos-Filho-3/publication/309717191_Erythrocyte_Membrane_and_Hemolysis_Effects_of_Natural_Products/links/581e04b408ae12715af5cbea/Erythrocyte-Membrane-and-Hemolysis-Effects-of-Natural-Products.pdf)
- Shao, H.-Y., Hsu, H.-Y., Wu, K.-S., Hee, S.-W., Chuang, L.-M., & Yeh, J.-I. (2013a). Prolonged Induction Activates Cebpa Independent Adipogenesis in NIH/3T3 Cells. *PLoS ONE*, 8(1), e51459. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051459>
- Shao, H.-Y., Hsu, H.-Y., Wu, K.-S., Hee, S.-W., Chuang, L.-M., & Yeh, J.-I. (2013b). Prolonged Induction Activates Cebpa Independent Adipogenesis in NIH/3T3 Cells. *PLoS ONE*, 8(1), e51459. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051459>
- Sharma, P., & Sharma, J. D. (2001). In vitro hemolysis of human erythrocytes — by plant extracts with antiplasmodial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 74(3), 239–243. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00370-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00370-6)
- Shunmugiah Mahendran, Subbiah Sankaralingam, Senthurpandian Muthuramalinga Sethu, Durairaj Kathiresan, Mahalingam Muthumani, Loganathan Kousalya, Selvam Palpperumal, & Balasundaram Harinathan. (2024). Evaluation of antioxidant and cytotoxicity activities of polyphenol extracted from brown seaweed *Sargassum tenerrimum* biomass. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(2), 2063–2069. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02301-x>
- Silva, A., Rodrigues, C., Garcia-Oliveira, P., Lourenço-Lopes, C., Silva, S. A., Garcia-Perez, P., Carvalho, A. P., Domingues, V. F., Barroso, M. F., Delerue-Matos, C., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2021). Screening of Bioactive Properties in Brown Algae from the Northwest Iberian Peninsula. *Foods*, 10(8), 1915. <https://doi.org/10.3390/foods10081915>

- Silva Froján, C. (n.d.). *Obesidad*. Retrieved June 25, 2024, from <https://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/enfermedades/obesidad>
- Sobrepeso y obesidad; Síntomas y diagnóstico*. (2022). <https://www.nhlbi.nih.gov/es/salud/sobrepeso-y-obesidad/sintomas>
- Spalding, H. L., Amado-Filho, G. M., Bahia, R. G., Ballantine, D. L., Fredericq, S., Leichter, J. J., Nelson, W. A., Slattery, M., & Tsuda, R. T. (2019). *Macroalgae*. 507–536. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-92735-0\\_29](https://doi.org/10.1007/978-3-319-92735-0_29)
- Sun, Z., Dai, Z., Zhang, W., Fan, S., Liu, H., Liu, R., & Zhao, T. (2018). Antiobesity, Antidiabetic, Antioxidative, and Antihyperlipidemic Activities of Bioactive Seaweed Substances. *Bioactive Seaweeds for Food Applications: Natural Ingredients for Healthy Diets*, 239–253. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813312-5.00012-1>
- Vargas Aguilar, K., Polanco Méndez, D., González Villegas, W., & Ramírez Garita, J. (2020). Obesidad en niños: un diagnóstico cada vez más frecuente. *Revista Ciencia y Salud Integrando Conocimientos*, 4(3). <https://doi.org/10.34192/cienciaysalud.v4i3.149>
- Veršić Bratinčević, M., Kovačić, R., Popović, M., Radman, S., & Generalić Mekinić, I. (2023). Comparison of Conventional and Green Extraction Techniques for the Isolation of Phenolic Antioxidants from Sea Fennel. *Processes*, 11(7), 2172. <https://doi.org/10.3390/pr11072172>
- Vilaboa Arroniz, J., Platas Rosado, D. E., & Zetina Cordoba, P. (n.d.). *Conocimiento y uso de plantas medicinales en Calpan, Puebla, México: Percepción de varios sectores sociales*.
- von Petersdorff-Campen, K., & Schmid Daners, M. (2022). Hemolysis Testing In Vitro: A Review of Challenges and Potential Improvements. *ASAIO Journal*, 68(1), 3–13. <https://doi.org/10.1097/MAT.0000000000001454>
- Wolfe, P., Murphy, J., McGinley, J., Zhu, Z., Jiang, W., Gottschall, E. B., & Thompson, H. J. (2004). Using Nuclear Morphometry to Discriminate the Tumorigenic Potential of Cells: A Comparison of Statistical Methods. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 13(6), 976–988. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.976.13.6>
- Yanovski, S. Z., & Yanovski, J. A. (2021). Progress in Pharmacotherapy for Obesity. *JAMA*, 326(2), 129–130. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2021.9486>
- Yuan, Y., Zheng, Y., Zhou, J., Geng, Y., Zou, P., Li, Y., & Zhang, C. (2019). Polyphenol-Rich Extracts from Brown Macroalgae *Lessonia trabeculate* Attenuate Hyperglycemia and Modulate Gut Microbiota in High-Fat Diet and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(45), 12472–12480. [https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.9B05118/SUPPL\\_FILE/JF9B05118\\_SI\\_001.PDF](https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.9B05118/SUPPL_FILE/JF9B05118_SI_001.PDF)
- Zebisch, K., Voigt, V., Wabitsch, M., & Brandsch, M. (2012a). Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Analytical Biochemistry*, 425(1), 88–90. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2012.03.005>
- Zebisch, K., Voigt, V., Wabitsch, M., & Brandsch, M. (2012b). Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Analytical Biochemistry*, 425(1), 88–90. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.03.005>
- Zhao, C., Yang, C., Liu, B., Lin, L., Sarker, S. D., Nahar, L., Yu, H., Cao, H., & Xiao, J. (2018). Bioactive compounds from marine macroalgae and their hypoglycemic benefits. *Trends in Food Science & Technology*, 72, 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2017.12.001>
- Zohra, M., & Fawzia, A. (2014). *Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria*.
- Zubia, M., Stiger-Pouvreau, V., Mattio, L., Payri, C. E., & Stewart, H. L. (2020). A comprehensive review of the brown macroalgal genus *Turbinaria* J.V. Lamouroux

(Fucales, Sargassaceae). *Journal of Applied Phycology*, 32(5), 2743–2760.  
<https://doi.org/10.1007/s10811-020-02188-z>