



Universidad Veracruzana



Doctorado en
CIENCIAS
BIOMÉDICAS
UNIVERSIDAD VERACRUZANA

Caracterización de las propiedades anti-hiperglicemiante de los extractos derivados del alga marina *Egrecia menziesii*

Presenta:

Anllely Grizett Gutiérrez Rodríguez

Dra. Rossana Citlali Zepeda Hernández

Directora de tesis

Dra. Tatiana Olivares Bañuelos

Codirectora de tesis

Este proyecto se realizó en:
Centro de Investigaciones Biomédicas, en los institutos de Ciencias Básicas y Salud Pública de la Universidad Veracruzana, Instituto de Investigaciones Oceanológicas Universidad Autónoma de Baja California y el en laboratorio de Neurotoxicología del Departamento de Toxicología del Cinvestav.



ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	3
3. Antecedentes.....	4
4. Justificación.....	29
5. Planteamiento del problema.....	29
6. Hipótesis.....	30
7. Objetivo general.....	30
8. Objetivos particulares.....	30
9. Metodología.....	34
10.Resultados.....	39
11.Discusión	56
12.Conclusión.....	63
13.Referencias.....	64

CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTI-HIPERGLICÉMICO DE EXTRACTOS DERIVADOS DEL ALGA MARINA *EGREGIA MENZIESII*

1. RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es una de las enfermedades no transmisibles con mayor incidencia a nivel mundial. México ocupa el primer lugar con el mayor número de muertes por diabetes en América Latina. Tan sólo en 2015 la cifra de decesos alcanzó las 98 mil muertes como consecuencia de algún padecimiento derivado de esta enfermedad.

El tratamiento utilizado en la DM tiene como objetivo generar una concentración de glucosa sanguínea lo más cercano a la homeostasis celular. Para esto entran en juego diversos factores como la inyección de insulina, la dieta, tratamientos orales y, la actividad física.

El tratamiento oral, que es el más utilizado en la DM es poco eficaz, además de tener implicados diversos efectos secundarios entre los que destaca la hipoglucemia. Debido a lo anterior es necesaria la búsqueda de compuestos, que junto con los tratamientos actuales, puedan brindar un tratamiento eficaz y una mejor calidad de vida al paciente diabético.

La algas marinas son organismos de naturaleza vegetal, que se han empleado desde las primeras civilizaciones como fuente alimenticia y, posteriormente se utilizaron con fines medicinales. Actualmente, a las algas marinas se les ha atribuido una amplia gama de bioactividades entre las que destacan la actividad anti-hiperglicemiante.

En el presente proyecto proponemos la evaluación de la actividad anti-hiperglicemiante de los extractos orgánicos del alga marina mexicana *E. Menziesii*; debido a que pertenece a la familia *Lessoniaceae* y puede tener un comportamiento similar al reportado en las algas de dicha familia.

Considerando lo anterior se propone la siguiente metodología: i) coleccionar e identificar el alga *E. Menziesii* en las costas de Ensenada, Baja California México; ii) obtener de los extractos clorofórmicos, hexánico y metanólico por maceración; iii) evaluar la toxicidad *in vivo* en un modelo de *Artemia salina* e *in vitro* en linfocitos humanos con un colorante de exclusión vital y en la línea celular 3T3-L1 mediante MTT; iv) evaluar la actividad anti-hiperglicemiante en un modelo de ratón hiperglicémico; y v) evaluar el mecanismo por el cual se obtiene dicho

efecto, para lo cual evaluamos la captura de glucosa intracelular, la concentración de polifenoles mediante el método de Folin-Ciocalteu y la evaluación de la capacidad atrapadora del radical DPPH. Tras llevar a cabo esta metodología, los resultados obtenidos indicaron que 1) el extracto metanólico es no tóxico *in vivo* e *in vitro*, mientras que los extractos hexánico y clorofórmico sí son moderadamente tóxicos; 2) la administración del extracto metanólico disminuyó los niveles de glucosa periférica en ratones diabéticos, 3) el extracto metanólico incrementó la captura de glucosa en un 800% en células HepG2; siendo más eficaz que la insulina, y este efecto se observó a los 5 min de incubación (posiblemente el extracto metanólico del alga *E. menziesii* actúa promoviendo la translocación de los transportadores GLUT4 mediante la activando AKT), 4) el extracto metanólico tiene un 3.16% de polifenoles (compuestos que se han reportado como responsables de la bioactividad) y presenta una actividad atrapadora de radicales libres *in vitro*. Con lo anterior concluimos que el extracto metanólico de *E. Menziesii* presenta actividad anti-hiperglicémica.

2. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónico-degenerativa que representa uno de los principales problemas de salud pública en el mundo. Esta enfermedad se caracteriza por el incremento en la concentración de glucosa periférica y resistencia al efecto de la insulina. La DM es de etiología múltiple y se ha asociado a obesidad, falta de actividad física, resistencia a la insulina, mutaciones genéticas, estrés oxidante, factores ambientales, entre otras [1]. Las consecuencias crónicas de la DM se clasifican en micro y macrovasculares, las cuales afectan diferentes sistemas, en especial el cardiovascular y el renal [2]. El estrés oxidante además de participar etiología de la DM también es determinante en las consecuencias crónicas de la misma [3].

El tratamiento de DM consiste en el empleo de fármacos que permiten mantener los niveles de glucosa dentro de los parámetros normales, sin embargo presentan una serie de limitaciones con respecto a la eficacia biológica y los efectos adversos [4], por lo que es necesaria la búsqueda de tratamientos complementarios para esta patología. En este contexto se ha despertado un gran interés en la búsqueda de compuestos bioactivos de origen natural. Las algas marinas son usadas desde la antigüedad por su alta composición nutrimental y el gran número de compuestos bioactivos que las conforman [5]. Entre éstas algas se encuentra la familia *Lessoniaceae*, formada por un grupo de especies de gran interés nutricional y económico. En esta familia se encuentra el alga del pacífico *Egregia menziesii*, la cual ha sido poco estudiada hasta ahora.

Egregia menziesii pertenece a familia *Lessoniaceae*, es un alga parda que se encuentra en las costas del Pacífico desde Baja California, México hasta Canadá y de la cual no existe reporte de actividad anti-hiperglicémica. Sin embargo, de otras especies que pertenecen a esta familia se han descrito sus propiedades hipoglucemiantes, los compuestos que realizan dichas actividades y el mecanismo de acción por el cual actúan [6,7].

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es determinar el efecto anti-hiperglucémico de los extractos de *Egregia menziesii*, ya que de tener propiedades similares a las reportadas para otras especies de su familia, ésta podría actuar en coadministración con los tratamientos convencionales para la diabetes.

3. ANTECEDENTES

3.1 DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus (DM), comúnmente llamada diabetes, es una condición crónica que consiste en elevados niveles de glucosa sanguínea (hiperglicemia) debido a la ausencia de insulina o la incapacidad de las células para responder a la misma, de tal manera que la hiperglicemia es el sello distintivo de la DM [8].

La categorización de la DM ha sido una tarea compleja, sin embargo actualmente es aceptada la clasificación en tres tipos principales de diabetes: DM Tipo 1, DM Tipo 2 y DM gestacional. También se han definido la diabetes monogénica y secundaria pero son menos comunes. La diabetes monogénica es el resultado de una única mutación genética en un gen autosómico dominante, en lugar de las contribuciones de múltiples genes y factores ambientales como se ve en la DM Tipo 1 y 2 [9]. La DM neonatal, la DM MODY (por las siglas en inglés de “Maturity Onset Diabetes of the Young”) o diabetes de la edad madura que se presenta en el joven, son ejemplos de la diabetes monogénica; éstas solo representan alrededor del 1-5% de todos los casos DM [8]. La DM secundaria surge como una complicación de otras enfermedades como trastornos hormonales, enfermedades del páncreas o como resultado del abuso de algunas drogas [9].

3.1.1 DIABETES MELLITUS TIPO 1

La DM Tipo 1 es causada por una reacción autoinmune en donde el sistema inmunológico destruye las células beta productoras de insulina en los islotes del páncreas; como resultado se obtiene una deficiencia relativa o absoluta de insulina. Las causas de este proceso autoinmune no están completamente descritas, pero se sabe que están implicados factores ambientales tales como infecciones virales, toxinas, factores dietéticos y susceptibilidad genética [2].

La DM Tipo1 puede desarrollarse a cualquier la edad, pero ocurre con mayor frecuencia en niños y adolescentes. Las personas con DM Tipo 1 necesitan una administración diaria de insulina para mantener el nivel de glucosa dentro del rango apropiado y sin insulina no podría sobrevivir [1]. Este tipo de DM es diagnosticada por una elevación en el nivel de glucosa en sangre, en presencia de los síntomas enumerados en la figura 1. La incidencia de la DM Tipo 1 está aumentando en todo el mundo, pero hay una gran variación en

regiones del mundo que tienen mayor incidencia que otros. Las razones para esto no están del todo descritas, pero se sospecha de una interacción entre factores genéticos y ambientales [8].



Figura 1. Síntomas de la diabetes mellitus tipo 1 [8].

3.1.2 DIABETES MELLITUS TIPO 2

La DM Tipo 2 representa alrededor del 90% de todos los casos de diabetes, en este caso la hiperglucemia es el resultado de una producción inadecuada de insulina y la incapacidad de las células para responder a esta hormona, lo cual se define como resistencia a la insulina [8]. Es común en adultos mayores, pero cada vez se reportan más casos en niños, adolescentes y jóvenes adultos, debido a los crecientes niveles de obesidad, inactividad física y mala alimentación [10]. Los síntomas de la DM Tipo 2 pueden ser idénticos a los de la DM Tipo 1 (figura 1) en particular el aumento de sed, micción frecuente, cansancio, cicatrización lenta, infecciones recurrentes y hormigueo o entumecimiento en las manos y pies (figura 2) [8].

El desarrollo de la DM Tipo 2 suele ser lento y como resultado más de un tercio de los casos permanecen sin síntomas durante varios años. Algunos de los pacientes con DM Tipo 2 son diagnosticados por primera vez cuando se presentan con alguna complicación debido a la hiperglucemia, dificultando su tratamiento [11]. Entre las causas de la diabetes tipo 2 se encuentran: obesidad, mala alimentación y nutrición, inactividad física, tabaquismo, etnia e historial familiar [8].

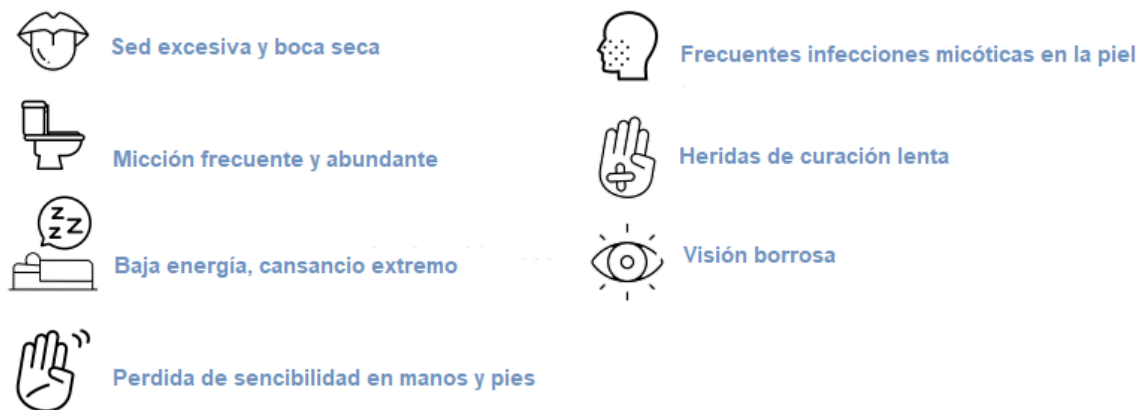


Figura 2. Síntomas de la diabetes mellitus tipo 2 [8].

3.1.3 COMPLICACIONES DE LA DIABETES MELLITUS

Las complicaciones de la DM se deben a la deficiencia en el control glicémico, los niveles de glucosa persistentemente altos causan lesiones vasculares generalizadas que afectan al corazón, vista, riñones y nervios. La DM es una de las principales causas de enfermedad cardiovascular, ceguera, insuficiencia renal y amputación de miembros inferiores. Durante el embarazo la DM mal controlada aumenta el riesgo de complicaciones maternas y fetales [3]. Las complicaciones diabéticas se pueden dividir en agudas y crónicas. Las complicaciones agudas incluyen hipoglucemia, cetoacidosis diabética, estado hiperosmolar hiperglucémico, coma diabético hiperglucémico, convulsiones, pérdida de conciencia e infecciones [8].

Las complicaciones crónicas se clasifican en microvasculares y macrovasculares. La nefropatía, neuropatía y retinopatía se encuentran dentro de las microvasculares, mientras que la enfermedad coronaria que conduce a infarto de miocardio, la enfermedad arterial periférica que contribuye al accidente cerebrovascular, la encefalopatía diabética y el pie diabético dentro de las macrovasculares [3].

La retinopatía diabética es una causa importante de ceguera y discapacidad visual. Está causada por el daño de los vasos sanguíneos de la capa posterior del ojo, la retina, lo que ocasiona una pérdida progresiva de la vista, el tratamiento consiste en un buen control metabólico ya que puede retrasar el inicio y la evolución de la enfermedad. Así mismo, la

detección temprana y el tratamiento oportuno de la retinopatía pueden prevenir o retrasar la ceguera, mediante exámenes oculares periódicos e intervenciones oportunas [3].

La nefropatía diabética está causada por las lesiones de los vasos sanguíneos pequeños de los riñones, lo que puede causar insuficiencia renal y al final la muerte. En los países desarrollados, esta es una causa importante para efectuar procedimientos de diálisis e incluso trasplantes renales. Si se diagnostica en una etapa temprana, hay varias medidas que pueden retrasar la aparición de la insuficiencia renal, entre ellas el control de la hiperglucemia y de la hipertensión arterial, la administración de medicamentos en la etapa temprana del daño renal y la restricción de las proteínas en la alimentación [11].

La DM puede lesionar los nervios por distintos mecanismos, como el daño directo por la hiperglucemia y la disminución del flujo sanguíneo que llega a los nervios como resultado del daño de los pequeños vasos. La lesión de los nervios puede manifestarse por pérdida sensorial, lesiones de los miembros e impotencia sexual. La neuropatía es la complicación más común de la DM. Si se detectan a tiempo y se mantiene el control de la glucemia, estas complicaciones pueden evitarse o retrasarse [9].

La afección del pie diabético, causada por alteraciones de los vasos sanguíneos y los nervios, a menudo se complica con úlceras que obligan a amputar la extremidad. Es una de las complicaciones más costosas de la diabetes, y se presenta principalmente en los grupos humanos vulnerables por no usar calzado apropiado. Esta afección es consecuencia de trastornos vasculares y nerviosos. El examen y los cuidados frecuentes de los pies pueden ayudar a evitar la amputación. Los programas de cuidado integral de los pies llegan a reducir las amputaciones de un 45% a un 85% [11].

La hiperglucemia daña también los vasos sanguíneos mediante el proceso conocido como aterosclerosis o endurecimiento y obstrucción de las arterias. Este estrechamiento de las arterias puede reducir el flujo de sangre al músculo cardíaco (generando un infarto del miocardio), del encéfalo (propiciando un accidente cerebrovascular), o de los miembros (ocasionando dolor y una curación tórpida de las heridas infectadas). El control de estos factores de riesgo, así como de la glucemia, puede prevenir o retrasar las complicaciones cardiovasculares [11,12].

La DM también se ha asociado a un aumento de los índices de cáncer, discapacidad física y cognitiva, tuberculosis y depresión [13]. Según la gaceta de la Federación Internacional de Diabetes 2017 la mayoría de los pacientes con DM no es consciente de tener

complicaciones diabéticas, lo que resulta en hospitalizaciones frecuentes y muerte prematura, aumentando los costes de la atención sanitaria y disminuyendo la calidad de vida de los pacientes y sus familias [8].

3.2 DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) los criterios de diagnóstico de la DM se basan en los datos obtenidos en los siguientes análisis clínicos: prueba de hemoglobina glicosilada (A1C), glucosa plasmática en ayuno (GPA) y prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG), de acuerdo a lo que se indica en la Tabla 1 [12].

Prueba de hemoglobina glicosilada (A1C)

La A1C o HbA1c cuantifica el porcentaje de glucosa unido a hemoglobina. En condiciones de salud el organismo toma la glucosa de manera eficiente al interior de las células, por lo que suele haber entre 4-6% de glucosa unida a la hemoglobina. En el caso de un diabético estos niveles pueden llegar hasta el 10% y, debido a que los eritrocitos tienen una vida de 90 días, el resultado de la prueba A1C representa un promedio del nivel de glucosa en sangre durante un período de tres meses. Además, la prueba tiene una alta estabilidad analítica, no se requiere ayuno para la evaluación y, durante la enfermedad no se altera el ritmo cotidiano de los pacientes [1,10,12].

Glucosa plasmática en ayunas (GPA)

La glucosa plasmática en ayunas es una prueba que cuantifica la concentración de glucosa en la sangre en un momento concreto. Para conseguir resultados fiables, lo mejor es hacer el examen por la mañana, después de un ayuno de por lo menos 8 horas; en ausencia de DM los valores deben ser menores a 99mg/dL [10].

Prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG)

La PTOG consiste en administrar 75g de glucosa por vía oral y cuantificar el aumento de glicemia cada 30min durante las 2h posteriores; si la concentración de glucosa posterior a las 2h es inferior a 139mg/dL se considera no diabético; valores entre 140-200mg/dL se considera intolerancia oral a la glucosa [10,12].

Prueba de glucosa plasmática aleatoria (GPa)

Un análisis de glucosa en plasma aleatorio significa que se cuantifica la concentración de glucosa en cualquier momento, es decir en ayuno o postprandial y durante todo el día. Una concentración de glucosa en plasma igual o mayor que 200mg/dL indica un posible diagnóstico de DM. Para confirmar los resultados es necesario hacer otro análisis aleatorio, o realizarse un análisis de glucosa en plasma en ayunas o bien, una prueba de tolerancia oral a la glucosa [10].

La alteración de la tolerancia a la glucosa (ATG) consiste en un nivel de glucemia por encima del intervalo normal, pero que no llegue a alcanzar los umbrales de diagnóstico de diabetes (140 a 199 mg/dL) tras dos horas de una PTOG (tabla 1); mientras que la alteración de la glucosa en ayunas (AGA) se presenta cuando la concentración de glucosa en ayuno esta entre 110 y 125 mg/dL (tabla 1). A estas afecciones también se le denomina hiperglucemia intermedia o prediabetes [8] (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios de diagnóstico de la diabetes [2].

Se debe diagnosticar la DIABETES cuando se cumplan UNO O MÁS de los siguientes criterios	Se debe diagnosticar la ALTERACIÓN DE LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA (ATG) cuando se cumplan AMBOS siguientes criterios:	Se debe diagnosticar ALTERACIÓN DE LA GLUCEMIA EN AYUNAS (AGA) cuando se cumplan AMBOS siguientes criterios:
Glucosa en plasma en ayunas \geq 7,0 mmol/L (126 mg/dl)	La glucosa en plasma en ayunas $<$ 7,0 mmol/L (126 mg/dl)	La glucosa en plasma en ayunas 6,1-6,9 mmol/L (110 to 125 mg/ dL)
o	y	y
Glucosa en plasma tras dos horas de haber ingerido por vía oral una carga de glucosa de 75g	La glucosa en plasma tras dos horas de haber ingerido por vía oral una carga de glucosa de 75g 7,8-11,1 mmol/L (140-200 mg/dl)	La glucosa en plasma tras dos horas de haber ingerido por vía oral una carga de glucosa de 75g $<$ 7,8mmol/L (140 mg/dL)
o		
El nivel de glucosa al azar $>$ 11,1 mmol/L (200 mg/ dL) o la HbA1c \geq 48 mmol/mol (equivalente a 6,5%)		

3.3 EPIDEMIOLOGÍA

La diabetes es un problema mundial, ya que se encuentra entre las 10 principales causas de muerte y representa más del 80% de todas las muertes prematuras [8]. Se calcula que alrededor de 451 millones de personas entre 18-99 años, en todo el mundo, tienen DM. Si estas tendencias continúan para el año 2045, 629 millones de personas tendrán DM (Figura 3). Además, la DM progresa con complicaciones en riñón, piel, ojos, nervios y corazón, lo que pueden traer otros problemas de salud que a mediano y largo plazo hacen que los pacientes tengan algún grado de discapacidad. Esto reduce la vida productiva de los pacientes, afecta la calidad de vida de los familiares cercanos y trae como consecuencia una saturación de los sistemas nacionales de salud. Todos estos factores han propiciado que se clasifique a la DM como un problema biopsicosocial multidimensional.

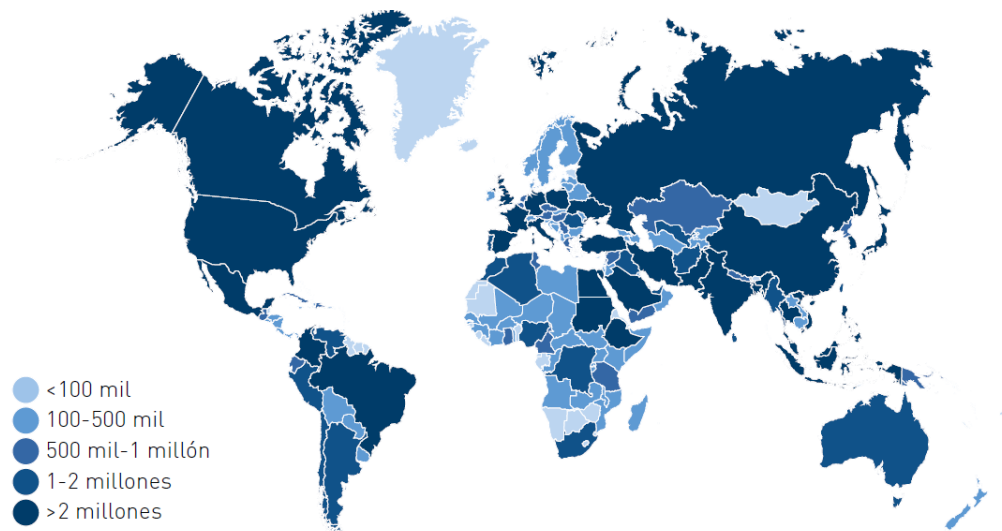


Figura 3. Numero de adultos que viven con diabetes mellitus 2017 [8].

Desde el año 2000 la DM en México es la primera causa de muerte entre las mujeres y la segunda entre los hombres (Federación Mexicana de Diabetes <http://fmd.org>). El Instituto Nacional de Salud Pública indica que 14% de los adultos en México tiene diabetes y, que las muertes podrían sumar 80 mil al año. Según la encuesta Nacional de Salud y Nutrición

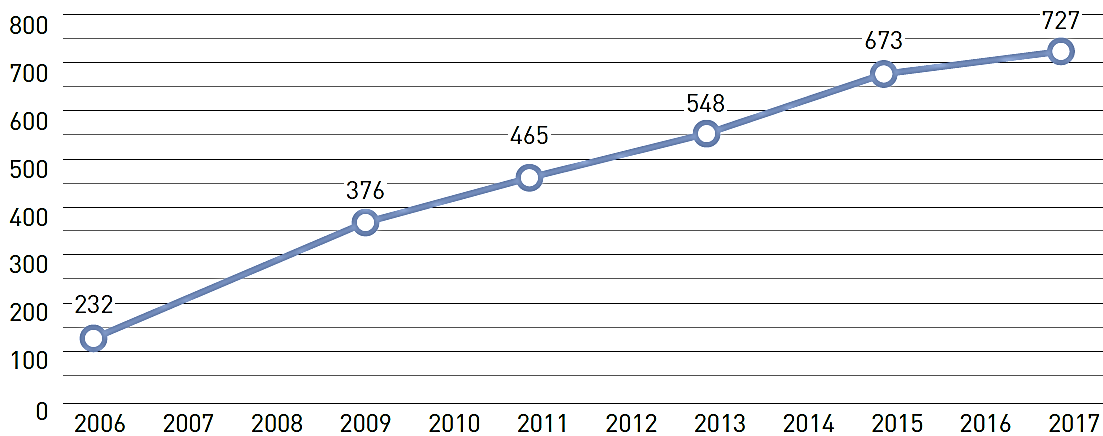
de Medio Camino 2016, la prevalencia de diabetes en México es muy baja, alcanzando solo niveles de un 9.4%.

Además, de acuerdo a la Federación Mexicana de Diabetes (<http://fmd.org>) la diabetes en México es:

- La primera causa de ceguera prevenible en el adulto en edad productiva
- La primera causa de insuficiencia renal terminal
- La primera causa de amputaciones no traumáticas
- La principal causa de infartos al miocardio

Se calcula que a nivel mundial de 3.2 a 5.0 millones de personas entre 20 y 79 años murieron de DM en 2017, lo que equivale a un fallecimiento cada ocho segundos. Esta cifra supera la suma de fallecimientos por las principales enfermedades infecciosas (VIH/SIDA, tuberculosis y malaria) [8]. La muerte prematura y la discapacidad por DM también van asociadas a un impacto económico negativo para los países, los sistemas sanitarios y sobre todo, para las personas con DM y sus familias [8].

El total de gastos por DM reportado en el 2017 es de 727 millones de USD, lo cual representa un aumento del 8% en comparación con los datos del 2015 y se espera que la carga económica por DM continúe creciendo (Figura 4), ya que se pronostica un incremento de 7% para el año 2045 [8].



*Miles de millones USD

Figura 4. Gasto sanitario total en personas con diabetes mellitus [8].

3.4 ETIOLOGÍA DE LA DIABETES

3.4.1 METABOLISMO DE LA GLUCOSA

La energía necesaria para el funcionamiento de un organismo heterótrofo proviene de su fuente de alimentación, principalmente de los componentes de los alimentos: proteínas, lípidos y carbohidratos.

Los carbohidratos son sustancias orgánicas con amplia distribución en la naturaleza, que contienen carbono, hidrógeno y oxígeno en las proporciones 6:12:6. Los carbohidratos se pueden dividir en tres grupos [14]:

- 1) Monosacáridos o azúcares simples, que pueden pasar a través de la pared del tracto alimentario sin ser modificados por las enzimas digestivas. Los tres más comunes son glucosa, fructosa y galactosa.
- 2) Disacáridos, que están compuestos de azúcares simples, necesitan ser degradados a monosacáridos antes que se puedan absorber en el tracto alimentario. Ejemplos de disacáridos son la sacarosa, la lactosa y la maltosa.
- 3) Polisacáridos, que son químicamente los carbohidratos más complejos, están formados por largas cadenas de monosacáridos. Tienden a ser insolubles en agua y los seres humanos sólo pueden utilizar algunos de ellos para producir energía. Ejemplos de polisacáridos son el almidón, el glucógeno y la celulosa.

Tras el proceso digestivo, la glucosa entra a las células de nuestro cuerpo mediante una familia de transportadores, de los cuales las distintas isoformas difieren en su localización tisular, sus características cinéticas y su dependencia o no de insulina. Por lo tanto, la absorción de glucosa se regula en función de la expresión y localización de los diferentes transportadores en distintas células y en diferentes estados metabólicos [15].

Una vez que la glucosa entra a las células comienza su metabolismo, el cual involucra un conjunto de reacciones enzimáticas, ligadas una de la otra y reguladas por un estricto control metabólico, todo con el único fin de hacer disponible para célula la energía química contenida en la glucosa [14].

La reacción global de la oxidación de glucosa es: $\text{Glucosa} \longrightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP}$

3.4.2 TRANSPORTADORES DE GLUCOSA

Los transportadores de glucosa presentes en las células se clasifican en dos grandes familias, la familia de los transportadores de difusión facilitada para hexosas (GLUT) y la familia de los co-transportadores de sodio y glucosa (SGLT) [15].

De los transportadores SGLT se conocen seis isoformas (SGLT1 a SGLT6); todos ellos aprovechan el transporte del sodio a favor de su gradiente de concentración para generar una corriente electroquímica que produce los cambios conformacionales necesarios para la translocación de la glucosa a través de la membrana plasmática [15]. El SGLT-1 se expresa a nivel del íleon, es específico para la absorción de glucosa y galactosa en las células epiteliales del ribete en cepillo. El SGLT-2 se encuentra en riñón y su función principal es la reabsorción de sodio, glucosa y agua. El SGLT-3 se ha detectado en músculo esquelético, sistema nervioso central y en neuronas, tiene baja afinidad por la glucosa así como una baja capacidad de transporte de la misma. El SGLT-4 se encuentra en el epitelio intestinal y en el epitelio tubular renal, transporta casi todos los monosacáridos presentes en la dieta. El SGLT-5 se encuentra fundamentalmente en el intestino delgado y riñón, no se conoce los sustratos que transporta. El SGLT-6 tiene una gran homología funcional con el SGLT-1.

Se han identificado nueve transportadores GLUT, los cuales se han enumerado del uno al cinco y del ocho al once. El GLUT1 es un transportador constitutivo de la glucosa que se expresa en tejidos como cerebro, eritrocitos y células endoteliales. El GLUT2 (con baja afinidad por la glucosa) es el sensor en las células beta del páncreas, también se expresa en el riñón, en el epitelio del intestino delgado y en el hígado. El GLUT3 es un transportador de alta afinidad por la glucosa se expresa en neuronas y placenta. El GLUT5 transportador de fructosa se expresa en intestino delgado, riñón, cerebro, tejido muscular y adiposo. El GLUT8 transporta glucosa y regulado hormonalmente a nivel testicular en el adulto [16].

El GLUT4 es el transportador principal de la incorporación de la glucosa al interior del tejido muscular adiposo ($K_m = 5\text{mM}$); es una proteína con 12 dominios transmembranales. En ausencia de insulina, alrededor de 90% del GLUT4 se encuentra secuestrado intracelularmente en vesículas que son llevadas hacia la membrana plasmática por la activación previa del complejo proteico PI3-quinasa, las proteínas PKB/Akt, la PKC y la quinasa de JNK. Una segunda vía de activación de la translocación de GLUT4 se lleva a cabo mediante la activación de AMPK por el incremento de la relación AMP/ATP y por

alosterismo positivo por el AMP. Estos comportamientos representan un mecanismo muy fino de regulación del metabolismo de glucosa, que solo permite la entrada de glucosa al tejido muscular cuando es lo suficientemente elevada como para estimular la secreción de insulina [15].

3.4.3 REGULACIÓN HORMONAL DE LA GLUCOSA

El control y la regulación de la glucosa en el organismo depende sustancialmente de la interacción entre las hormonas pancreáticas glucagón e insulina secretadas por las células α y β , respectivamente. Sus acciones son antagónicas a nivel del metabolismo energético y son claves para mantener un equilibrio de oferta y demanda de la glucosa. El glucagón aumenta los niveles sanguíneos de glucosa y la insulina los disminuye al participar en el ingreso de esta molécula al interior de las células (figura 5) [17].

La insulina tiene como tejidos efectores principales al músculo estriado, el hígado y el tejido graso, ejerciendo acciones anabolizantes de almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno o utilización de la misma en la fosforilación oxidativa. El glucagón, por el contrario, actúa activando principalmente la glucogenólisis y la gluconeogénesis junto con el cortisol. Una alteración en la producción de estas dos hormonas (exceso de glucagón y déficit de insulina) puede generar diabetes mellitus (figura 5) [8,14].

Como se mencionó anteriormente, la DM Tipo 1 es desencadenada por la destrucción progresiva de las células beta de los Islotes de Langerhans del páncreas debido a un proceso autoinmune. Este fenómeno disminuye hasta 90% la función de las células productoras de insulina. La predisposición genética está relacionada en mayor o menor medida con los antígenos leucocitarios humanos (ALH), ya que si un sujeto portador de estos tipos de antígenos se expone a infecciones virales, se producirá en su organismo la destrucción de las células beta pancreáticas, bien de forma directa, o bien mediante un proceso de autoinmunidad [18].

En el caso de la DM Tipo 2 existe una producción de insulina que no satisface las necesidades del organismo, porque la producción es escasa y resulta insuficiente, o bien por la imposibilidad de ser aprovechada por las células. La producción de insulina endógena es la característica que diferencia a los tipos 1 y 2 [2,19]. En los pacientes con DM Tipo 2 se han reportado una mayor incidencia de mutaciones genéticas que conducen a la resistencia insulínica, que aumenta considerablemente por la obesidad.

También se ven implicados el envejecimiento de la población, los antecedentes familiares, la diabetes gestacional, el sedentarismo, la raza, dietas desequilibradas, el grupo étnico y el estrés oxidante entre otros. Debido a esto, la DM Tipo 2 se considera de etiología multifactorial, en donde el conjunto de todas o de algunas desencadena la patología [2].

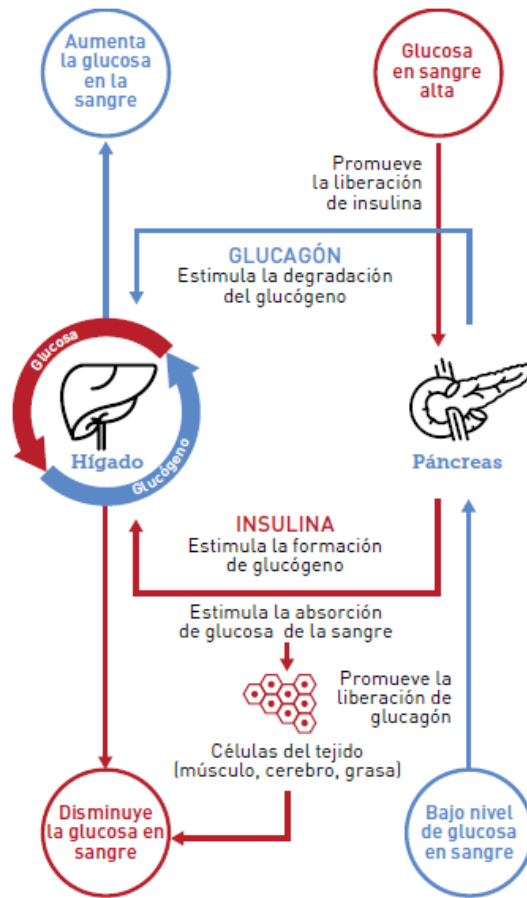


Figura 5. Acción de la insulina y glucagón en el metabolismo energético [8].

3.4.1 INSULINA

La insulina es una hormona polipeptídica, que se sintetiza como una sola cadena polipeptídica (la preproinsulina) en el retículo endoplásmico rugoso de las células beta de los islotes pancreáticos. Esta proteína se encierra en microvesículas en las cisternas del retículo endoplásmico, donde sufre modificaciones en su estructura, resultando con el plegamiento de la cadena y la formación de puentes disulfuro. Se forma así la molécula de proinsulina que se transporta al aparato de Golgi, donde se empaqueta en gránulos de secreción (Figura 6) [17]. Las células beta de los islotes pancreáticos funcionan como un sensor energético en general y de la glucemia en particular, lo que les permite integrar simultáneamente señales de nutrientes y moduladores [20].

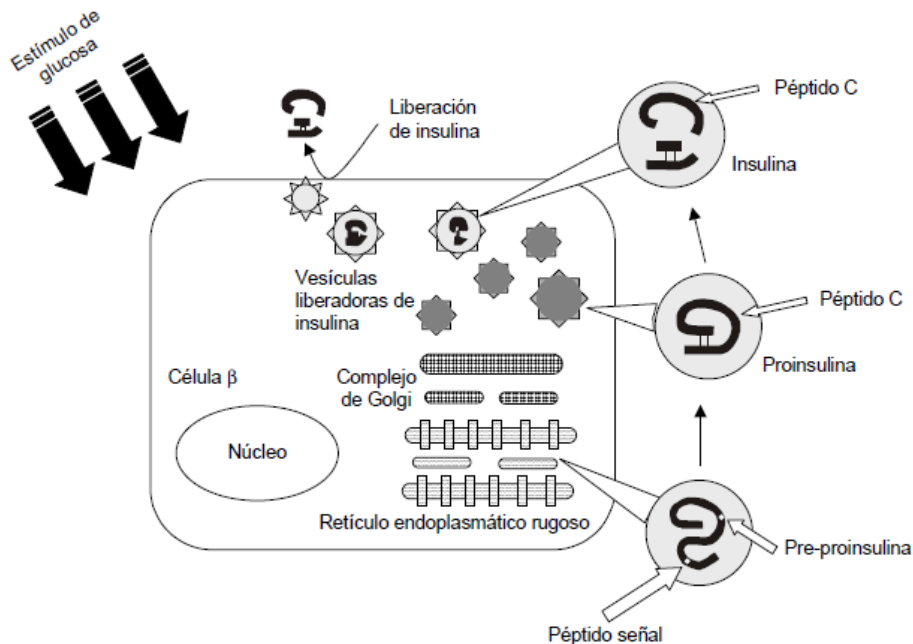


Figura 6. Síntesis de la insulina [17].

3.4.2 ACCIONES MOLECULARES DE LA INSULINA

La insulina actúa a nivel celular, uniéndose a su receptor de membrana, que es una multisubunidad transmembrana de tipo glicoproteína que contiene actividad de tirosina cinasa estimulada por la insulina. El contenido de receptores de insulina es variable, ya que su número aumenta en las células de respuesta al metabolismo energético, principalmente en músculo, hígado y tejido adiposo [17].

El receptor de insulina (IR) pertenece a una subfamilia de receptores con actividad de tirosina cinasa intrínseca, y está compuesto por dos subunidades α y dos subunidades β , unidas por puentes disulfuro. Las subunidades α se encuentran localizadas en el exterior de la membrana plasmática y contienen sitios de unión a la insulina, mientras que las subunidades β tienen una porción extracelular, una transmembranal y una porción intracelular en donde se localiza el dominio con actividad de tirosina cinasa. En la región intracelular se han identificado tres regiones estructurales que incluyen: 1) región yuxtamembranal intracelular, que parece ser importante en la transmisión de la señal; 2) región reguladora y 3) región con sitios de fosforilación en el extremo carboxilo terminal (Figura 7) [21].

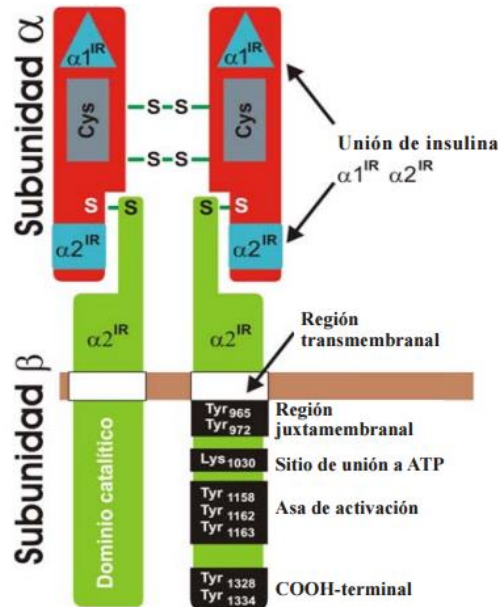


Figura 7. Estructura del receptor de insulina [21].

3.4.3 SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE INSULINA

Una vez que la insulina interacciona con los sitios de unión en su receptor, este cambia de conformación lo que permite que en la subunidad β se fosforile en sitios específicos; una vez ocurrido esto se dice que el receptor está activado. Cuando el receptor de insulina se activa desencadena dos vías principales de transducción: la vía de la fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3K) y la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Ambas

vías regulan la mayoría de las acciones de la insulina asociadas a la regulación del metabolismo energético, la expresión genética y de efectos mitogénicos [21].

3.4.3.1 REGULACIÓN DEL TRANSPORTE DE GLUCOSA VIA PI3K

La insulina promueve la translocación del transportador GLUT4 de compartimentos intracelulares a la membrana plasmática por una vía que depende de la activación de PI3K y de la cinasa Akt [21]. La vía de la PI3K es el principal mecanismo por el cual la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa. Esta vía comienza con la activación del receptor de insulina, que interacciona con la proteína sustrato del receptor de insulina 1 (IRS). A pesar de que existen 4 isoformas de IRS, aparentemente es la isoforma 1 la que está involucrada en el transporte de glucosa [22].

Las PI3Ks son heterodímeros que constan de una subunidad reguladora (p85) y una subunidad catalítica (p110); la unión de ambas subunidades provoca cambios alostéricos en la conformación de la subunidad reguladora, dando como resultado la activación de la subunidad catalítica de PI3K. En consecuencia p110 se localiza cerca de la membrana plasmática en donde tiene acceso a los sustratos PI4-P y PI4,5-P₂ (fosfatidilinositol 4-fosfato y fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, respectivamente), los cuales son fosforilados generando PIP₂ y PIP₃ [22].

El PIP₃ sirve como sitio de unión para las cinasas PDK1 y Akt. De esta última existen 3 isoformas de Akt, de las cuales la isoforma 2 parece ser la que juega un papel importante en la incorporación de la glucosa inducida por la insulina [22]. La enzima Akt regula varios de los efectos metabólicos de la insulina incluyendo la actividad de las enzimas glucógeno sintasa, glucógeno sintasa cinasa 3, sintasa de óxido nítrico inducible, fosfofructocinasa 2 y a las proteínas CREB, mTOR, Caspasa 9 y BAD [22].

Diversas evidencias indican que el tráfico de GLUT4 a la membrana plasmática depende de varios mecanismos entre los que se encuentra la participación de la proteína AS160, sustrato de AKT. Cuando AS160 se encuentra en estado activo regula negativamente la actividad de las proteínas G pequeñas, las cuales participan en el tráfico vesicular de GLUT4. Al fosforilarse AS160 se inhibe, por lo que se incrementa el tráfico del GLUT4 a la membrana plasmática (Figura 8) [21].

3.4.3.2 REGULACIÓN DEL TRANSPORTE DE GLUCOSA POR LA VÍA DE LAS MAP CINASAS

La vía de las MAP cinasas comienza con la fosforilación en los residuos de Tyr del dominio citoplasmático del IR, promoviendo la asociación de la proteína Shc, la cual une al complejo Grb2/SOS; SOS es un factor recambiador de nucleótidos de guanina, capaz de activar a la proteína Ras (GTP-Ras) y con ello inicia el encendido de la cascada de las MAP cinasas de la siguiente manera: GTP-Ras se une y activa Raf-1, dicha unión involucra el reclutamiento y activación de MEK, ERK1/2, estas dos últimas conocidas como MAP cinasas (Figura 9) [21]. Las MAP cinasas tienen una amplia gama de sustratos potenciales incluyendo factores de transcripción y otras cinasas, que participan principalmente en la regulación de la expresión genética en tejidos sensibles a la insulina [21].

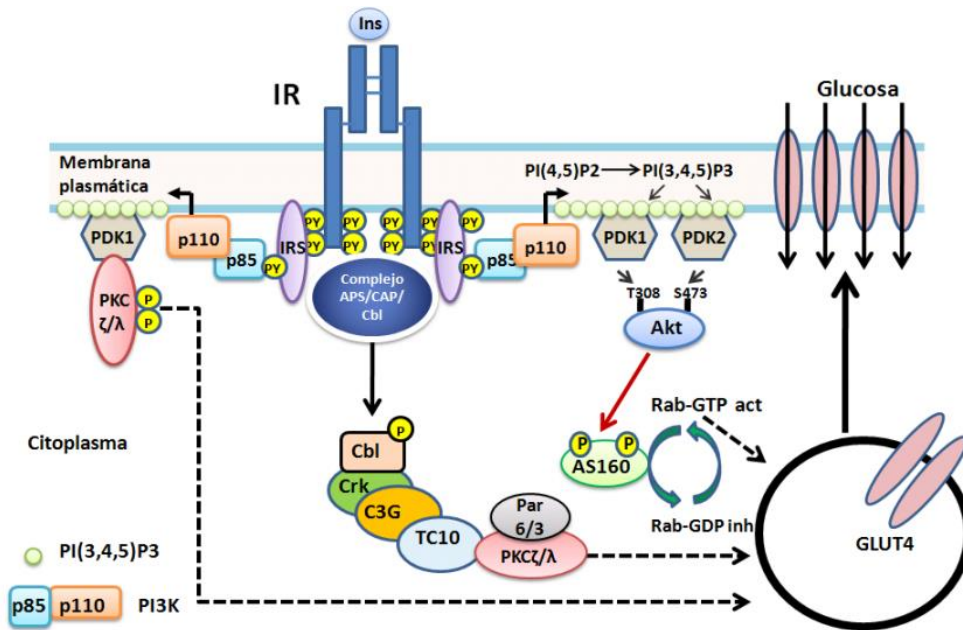


Figura 8. Activación de la vía PI3K por acción de la insulina [21].

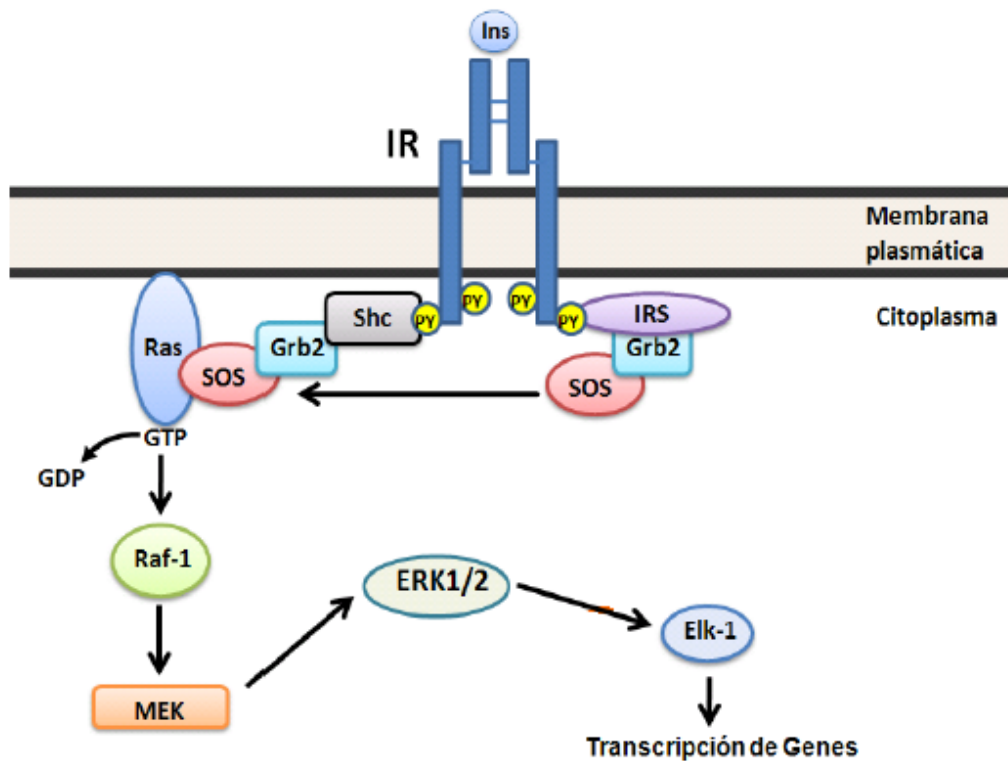


Figura 9. Activación de la vía de las MAP cinasa por acción de la insulina [21].

3.4.4 RESISTENCIA A LA INSULINA

La resistencia a la insulina (RI) es un fenómeno fisiopatológico en el cual, para una concentración dada de insulina, no se logra una reducción adecuada de los niveles de glucemia. RI se define como la disfunción de las células blanco (músculo esquelético, hepatocitos, adipocitos, entre otras) para responder a la acción de la insulina, ya sea por deficiencia en la unión de la insulina al receptor o en la transducción de la señal [23]. El índice HOMA-IR (Homeostatic model assesment, por sus iniciales en inglés) nos permite calcular de una manera simplificada la RI, mediante la fórmula: $HOMA-IR = \frac{[Insulina \mu U/mL * Glucemia \text{ mg/dL}]}{405}$. Aun cuando no existe un valor normal para el HOMA-IR, se estableció como punto de corte 3.5, por encima del cual identificaban los pacientes con factores de riesgo asociados a RI, básicamente aquellos con síndrome metabólico [24].

La resistencia a la insulina es característica de la DM Tipo 2 y se ha asociado a dos factores: 1) la cantidad de ácidos grasos libres en plasma, y 2) el estrés oxidante [25]. En los

pacientes con obesidad al tener mayor cantidad de tejido adiposo aumenta la lipólisis, teniendo concentraciones de ácidos grasos libres en torrente sanguíneo superiores a 1mM [26]. El incremento de ácidos grasos provoca a su vez la reducción de los efectos supresores de la insulina sobre la producción endógena de glucosa hepática y de los efectos estimulantes de la síntesis de glucógeno hepático [23].

Molecularmente, la unión de la insulina a su receptor fosforila el IRS en los aminoácidos tirosina, activando la vía de la fosfoinositol 3 cinasa (PI3-K), la cual a su vez activa la translocación de los transportadores de la glucosa, Glut-4, desde el citoplasma hasta la membrana celular, generando poros que permiten la entrada de la glucosa a la célula. Con la llegada de los ácidos grasos libres se activa el diacilglicerol (DAG) y posteriormente la proteína cinasa C (PKC); ésta a su vez fosforila el IRS pero ya no en los aminoácidos tirosina sino en los aminoácidos serina y como consecuencia de esto el IRS ya no queda disponible para la insulina, ocasionando la RI [24].

Por otra parte, el estrés oxidante se define como el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), altamente reactivas con diversas macromoléculas [25]. Las ROS reaccionan con los enlaces de proteínas, los fosfolípidos polinsaturados de las membranas celulares, carbohidratos y ácidos nucleicos, lo que provoca gran variedad de cambios bioquímicos y fisiológicos en la célula, incluyendo el daño a las células beta pancreáticas [13]. Además, el estrés oxidativo disminuye factores de transcripción (expresados en páncreas y duodeno) que ayudan a la reparación y regeneración de la célula beta (figura 10).

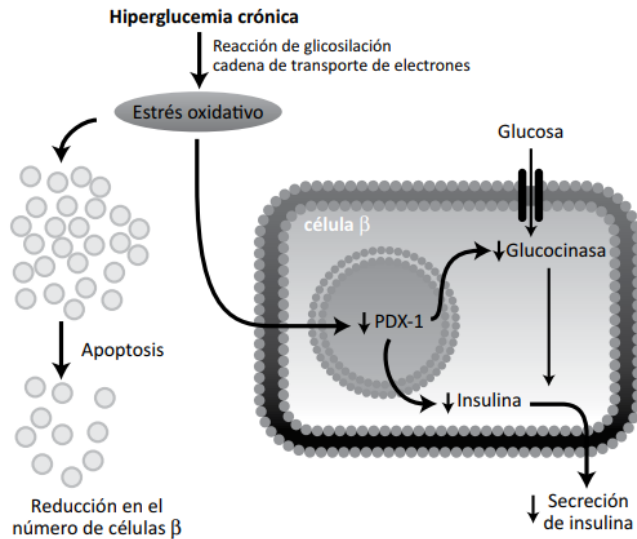


Figura 10. Efecto del estrés oxidativo sobre las células beta pancreáticas [17].

En la DM el estrés oxidante induce glucosilación y la formación de productos avanzados de glucosilación, activación de la vía de los polioles, inactivación de las enzimas antioxidantes, y descontrol en el metabolismo del óxido nítrico (ON) y de las prostaglandinas, por lo cual no solo se ve implicado en la fisiopatología si no en las consecuencias crónicas de la misma [13].

3.5 TRATAMIENTO DE LA DM

El tratamiento utilizado para DM tiene como principal objetivo el reducir a límites normales la concentración de glucosa sanguínea, para que de esta manera mejoren los síntomas diabéticos y sea posible prevenir o demorar las complicaciones subsecuentes. Los pacientes con DM son tratados con dieta y ejercicio físico principalmente, pero se puede añadir algún antidiabético oral o combinaciones de estos [27]. Los antidiabéticos orales utilizados se clasifican como:

- I. Sulfonilureas: Tienen un efecto hipoglucemiante agudo por estímulo de la secreción de insulina a nivel de la célula beta pancreática. Su acción se inicia tras unión a un receptor específico, provocando el bloqueo de los canales de salida de potasio dependientes de ATP, que disminuye el flujo de potasio y despolarización de la membrana celular, lo que incrementa el flujo de calcio al interior de la célula, activando un sistema celular que

causa desplazamiento de los gránulos secretores a la superficie celular, con expulsión de insulina a través de exocitosis [4].

- II. Biguanidas: Su principal mecanismo de acción es el aumento de la sensibilidad a la insulina en tejido hepático, lo que provoca disminución de la glucogenólisis y gluconeogénesis. También aumentan la sensibilidad a la insulina en tejido periférico [28].
- III. Inhibidores de las α -glucosidasas: Actúan inhibiendo las alfa-glucosidasas intestinales (maltasas, sacarasas, dextrinasas, glucoamilasas) presentes en las vellosidades intestinales. Las alfa-glucosidasas son las enzimas que actúan en el desdoblamiento de la sacarosa, maltosa y otros oligosacáridos en monosacáridos (glucosa, fructosa, galactosa). El resultado es una demora en la digestión de los carbohidratos reduciendo los picos glucémicos postprandiales. También actúan disminuyendo la secreción de polipéptidos intestinales [27,28].
- IV. Meglitinidas: Actúan estimulando la secreción de insulina, por inhibición de los canales de potasio dependientes de ATP de las células beta-pancreáticas. Aportan la ventaja de tener un comienzo de acción rápido (30 min) y de corta duración, circunscrito al periodo postprandial (4 h) y que requiere la presencia de glucosa para ejercer su acción, por lo que facilita el horario de las ingestas [28].
- V. Tiazolidinadionas o glitazonas: Son fármacos agonistas del receptor PPAR-gamma (encargado de la captura y almacenamiento de ácidos grasos), reduciendo con ello la resistencia a la insulina, fundamentalmente a nivel de tejidos periféricos (tejido graso y muscular), aunque también tienen efecto a nivel del tejido hepático (inhibición gluconeogénesis hepática) [27,28].

Todas las familias de medicamentos antes descritas tienen una serie de limitaciones, ya que se han reportado diversos efectos adversos como: aplasia medular, agranulocitosis, anemia hemolítica, trombocitopenia, hipoglucemia, rash, púrpura, prurito, eritema nodoso, eritema multiforme, fotosensibilidad, náuseas, vómitos, colestasis, hipotiroidismo subclínico transitorio, secreción inadecuada ADH (hiponatremia) efecto diurético, neumonitis [28,29]. Sin embargo, una de las principales limitaciones de los tratamientos diabéticos es la eficacia como monoterapia, por lo cual en el tratamiento crónico de la DM se utiliza generalmente un tratamiento combinado [29]. Sin embargo, el tratamiento combinado no ha logrado un control glucémico en los pacientes con DM.

Debido a las limitaciones en el tratamiento antidiabético es necesaria la búsqueda de nuevos compuestos. Recientemente se ha manifestado un creciente interés en las terapias alternativas y en el uso terapéutico de los productos naturales para la DM. En este sentido, las algas marinas son conocidas por proporcionar una gran cantidad de compuestos bioactivos [30], de ello se deduce que los extractos de algas marinas pueden beneficiar tanto a los pacientes con DM como a aquellos en riesgo de desarrollar la enfermedad.

3.7 ALGAS MARINAS

Las algas son organismos acuáticos de naturaleza vegetal, que se desarrollan en agua dulce o salada. Son capaces de elaborar compuestos orgánicos a partir del CO₂ y sustancias inorgánicas disueltas en agua. A diferencia de las plantas terrestres las algas marinas no poseen tejidos de conducción ni de sostén, por lo cual están ancladas a rocas o a substratos costeros [31]. El rango de crecimiento de las algas marinas es superior al de las plantas terrestres alcanzando hasta 10 m de longitud y también lo es su eficiencia en la fotosíntesis de 6-8% contra 1.8-2.2% de las plantas terrestres. Además, las algas marinas pueden desarrollarse en cualquier zona climática, desde regiones templadas hasta regiones polares [32,33].

La composición general de las algas marinas incluye ficobiliproteínas, carotenoides, pigmentos, terpenos, polifenoles, florotaninos y polisacáridos, además de minerales como iodo, magnesio, hierro, zinc y calcio, lípidos, fibras y vitaminas. Es por esto que las algas han sido usadas desde la antigüedad como fuentes de alimento por el alto grado de biodisponibilidad y contenido nutrimental [34–36].

Particularmente las características del hábitat en donde se desarrollen las algas marinas influyen en la presencia y concentración de los metabolitos y fitopigmentos sintetizados por las mismas [34]. Por la presencia de fitopigmentos las algas marinas se clasifican en tres grandes grupos: marrón (Feofíceas) , rojas (Rodofíceas) y verdes, (Clorofíceas) (Tabla 2) [37].

Tabla 2 .Clasificación de algas marinas [38] .

Algas	Reino	Filum	Subfilum	Clase	Fotopigmento	Polisacaridos en la pared celular	Proceso de evolucion
Pardas	Crnista	Ochroita	No aplica	Faeofoeae	Clorofila a y c ; xantofilos (fucoxantina y favoxantina)	Acido alginico, fucoidan, laminarian y saigassan	Endosimbiosis secundaria
Verdes	Plantae	Cbrofita	Clorofintina	Clorodendrofiticeae Pedinoficeae Trebouxioficeae Ulvoiceae	Clorofila a y b , xantofila (luteina, violaxantina, neoxantina y enteroxantina)	Acido sulfurico, polisacaridos, galactanos sulfurados y xilanos	Endosimbiosis primaria
Rojas	Plantae	Rodofita	Cianidofitina Rodofitina	Cianidofitina Bangioficeae Compsopogonoiceae Florideoficeae Fortiridio Rodelloficeae Estilonematoficeae	Chlorofila a y d, ficoeritina, ficolilina	Agar, carrageninas, xilanos and florideanos	Endosimbiosis primaria

3.7.1 USOS DE LAS ALGAS MARINAS

Las algas marinas se han usado desde las primeras civilizaciones como fuente de alimentación debido a su alto contenido nutrimental. Actualmente las algas marinas se utilizan en una amplia gama de áreas como la industria alimentaria, farmacéutica, textil y cosmética, y en la agricultura como abonos, fertilizantes y pesticidas [39].

En los últimos años las algas marinas han captado el interés de los investigadores debido a que son una amplia fuente de compuestos distintos a los encontrados en las plantas y frutos terrestres. En las algas marinas la biomasa metabólica depende del ambiente, temperatura, salinidad agua, nutrición y especie, lo cual hace aún más amplia la variedad y características de los compuestos [34]. Particularmente las algas marrón son populares en la medicina tradicional asiática, ya que son usadas para el tratamiento de diversas patologías, debido a que como se mencionó antes, producen compuestos como polifenoles, polisacáridos y pigmentos responsables de su bioactividad [40].

Con base en lo anterior diferentes grupos de investigación han analizado extractos orgánicos, biomasas y compuestos purificados de diferentes especies de algas marinas. Los extractos se han probado en modelos *in vitro* e *in vivo* demostrando diversas actividades biológicas como actividad antioxidante, antiviral, antibiótica, antiparasitaria, anticancerígena, antidiabética, antifúngica, antiinflamatoria, antitrombótica, antilipémica [41–46].

3.7.2 ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA DE LAS ALGAS MARINAS

La actividad antidiabética de diversas especies de algas marinas se ha demostrado evaluando enzimas implicadas en el metabolismo de carbohidratos como son alfa-amilasa, alfa-glucosidasa, hexosinasa, aldosa reductasa, glucosa-6-fosfatasa, dipeptidil peptidasa IV, glicógeno sintetasa cinasa-3beta. Otro blanco común en la evaluación de la actividad antidiabética es la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), ya que esta proteína antagoniza la señalización de la insulina llevando al receptor de insulina a un estado activo, pero inhibiendo la señalización post-receptor, razón por la cual esta enzima está asociada con el desarrollo de la DM2. También se han evaluado patrones fisiológicos como concentración de glucosa, insulina, triglicéridos y colesterol total en plasma y peso corporal en modelos murinos diabéticos y/o en pacientes [30].

Diversas algas rojas, verdes y marrón han mostrado propiedades antidiabéticas como por ejemplo: *Rhodomela confervoides*, *Ecklonia cava*, *Palmaria*, *Alaria* y *Ascophyllum*, de las cuales se han aislado bromofenoles que son potentes inhibidores del PTP1B y de las enzimas alfa-glucosidasa y aldosa reductasa [47–49]. Específicamente en las algas marrón los extractos metanólicos de *Pelvetica siliquosa*, *Ecklonia cava* y *Ecklonia stolonifera* reducen la concentración de glucosa en modelos murinos de síndrome diabético. Los florotaninos dieckol y eckol aislados de *Eisenia bicyclis* son inhibidores de la alfa-amilasa y de PTP 1B (Tabla 3) [7,50,51].

Tabla 3. Actividad antidiabética de algas agrupadas en la familia *Lessoniaceae* [52].

<i>Fluorotaninos</i>	<i>Actividad anti-diabética</i>	<i>Especie</i>
<i>Dieckol</i>	Inhibidor de α -glucosidasa Disminuye la hiperglicemia postprandial Inhibición de PTB 1B Efecto protector en las complicaciones de la diabetes.	<i>E.Cava</i>
<i>Fucodifloroetol G</i>	Inhibidor de α -glucosidasa	<i>E.Cava</i>
<i>6,6'-Bieckol</i>	Inhibidor de α -glucosidasa	<i>E.Cava</i>
<i>7-Floroeckol</i>	Inhibidor de α -glucosidasa Inhibición de PTB 1B	<i>E.Cava</i>
<i>Flurofucufuroeckol A</i>	Inhibidor de α -glucosidasa Inhibición de PTB 1B	<i>E.Cava</i>
<i>Fluroglucinol</i>	Inhibidor de α -glucosidasa Inhibición de PTB 1B	<i>E.Stolonifera</i> <i>E.Bicyclis</i>
<i>Dioxinodehidroeckol</i>	Inhibidor de α -glucosidasa Inhibición de PTB 1B	<i>E.Stolonifera</i> <i>E.Bicyclis</i>
<i>Difloretohidroxicarmalol</i>	Inhibidor de α -glucosidasa Disminuye la hiperglicemia postprandial Efecto protector en las complicaciones de la diabetes.	<i>I.Okamurae</i>
<i>Eckol</i>	Inhibidor de α -glucosidasa Inhibición de PTB 1B	<i>E.Stolonifera</i> <i>E.Bicyclis</i>
<i>Extracto abundante en polifenoles</i>	Inhibidor de α -glucosidasa	<i>A.Nodusum</i>
<i>Extracto abundante en fluorotaninos</i>	Disminuye la hiperglicemia postprandial	<i>A.Nodusum</i> <i>F.vesiculosus</i>
<i>Extracto abundante en polifenoles</i>	Captura de glucosa de musculo esquelético	<i>E.Cava</i>
<i>Extracto abundante en Dieckol</i>	Mejora la sensibilidad a insulina	<i>E.Cava</i>
<i>Extracto rico en polifenoles</i>	Mejora la sensibilidad a insulina	<i>I.Okamurae</i>

4. JUSTIFICACIÓN

La Diabetes Mellitus (DM) Tipo 2 es un síndrome que se presenta principalmente en personas en edad productiva, cuyas complicaciones reducen su calidad de vida. La carga de pacientes con diabetes drena los presupuestos sanitarios nacionales, reduce la productividad, frena el crecimiento económico, genera gastos catastróficos en hogares vulnerables y sobrecarga los sistemas sanitarios, por lo que es una de las mayores emergencias sanitarias mundiales. Para salvar vidas, prevenir y retrasar significativamente las devastadoras complicaciones relacionadas con la diabetes, es necesario que se produzcan cambios en el estilo de vida de toda la población, además de fomentar la detección, el diagnóstico y un tratamiento eficaz contra dicha afección. Sin embargo el tratamiento diabético no sólo es poco eficaz, sino también va acompañada de efectos colaterales, por lo cual es necesario buscar moléculas que junto con los tratamientos convencionales puedan brindar una mayor eficacia y la disminución de efectos secundarios en el tratamiento de la DM.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Recientemente se ha manifestado un creciente interés en las terapias alternativas y en el uso terapéutico de los productos naturales para la DM. Las algas marinas son conocidas por proporcionar una gran cantidad de compuestos bioactivos. En particular, las algas marrón tienen una variedad de compuestos biológicos tales como pigmentos, fucoidanos, ficocoloides y compuestos polifenólicos (en los cuales se ha reportado actividad hipoglucemiante) [30,51,53]. De ello se deduce que los extractos del alga marina marrón *Egregia menziesii* pueden mostrar actividad antidiabética, que en conjunto con los fármacos hipoglucemiantes convencionales, interrumpan, disminuyan o eliminen las lesiones característicos de la DM en hígado, riñones y sistema circulatorio, además de disminuir los niveles de glucosa en sangre para de esta manera beneficiar a los pacientes con DM y a aquellos en riesgo de desarrollarla.

6. HIPÓTESIS

Los extractos de *Egregia menziesii* disminuyen las concentraciones de glucosa en sangre periférica en un modelo murino.

7. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto anti-hiperglucemiante de los extractos del alga *Egregia menziesii*.

8. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico del alga *E. menziesii*
- Evaluar la toxicidad *in vivo* e *in vitro* de los extractos de *E. menziesii*
- Determinar la DL₅₀ de los extractos de *E. menziesii*
- Evaluar en un modelo murino la actividad anti-hiperglucemiante de los extractos de *E. menziesii*
- Dilucidar el mecanismo molecular mediante el cual se obtiene el efecto anti-hiperglucemiante de *E. menziesii*

9. METODOLOGÍA

9.1 Colección e identificación de *E. menziesii*

La colecta de *E. menziesii* se realizó en el mes de agosto en el año 2014 en el "Campo No. 5", en Punta Banda, en latitud: 31°44'3.46"N y longitud: 116°43'39.95"O (Figura 11), los especímenes fueron autenticados por el Oc. Luis Ernesto Aguilar Rosas. Posteriormente, se separaron las frodas, los talos y los pneumatocistos, y se secaron a temperatura ambiente (Figura 12).



Figura 11. Punta Banda, Baja California, México.

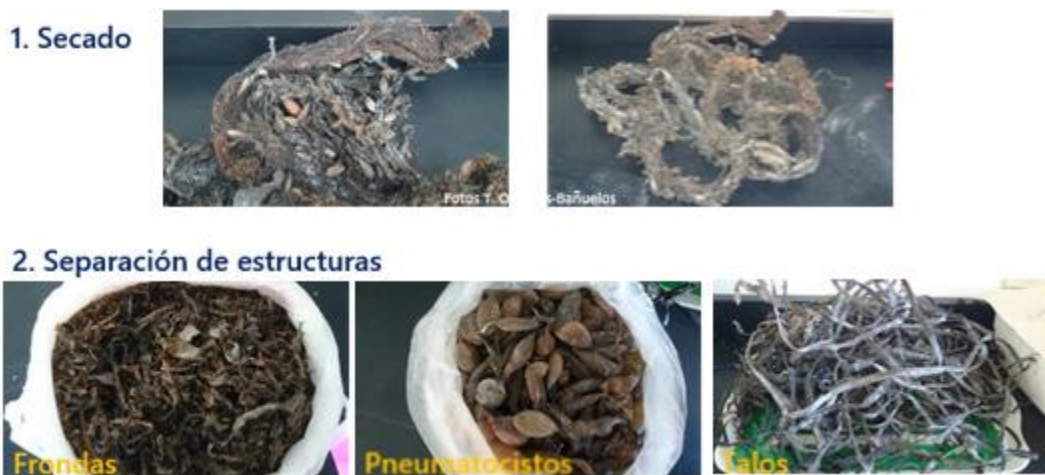


Figura 12. Secado y separación de estructuras de *E. menziesii*.

Una vez identificada la especie *E. menziesii*, se sometió a un proceso de secado a temperatura ambiente durante 20 días (d); subsiguientemente se realizó la separación de sus estructuras (talos, frondas y pneumatocistos). Se tomaron 800 g de frondas y talos, se trituraron mecánicamente y se colocaron en maceración durante 20 d a temperatura ambiente utilizando hexano, cloroformo y metanol (anhídros con 99.8% de pureza) de manera secuencial. La selección de estos solventes se hizo para lograr una transferencia selectiva de compuestos de alta gama y se realizó del de mayor polaridad al de menor polaridad [54,55]; posteriormente se verificó la saturación del extracto utilizando cromatografía en capa fina. Los solventes de los extractos fueron evaporados utilizando un rotavapor-R3 marca BUCHI y después los extractos se liofilizaron en un Lyobeta 15 de Telstar.

9.2 Ensayo de *Artemia salina*

Este ensayo se basó en la metodología reportada por Carballo y colaboradores [56]. Brevemente, se utilizaron huevecillos de *Artemia salina* los cuales fueron obtenidos en una tienda de mascotas (Xalapa, Ver. México). Los huevecillos se pusieron a eclosionar colocando 1 g de huevecillos en 1 L de agua marina artificial (solución salina al 38%, pH 7-8) y se dejaron en burbujeo durante 48 h a 27°C en oscuridad.

Para preparar los extractos de alga marina *E. menziesii* a diferentes concentraciones se preparó una solución patrón de 10mg/mL, utilizando etanol/agua 3:1 como solvente. Posteriormente, se colocaron 5, 50 y 500µL del stock en viales [57] y se llevaron a evaporación a temperatura ambiente; se repitió el proceso para L-ascórbico usando agua como disolvente, el cual se utilizó como control positivo y un control negativo (agua marina artificial en ausencia de estímulos).

A continuación se colocaron 10 crustáceos (utilizando pipeta Pasteur) en viales que previamente contenían una dilución de los extractos o los controles, y se llevaron a un volumen final de 7mL con agua de mar artificial y se incubaron durante 24h. Cada concentración se colocó por triplicado y se realizaron 3 repeticiones. Al finalizar el tiempo de exposición se contó el número de organismos muertos y se calculó el porcentaje de mortalidad considerando como 100% aquellos que fueron incubados sin estímulo.

Se consideraron crustáceos muertos si no tenían movimiento durante 30 s de observación. El experimento se consideró válido si el porcentaje de mortalidad en los viales en ausencia de extracto no excedió el 10%.

La DL₅₀ se calculó mediante interpolación lineal. El grado de toxicidad del extracto se definió en función del rango en que se encontraron los valores de DL₅₀ de acuerdo con las categorías establecidas por el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología (CYTED): extremadamente tóxico (CL₅₀< 10µg/ml), muy tóxico (10< CL₅₀ <100), moderadamente tóxico (100< CL₅₀ <1000) y no tóxico (CL₅₀> 1 000µg/ml).

Los resultados se presentan como el promedio ± error estándar y se analizaron utilizando ANOVA de una vía mediante el software GraphPadPrism 6, alfa=0.05.

9.3. Aislamiento y ensayo en linfocitos en sangre periférica

Los linfocitos se obtuvieron de sangre periférica humana mediante punción venosa de voluntarios de entre 25 y 35 años los cuales firmaron un consentimiento informado (OMS 1991) y las muestras se manejaron bajo los lineamientos éticos de laboratorio. Los linfocitos se aislaron empleando Lymphoprep (Nycomed) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se contaron 100,000 células utilizando una cámara de Neubauer y se colocaron en cajas de 24 pozos.

Se utilizaron las siguientes concentraciones de cada uno de los extractos 5, 50 y 500µg/ml y pantenolid 6.2µM (en DMSO) como control positivo y un control negativo en ausencia de estímulos.

Los linfocitos se incubaron en una solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS) durante 1 h a 37°C, posteriormente se tiñeron con el colorante vital azul de tripano y se cuantificaron en una cámara de Neubauer. Se determinó el porcentaje de células muertas y mediante una regresión lineal se interpoló la concentración letal media (CL₅₀).

Los resultados se presentan como el promedio ± error estándar y se analizaron utilizando ANOVA de una vía mediante el software GraphPadPrism 6, alfa=0.05.

9.4 Ensayo de viabilidad con MTT

Se utilizó la línea 3T3-L1 de fibroblastos adquirida en ATCC (American Type Culture Collection), la cual es una línea celular de preadipocitos comprometida a diferenciarse a adipocitos, derivada de células embriónicas de ratón. Las células 3T3-L1 fueron cultivadas en medio mínimo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibióticos (50µg/mL de gentamicina, 10,000U de penicilina sódica), incubadas a 37°C en 5% de CO₂. Las células fueron cultivadas hasta alcanzar una confluencia de 80%, posteriormente se sembraron 5x10³ células por pozo, para ser tratadas con diferentes concentraciones de los extractos de *E. menziesii*.

Para la diferenciación de la línea celular 3T3-L1 se sembraron 5x10³ células 3T3-L1 por pozo en placas de 96 y se cultivaron hasta alcanzar 80% de confluencia; posteriormente se cultivaron utilizando medio diferenciación (medio de crecimiento suplementado con dexametasona 0.25 µM e insulina 10 µg/mL) durante 3 días. Los 7 días restantes se

cultivaron cambiando el medio de diferenciación por medio de mantenimiento (medio de crecimiento suplementado con insulina 10 µg/mL).

Se utilizó la tinción del rojo oleoso para evidenciar la diferenciación de fibroblastos a adipocitos, para lo cual se utilizaron 1×10^6 células en distintos tiempos del proceso de diferenciación (0, 3, 6 y 9 días). Las células se fijaron con solución de formaldehído al 10% durante una hora a temperatura ambiente, se lavaron con isopropanol al 60% y se dejaron secar. Posteriormente se les adicionó la solución de rojo oleoso O (3.5 g/L en isopropanol) por 20 min. Se removió la solución con un lavado de isopropanol al 100% seguido de cuatro lavados con agua destilada. Las células teñidas se observaron al microscopio y se tomaron microfotografías utilizando un microscopio invertido triocular modelo ox.2453-plf. Una vez verificada la diferenciación se sembraron 5×10^3 células adipocitas por pozo, y se evaluaron diferentes concentraciones del extracto.

Para el ensayo de viabilidad MTT [58] se utilizaron 5×10^3 células de fibroblastos y adipocitos por pozo. Se utilizó un stock de 10mg/mL, de extractos en el que el solvente fue utilizando fue etanol/agua 3:1; se agregaron las alícuotas correspondientes para obtener las siguientes concentraciones finales 0.1, 1, 10, 100, 1000 y 10000 µg/mL para cada uno de los extractos.

Las células fueron incubadas por 4, 24, 48 y 72 h a 37°C. Después de este tiempo se adicionó el reactivo MTT [5mg/mL] (Sigma Aldrich) y se incubó por 1 h en oscuridad. Se removió la mezcla obtenida y los cristales formados se disolvieron en DMSO. La densidad óptica de las muestras se determinó por espectrofotometría a una longitud de onda de 560 nm en un lector Epoch de BioTeK monocromador UV-Vis controlado a través del Software para Análisis de Datos Gen5, n=4, N=3. Los resultados se presentan como el promedio \pm error estándar y se analizaron utilizando ANOVA de una vía mediante el software GraphPad Prism 6, alfa=0.05.

9.5 Evaluación de la actividad antidiabética *in vivo*

Se utilizaron ratones de la cepa CD-1, machos de entre 25-30g, los cuales fueron mantenidos en cajas de plexiglás en condiciones estándar de luz/oscuridad 12/12 h (encendido de la luz 06:00), temperatura controlada de 25°C, agua y alimento *ad libitum*. Hasta el momento del inicio de las pruebas fueron manejados bajo las indicaciones de la NOM-062-ZOO-1999.

Seleccionamos el modelo de inducción de hiperglicemia murino mediante la administración de fármacos con efectos tóxicos selectivos a las células beta pancreáticas como es el aloxano, el cual produce muerte celular mediante la generación de especies reactivas de oxígeno. La inducción de hiperglicemia se realizó administrando aloxano i.p. [59,60] (Alloxan monohydrate, Sigma A7413), para identificar la concentración a la cual el 80% de los sujetos administrados presentó hiperglicemia (glucosa superior o igual a 200 mg/dL), sin llegar a producir muerte en ninguno de ellos; se realizó una curva evaluando las concentraciones de 50, 100 y 150 mg/kg de aloxan [61]. De manera previa a la inducción se determinaron los niveles de glucosa en sangre capilar obtenida por punción de la cola (glucómetro Accu-Check Performa). Para la evaluación de la glucosa plasmática los animales se sometieron a un ayuno previo de 8 h; con este dato verificamos que todos los sujetos de experimentación tuvieran una concentración de glucosa periférica dentro del rango normoglicémico (70-120 mg/dL).

Posterior a la administración de aloxan los animales fueron mantenidos durante 72 h, con alimento y solución de sacarosa 5% *ad libitum*. Se evaluaron los niveles de glucosa plasmática a las 72 h posteriores a la inducción y, aquellos individuos que presentaron niveles de glucosa plasmática superiores a los 200mg/dL [61], se consideraron con diabetes aloxigénica.

Los ratones con diabetes aloxigénica se clasificaron en 5 grupos (n=6): i) Metformina 250 mg/kg/d o.p. que equivale a la dosis clínica usada en humanos [62], ii) Control negativo en donde se administró vehículo, iii) extracto metanólico de *E. menziesii* p.o. 50mg/kg, iv) extracto metanólico *E. menziesii* p.o. 100mg/kg y, v) extracto metanólico de *E. menziesii* p.o. 150mg/kg. Los tratamientos duraron 15 d durante los cuales se estuvo evaluando la concentración de glucosa en sangre periférica mediante punción en la cola los días 3, 6, 9, 12 y 15 (glucómetro Accu-Check Performa). Adicionalmente se evaluó diariamente el consumo de agua, alimento y el peso de los animales. Los resultados se presentan como

el promedio \pm error estándar y se analizaron utilizando ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples mediante el software GraphPad Prism 6, alfa 0.05.

9.6. Transporte de Glucosa [^3H -2DOG] *in vitro*

Para la evaluación de transporte de glucosa se utilizó la línea celular HepG2 [63], la cual fue cultivadas en medio mínimo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibióticos (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina, 10,000 U de penicilina sódica), incubadas a 37°C en 5% de CO_2 . Las células fueron cultivadas hasta alcanzar una confluencia de 80%, posteriormente se sembraron 5×10^4 células por pozo.

Las células fueron estimuladas con el extracto metanólico de *E. menziesii* a diferentes concentraciones (0.1, 1, 10, 100, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y por tiempo de captura de 30 min, para ello se utilizó un análogo radiactivo de la glucosa 0.4 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ [^3H -2DOG] (20 nM) mas 2.5 mM de 2DOG; después del tiempo de captura indicado las células fueron lavadas dos veces con solución amortiguadora de ensayo en frío para detener la reacción. Las células fueron cosechadas con NaOH 0.1 M, se resuspendieron y transfirieron a viales adicionándoles líquido de centelleo para la cuantificación de la captura, n=4, N=3. Los resultados se presentan como el promedio \pm error estándar y se analizaron utilizando ANOVA de una vía mediante el software GraphPad Prism 6, alfa=0.05.

9.6 Cuantificación del contenido de polifenoles

La cuantificación se realizó mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu [64], empleando una curva patrón de ácido gálico en las siguientes concentraciones 0, 0.025, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 1, 2.5, 4, 8, 10, 20 y 50mg/mL. Para la muestra se disolvieron 10 mg de los extractos de *E. menziesii* en 3mL de etanol-agua 3:1, del stock anterior se tomaron 120 μL . A la curva patrón y extractos, se les agregaron 250 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N en una placa de 24 pozos y se incubaron durante 5 min. Posterior al tiempo de incubación se agregaron 1000 μL de Na_2CO_3 al 20% y se incubaron a oscuridad durante 2 h. Después se midió la absorbancia a 760 nm con un lector de microplacas espectrofotométrico (Epoch de BioTeK monocromador UV-Vis controlado a través del Software para Análisis de Datos Gen5) n=3,

N=3. Los resultados se presentan como el promedio \pm error estándar y se analizaron utilizando ANOVA de una vía mediante el software GraphPad Prism 6, $\alpha=0.05$.

9.7 Ensayo de captación de radicales DPPH

El compuesto orgánico 2,2-difenil-1-picrilhidracilo conocido como DPPH [65] es un radical libre estable, mediante el cual se determinan actividades de captura de material radicalario en presencia de una sustancia antioxidante, midiendo el potencial de inactivación de dicho radical en medio acuoso (Figura 13). A 10 μg del extracto metanólico de *E. menziesii* y controles (control negativo: agua y control positivo: ácido L-ascórbico) se les agregaron 900 μL de solución DPPH (6×10^{-5} M en DMSO) y se incubaron durante 1 h en oscuridad. Posterior a este tiempo la absorbancia se midió a 520 nm utilizando un lector de microplacas (Epoch de BioTeK monocromador UV-Vis controlado a través del Software para Análisis de Datos Gen5), $n=3$, $N=3$. Los resultados se presentan como el promedio \pm error estándar y se analizaron utilizando ANOVA de una vía mediante el software GraphPad Prism 6, $\alpha=0.05$.

La actividad atrapadora de radicales se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad (\%)} = [1 - (A2 - A3) / A1] \times 100$$

Donde A1 es la absorbancia de Control; A2 es la absorbancia de la muestra; A3 es la absorbancia de fondo de la muestra.

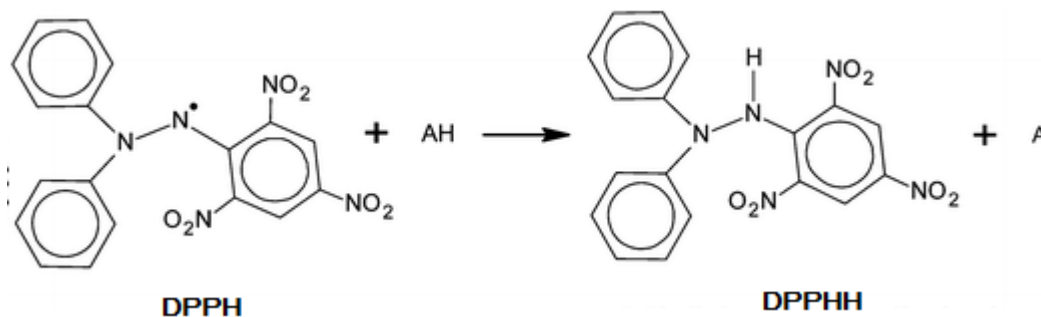


Figura 13. Reacción de neutralización del radical DPPH.

11.RESULTADOS

11.1 Preparación de extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de alga *E. menziesii*

Los extractos del alga *E. menziesii* se realizaron de manera subsecuente con los disolventes hexano, cloroformo y metanol. Se obtuvieron 1.48 g del extracto hexánico crudo, 2.96 g del extracto clorofórmico crudo y 79.65 g del extracto metanólico crudo, lo que representa un rendimiento de 0.199, 0.399 y 10.74% respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4. Extractos obtenidos de *Egregia menziesii*

Extracto	(g)	Rendimiento
Metanólico	79.65	10.74%
Hexánico	1.48	0.19%
Clorofórmico	2.96	0.39%

11.2 Ensayo de *Artemia salina*

La evaluación de toxicidad en el modelo de *A. salina* mostró que los extractos hexánico y clorofórmico del alga *E. menziesii* disminuyen la viabilidad del crustáceo de manera directamente proporcional a la concentración de los mismos; mientras que con el extracto metanólico la viabilidad de *A. salina* disminuye 20%, aún con la concentración de 500 µg/mL (Figura 14). Al comparar cada extracto con el ácido ascórbico (control positivo), observamos que los tres extractos tienen un comportamiento significativamente diferente a este ($P < 0.0001$).

Se determinó que la CL_{50} de los extractos (E) es: E hexánico < E clorofórmico < E metanólico (Tabla 5): Estos resultados clasifica, según los parámetros del Programa Iberoamericano para la Ciencia, Tecnología y Desarrollo (CYTED), a los E. hexánico y E. clorofórmico como moderadamente tóxicos y al E. metanólico como no tóxico.

Tabla 5 .Concentración letal media de los extractos de *E. menziesii* en el modelo de *Artemia salina*. Hx: extracto hexánico; Chl: extracto clorofórmico; MeOH: extracto metanólico; LAA: Ácido ascórbico.

Tratamiento	LC ₅₀ (µg/ml)
Hx	169.46 ± 0.067
Chl	197.39 ± 0.015
MeOH	> 1000
LAA	150.33 ± 0.036

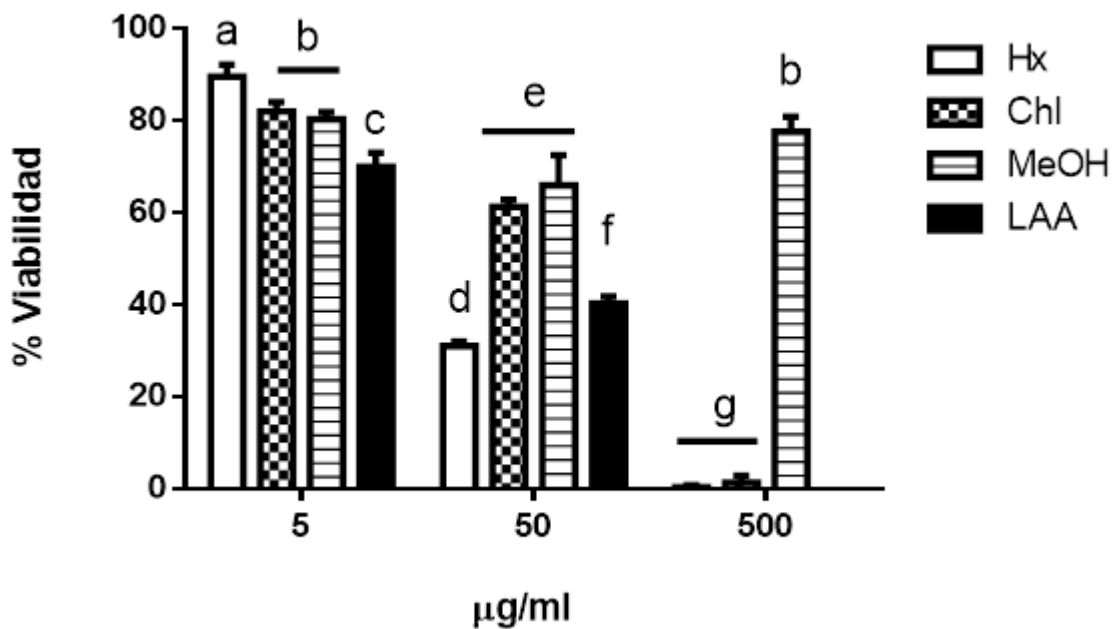


Figura 14. Inhibición de la viabilidad en *Artemia salina* con distintos extractos de *Egrecia menziesii*. Hx: extracto hexánico; Chl: extracto clorofórmico; MeOH: extracto metanólico; LAA: ácido ascórbico. Los datos se analizaron con ANOVA de una vía, alfa=0.05, n=3, N=3, promedio ± SEM.

11.3 Determinación de la toxicidad en linfocitos humanos

La evaluación de los extractos del alga *E. menziesii* en el modelo de linfocitos humanos obtenidos de sangre periférica mostró que los extractos hexánico y clorofórmico disminuyen la viabilidad de los linfocitos de manera directamente proporcional al incremento de la concentración de los mismos; mientras que el E metanólico disminuyó solamente 30% la viabilidad en la concentración más alta (500 µg/mL, Figura 15). Asimismo, se estableció que la CL₅₀ de los extractos es: E hexánico < E clorofórmico < E metanólico (Tabla 6). Utilizamos la CL₅₀ del compuesto proapoptótico pantenolide (Prd) como control positivo (Al-Fattawi 2014), observamos que los extractos hexánico y clorofórmico en la concentración de 50 µg/mL tienen un comportamiento estadísticamente similar al pantenolide, mientras que el extracto metanólico en ninguna de las concentraciones evaluadas muestra una respuesta similar a los extractos hexánico y clorofórmico de *E. menziesii* ni al pantenolide, dado lo anterior el extracto metanólico se clasifica como no tóxico en linfocitos humanos de acuerdo con las tablas de CYTED.

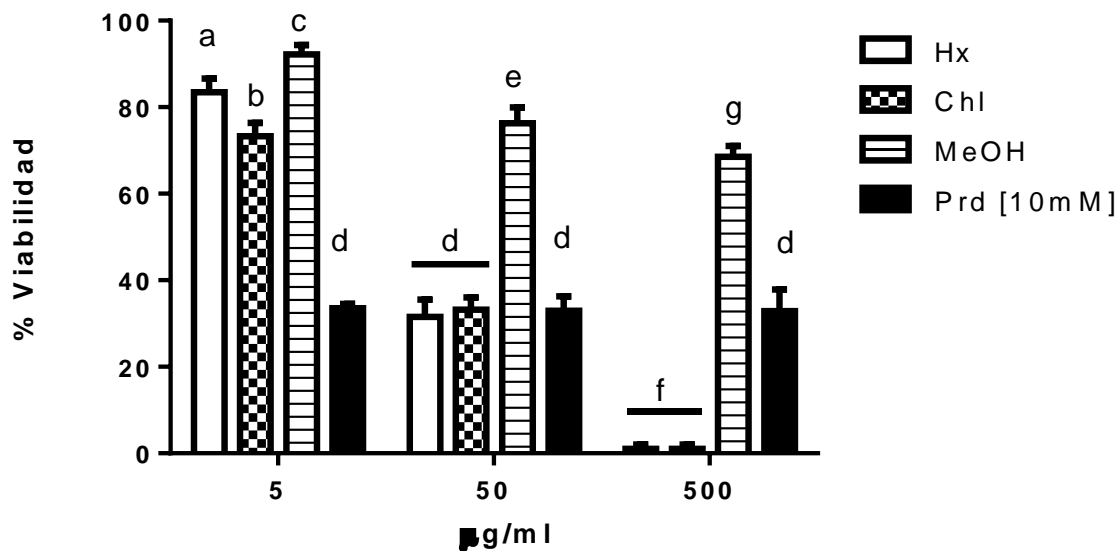


Figura 15. Inhibición de la viabilidad en linfocitos. Hx: extracto hexánico; Chl: extracto clorofórmico; MeOH: extracto metanólico; Prd: Pantenolide. Los datos se analizaron con ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples, alfa=0.05, n=3, N=3, Promedio ± SEM.

Tabla 6. Concentración letal media de los extractos de *E. menziesii* en linfocitos humanos. Hx: extracto hexánico; Chl: extracto clorofórmico; MeOH: extracto metanólico; Prd: Pantenolide [66]*.

Tratamiento	LC ₅₀ µg/ml
Hx	91.19 ± 0.089
Chl	71.5 ± 0.034
MeOH	> 1000
Prd	10mM*

11.4 Ensayo de viabilidad con MTT

Este ensayo mostró que conforme se incrementó la concentración de los extractos hexánico y clorofórmico; y el tiempo de incubación de los mismos, disminuyó la actividad metabólica de los fibroblastos hasta en un 90%. Mientras que con el E metanólico en la concentración más alta (1000 µg/mL) y en el tiempo de incubación más prologado (72h) disminuyó solo el 40% de la viabilidad celular. En la figura 16 se observa el efecto resultante de los extractos de *E. menziesii* en la línea celular 3T3-L1 en forma fibroblástica.

La línea celular de fibroblastos 3T3-L1 bajo condiciones específicas se diferencia en adipocitos, evaluamos de igual manera los extractos metanólico, hexánico y clorofórmico del alga *E. menziesii* en la forma adipocita, la figura 17 muestra que conforme se incrementó la concentración de los extractos y el tiempo de incubación de los mismos, disminuyó la actividad metabólica de los adipocitos hasta en un 90% con los tres extractos.

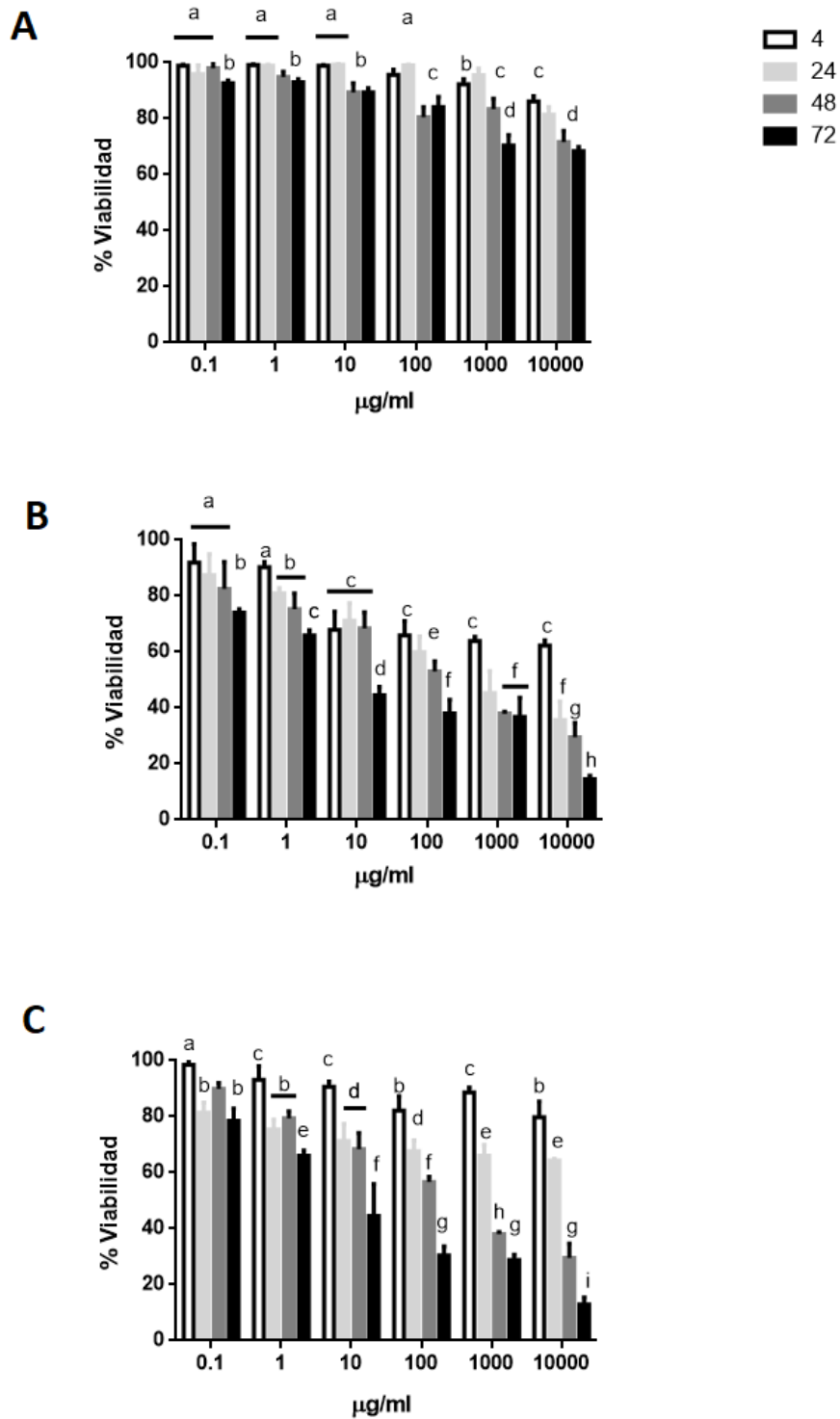


Figura 16. Evaluación de la actividad mitocondrial con MTT en células 3T3-L1 fibroblásticas, graficado en escala de grises las horas de incubación. **A** extracto metanólico, **B** extracto hexánico, **C** extracto clorofórmico. Los datos se analizaron con un ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples, alfa=0.05, n=3 y N=3, promedio±SEM.

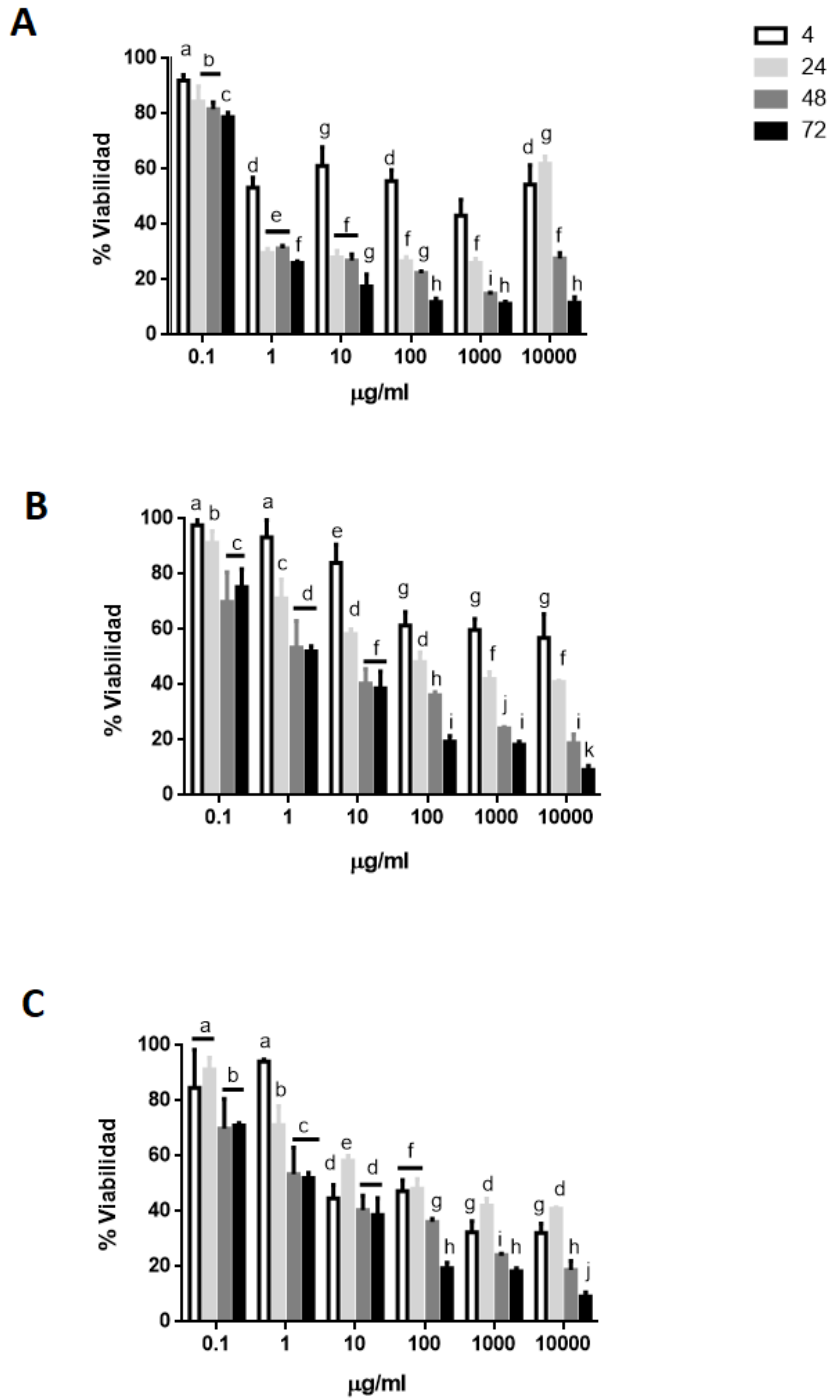


Figura 17. Evaluación de la actividad mitocondrial con MTT en células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos, graficado en escala de grises las horas de incubación. **A.** extracto metanólico **B.** extracto hexánico **C.** extracto clorofórmico. Los datos se analizaron con un ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples, alfa=0.05, n=3 y N=3, promedio±SEM.

Al comparar el efecto inhibitor de los extractos metanólico, hexánico y clorofórmico de *E. menziesii* en la línea celular 3T3-L1, es evidente que los tres extractos en la forma adipocita tuvieron un mayor decremento de la actividad celular que la forma fibroblástica ($p > 0.001$). No obstante al observar las CI_{50} el E metanólico de *E. menziesii* mostró una baja toxicidad ($CI_{50} > 10000$) en todos los tiempos evaluados en ambas formas, fibroblástica y adipocita (Tabla 7). El extracto clorofórmico de *E. menziesii* es el que mostro un efecto inhibitor mayor, seguido del E hexánico en la forma adipocita; mientras que en la forma fibroblástica únicamente tienen un efecto inhibitor a las 48h (Tabla 7).

Tabla 7. Concentración inhibitora media (CI_{50} $\mu\text{g/ml}$) de los extractos del alga *E. menziesii* en la línea celular 3T3-L1. Hx. Extracto hexánico, Chl. Extracto clorofórmico, MeOH Extracto metanólico.

Extractos	Fibroblastos			Adipocitos		
	4h	24h	48h	4h	24h	48h
Hx	>1000 ^a	>1000 ^a	105.01±2.12 ^b	>1000 ^a	110.15±4.15 ^b	8.78±3.12 ^c
Chl	>1000 ^c	>1000 ^c	107.79±1.98 ^d	13.17±3.13 ^d	109.15±3.11 ^e	8.46±4.16 ^d
MeOH	>1000 ^e	>1000 ^e	>1000 ^e	>1000 ^f	>1000 ^f	107.79±2.67 ^g

11.5 Evaluación de la actividad anti-hiperglucemiante *in vivo*

Al realizar la evaluación de la concentración de aloxano necesaria para inducir hiperglicemia en ratón, la curva de concentración de aloxano mostró que a la concentración de 150mg/kg el 100% de los sujetos experimentales presentó hiperglicemia, con una concentración de glucosa periférica igual o superior a los 200 mg/dL. Asimismo se verifico que esa concentración de glucosa permaneciera en los individuos durante los días del experimento. La concentración de 150mg/kg fue seleccionada para inducir diabetes en el modelo de hiperglicemia subcrónico utilizado en este estudio (Figura 18).

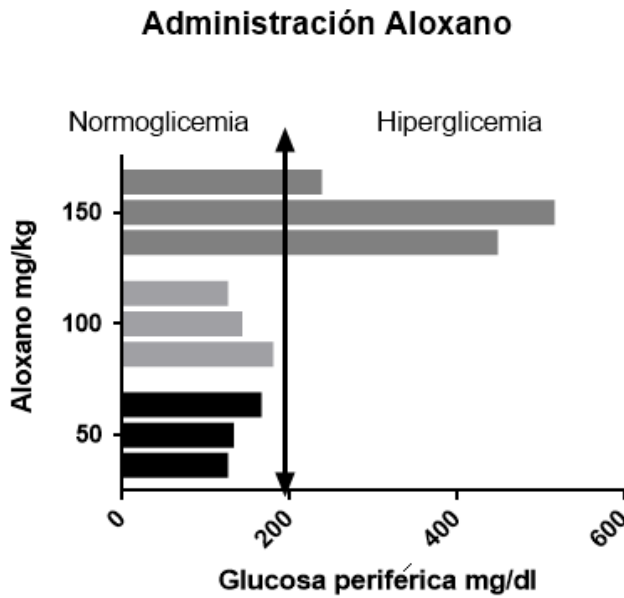


Figura 18. Niveles de glucosa periférica en ratón CD-1, al ser administradas con 50, 100, 150mg/kg de aloxan. Evaluación ANOVA de una vía, $P < 0.05$, $n = 3$.

Una vez que los ratones adquirían hiperglicemia se clasificaban de manera aleatoria en 5 grupos administrados con: vehículo (Veh), 50mg/kg, 100mg/kg, 150mg/kg de extracto metanólico de *E. menziesii* y metformina (Met) 250 mg/kg ($n = 6$), durante 15 días consecutivos.

En los ratones administrados con 50mg/kg de extracto metanólico los niveles de glucosa plasmática disminuyeron proporcionalmente al incremento de los días de tratamiento (Figura 19). El grupo administrado con Met también mostró un decremento en la concentración de glucosa, el cual fue evidente a partir del día 12 al comparar el decremento total de la concentración de glucosa en ambos grupos encontramos que no hay diferencia significativa entre el grupo administrado con Met con respecto al grupo administrado con 50mg/kg de extracto metanólico de *E. menziesii* ($p > 0.001$).

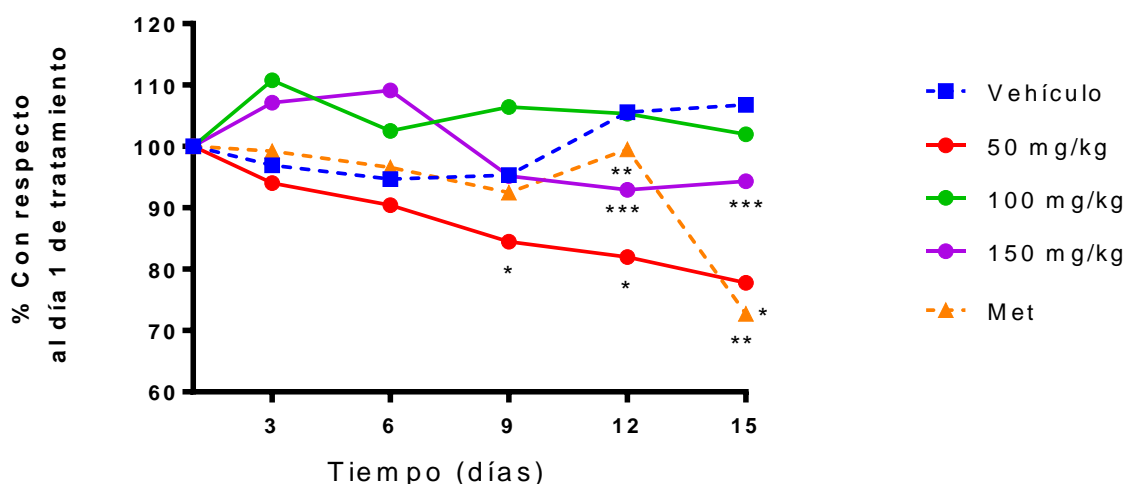


Figura 19. Glucosa plasmática en ratón CD-1 con la administración P.O. de Extracto metanólico. Met: metformina 250mg/kg, ANOVA de una vía y ensayo de correlación punto a punto. *, ** y *** $P < 0.05$ vs. el vehículo, $n=6$.

Los grupos administrados con 100 y 150 mg/kg de extracto metanólico de *E. menziesii* no mostraron diferencia con respecto al grupo administrado con vehículo. No obstante al evaluar el cambio de la concentración de glucosa en estado inicial con respecto al estado final (Tabla 8) se observa que todos los grupos disminuyen significativamente la concentración de glucosa con respecto al administrado con vehículo; en particular el grupo administrado con 50mg/kg de extracto metanólico de *E. menziesii* (Tabla 8), mientras que el grupo administrado con vehículo no solo no disminuyó la concentración de glucosa, por el contrario mostró un incremento de la misma evidente a partir del día 9 (Figura 19, Tabla 8).

Durante el experimento, se evaluó diariamente el consumo de agua, alimento y peso corporal en cada uno de los grupos (Figura 20). En la figura 20 A se muestra los resultados obtenidos en el consumo de alimento, en donde se observa que el grupo administrado con vehículo tuvo un consumo de alimentos significativamente menor con respecto a los grupos restantes. En la figura 20 B que corresponde al consumo de agua, observamos que el grupo administrado con Met mostró un consumo superior que los grupos administrados con extracto metanólico y al grupo vehículo. Al comparar el peso corporal (Figura 20 C) en los diferentes grupos no se observa diferencia significativa entre los mismos.

Tabla 8. Concentración de glucosa en sangre periférica en el modelo de ratón hiperglicémico.

	Concentración de glucosa en sangre periférica (mg/dL)		
	Antes de la inducción de diabetes	Día 1	Día 15
Vehículo	133.8±7.6 _a	442.32±47.8 _b	538.6±44.2 _c
EM 50 mg/kg	148.5±9.6 _a	521.1±22.9 _b	396.1±61.0 _d
EM 100 mg/kg	134.7±9.7 _a	470.6±54.3 _b	433±53.1 _e
EM 150 mg/kg	131.8±8.5 _a	492.3±46.2 _b	420.5±58.1 _e
Metformina	133.7±12.1 _a	460.5±45.1 _b	408.1±46.6 _e

Cabe resaltar que el grupo administrado con la concentración de 50mg/kg de extracto metanólico de *E. menziesii* fue en el que se observó mayor efecto disminuyendo los niveles de glucosa periférica en el modelo subcrónico de ratón hiperglicémico, por lo tanto se seleccionó dicha concentración y se evaluó bajo el mismo esquema de administración pero en ratón normoglicémico, debido a que una de los principales efectos secundarios del tratamiento diabético es la hipoglucemia [29]. Los resultados obtenidos con respecto a la concentración de glucosa en un modelo normoglicémico se observan en la figura 21. A partir del día 9 la concentración de glucosa es menor en el grupo administrado con 50 mg/kg extracto metanólico de *E. menziesii*.

En la figura 22 C corresponde al peso corporal, observamos que a partir del día 5 el grupo administrado con *E. menziesii* muestra una disminución significativa con respecto al grupo vehículo. En relación al consumo de agua y alimento no hubo diferencia significativa entre los grupos evaluados (Figura 22 A y 22 B).

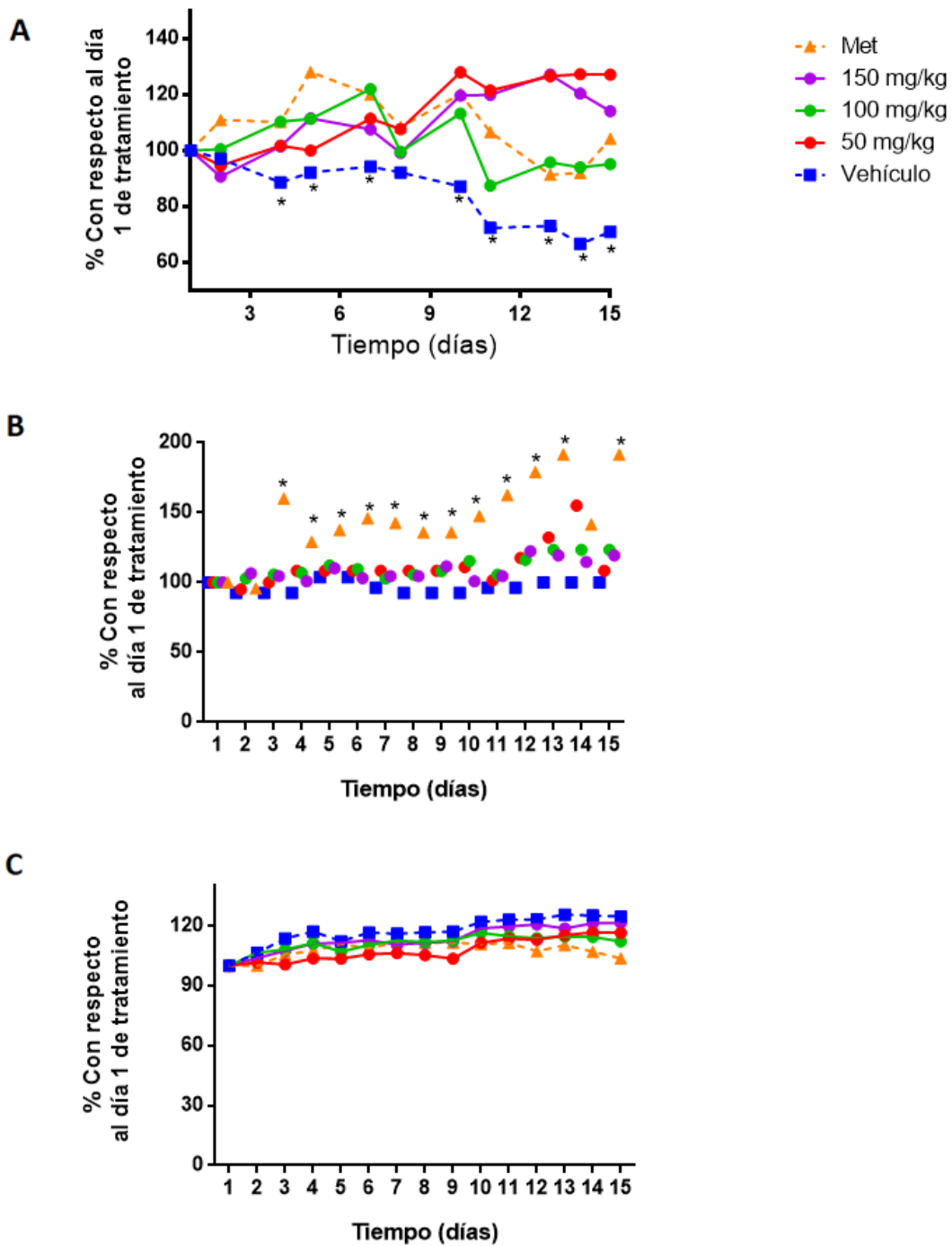


Figura 20. Parámetros fisiológicos en ratones hiperglicémicos administrados con extracto metanólico de *E. menziesii*. A. Consumo de alimentos, B. Consumo de agua, C. peso corporal. Met: metformina 250mg/kg, ANOVA de una vía con comparaciones múltiples, $P < 0.05$, $n = 6$.

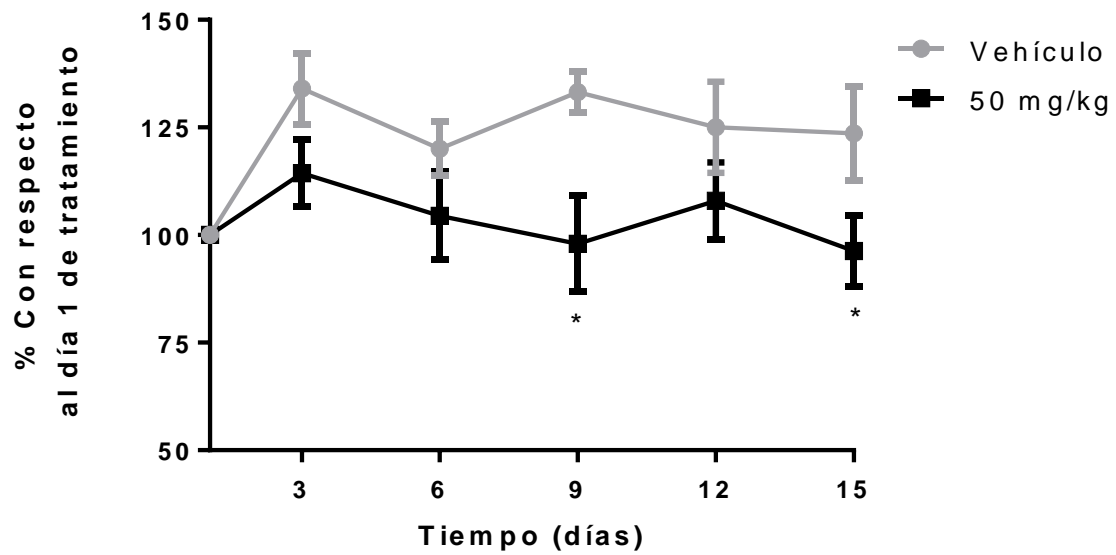


Figura 21. Evaluación del extracto metanólico de *E. menziesii* en ratones normoglicémicos. A. glucosa, B. peso corporal, C. Consumo de alimento, D. Consumo de agua. Extracto metanólico 50mg/kg, ANOVA de una vía con comparaciones múltiples, $P=0.05$, $n=3$, promedio \pm SEM.

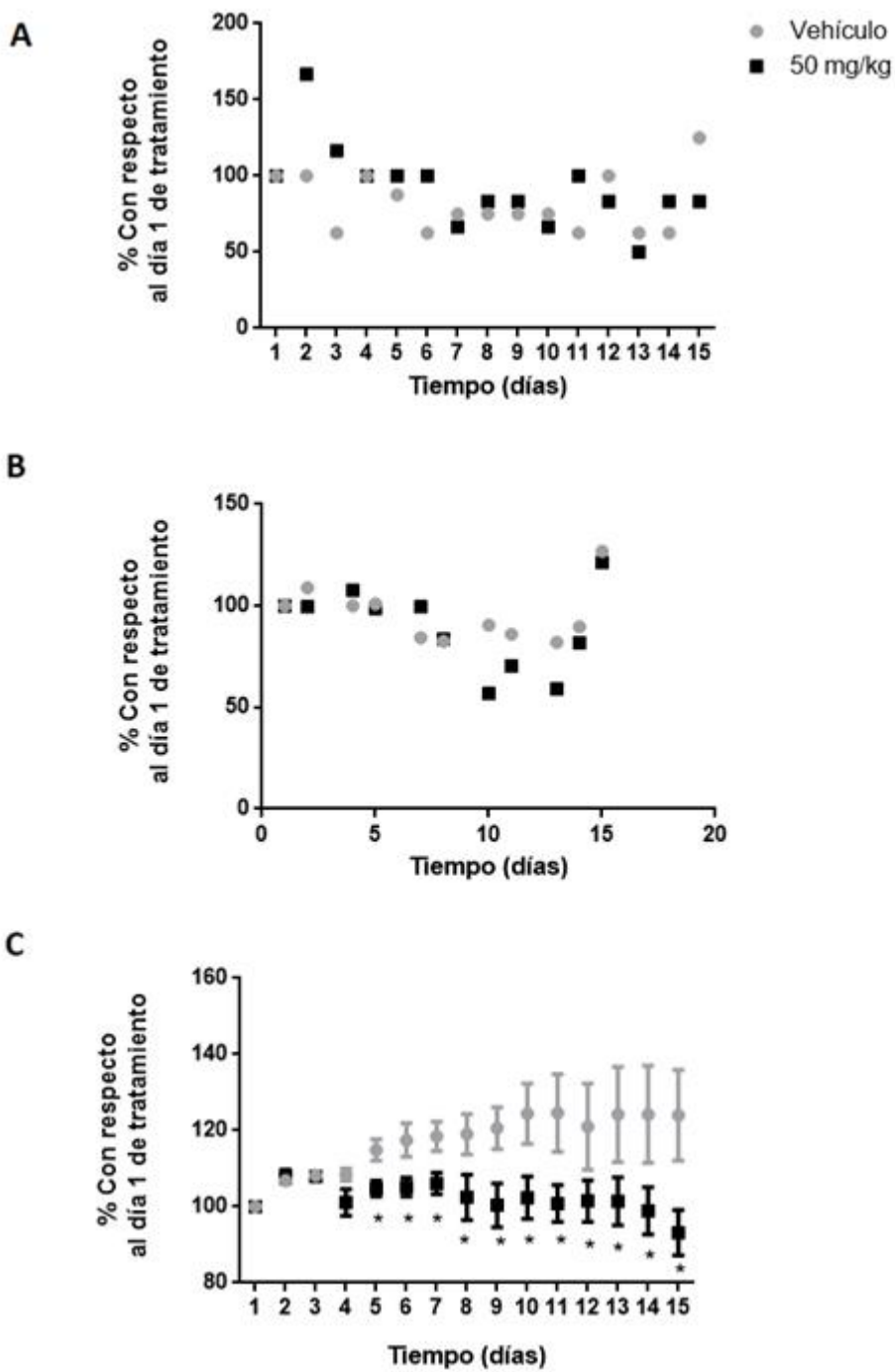


Figura 22. Parámetros fisiológicos en ratones normoglicémicos administrados con extracto metanólico de *E. menziesii* 50mg/kg. A. Consumo de alimentos, B. Consumo de agua, C. peso corporal. ANOVA de una vía con comparaciones múltiples, $P < 0.05$, $n = 4$.

11.6. Transporte de [³H-2DOG] *in vitro*

El extracto de *E. menziesii* incrementa el transporte de glucosa de manera similar a la insulina (hasta la concentración de 1000µg/mL), mientras que a concentraciones superiores la actividad disminuye significativamente (Figura 23 A) en células con incubación de estímulos.

El mayor incremento del transporte de glucosa se observa a la concentración de 10µg/mL de extracto metanólico de *E. menziesii* con un aumento de 170%, superando la cantidad de glucosa transportada por las células que fueron estimuladas con 1000µUI/mL de insulina.

En células sin preincubación de estímulos (Figura 23 B) se observa una tendencia dosis-respuesta directamente proporcional, llegando a un punto máximo de actividad con la concentración 100µg/mL de extracto metanólico de *E. menziesii*, no obstante a concentraciones superiores a los 100µg/mL decrece el transporte de glucosa, incluso por debajo de las células no estimuladas.

Con las concentraciones de 10 y 100µg/mL de extracto metanólico de *E. menziesii* se incrementa el transporte de glucosa 170% y 210% respectivamente, superando el incremento de 150% con 1000µUI/mL de insulina.

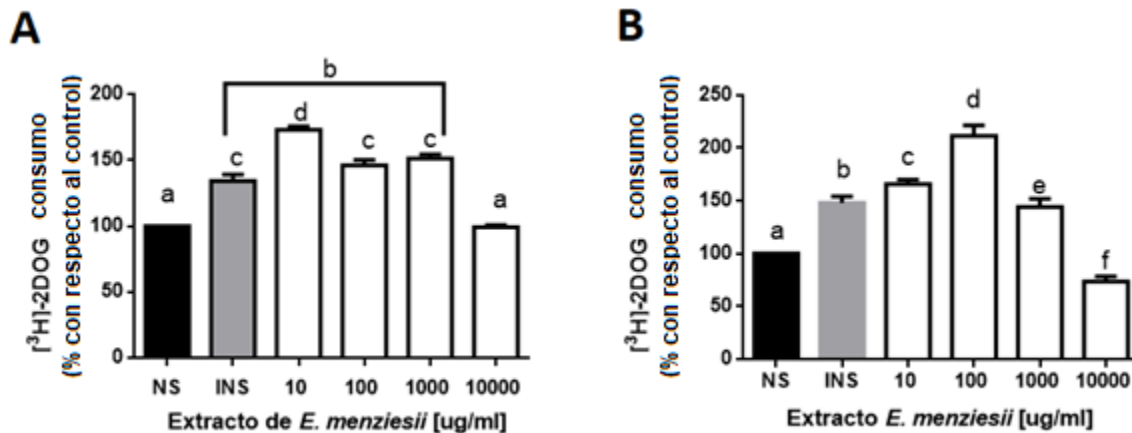


Figura 23. Evaluación del transporte de glucosa *in vitro* con la administración del extracto metanólico de *E. menziesii*. A. Preincubación de estímulos 30min, tiempo de captura 30min. B. Sin preincubación de estímulos, tiempo de captura 30min NS: no estimulado, INS: insulina 100µUI/ml, 2.5mM de glucosa y 5µL de [³H-2DOG], ANOVA de una vía con comparaciones múltiples, p<0.05, n=4, promedio±SEM.

Al comparar el transporte de glucosa bajo las condiciones i) preincubación de estímulos 30min y ii) sin preincubación, se observó que es significativo el incremento del transporte de glucosa en la condición de sin preincubación con respecto al de preincubación, por lo tanto en los posteriores experimentos se utilizó solo dicha condición.

Con base en los resultados obtenidos (Figura 24) seleccionamos las concentraciones de 10 y 100µg/mL debido a que el incremento en el transporte de glucosa es mayor, y proseguimos a evaluar el tiempo al cual dicha concentración promovía el transporte de glucosa.

Los resultados se observan en la figura 24 A, en donde observamos que el incremento en el transporte de glucosa con la concentración de 10µg/mL de extracto metanólico se lleva a cabo a los 30 y 60 min de incubación, obteniendo un incremento del 114 y 355% respectivamente; mientras que con la concentración de 100µg/mL (Figura 24 B) de extracto metanólico el transporte de glucosa incrementa a partir de los 5 min de incubación y se mantiene con la misma intensidad ≈800% hasta los 30 min de evaluación de la captura.

A los 60 min de captura el transporte de glucosa disminuyó a 420% (Figura 24 B); lo anterior coincide con lo observado en la figura 23, en donde hay un punto de saturación ya sea por concentración o por tiempo.

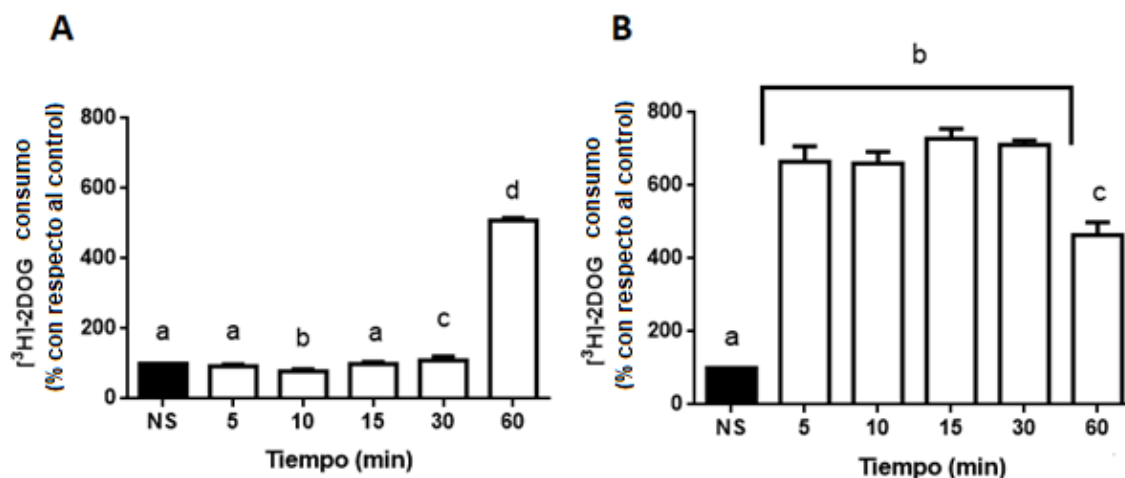


Figura 24. Curva temporal del transporte de glucosa *in vitro* con la administración del extracto metanólico de *E. menziesii*. A. 10 µg/mL de extracto metanólico B. 100 µg/mL de extracto metanólico, NS: no estimulado, INS: insulina 100µUI/mL, 2.5 mM de glucosa y 5 µL de [^3H -2DOG], ANOVA de una vía con comparaciones múltiples, $p < 0.05$, $n = 4$, promedio \pm SEM.

11.7 Contenido de polifenoles

En 50mg de extracto metanólico de *E. menziesii* 1.58mg (3.16%) corresponden a polifenoles, en el clorofórmico 0.63mg (1.25%), y el hexánico muestra ausencia de estos (Tabla 8).

Tabla 8. Cantidad de polifenoles en los extractos de *E. menziesii*, mediante el método de Folin-Ciocalteu.

Extracto (50mg)	Polifenoles (mg)	Porcentaje %
Metanólico	1.58	3.16
Hexánico	0	0
Clorofórmico	0.63	1.25

11.8 Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro*

La actividad antioxidante se evaluó mediante la determinación de la capacidad de atrapamiento del radical DPPH, ya que se ha reportado que los compuestos como polifenoles son los implicados en actividad antioxidante. Basándonos en dicho argumento seleccionamos evaluar solo el extracto metanólico de *E. menziesii*, del cual se obtuvo un 27.52% de neutralización (Tabla 9).

Tabla 9. Evaluación de la actividad antioxidante mediante la evaluación de la capacidad atrapadora del DPPH

Extracto (50mg)	Porcentaje (%)
Metanólico	27.52 ± 0.16

10. DISCUSIÓN

Las algas marinas son organismos acuáticos que viven en hábitats complejos, en donde son sometidas constantemente a condiciones ambientales extremas y, para sobrevivir deben adaptarse rápidamente. El proceso de adaptación acontece mediante la activación bioquímica de diversas vías de señalización produciendo una gran variedad de metabolitos secundarios que no se encuentran en las plantas terrestres, algunos de ellos al ser evaluados se les han adjudicado un gran número de actividades biológicas [67].

Para identificar si el alga marina *Egregia menziesii* posee actividad hipoglucemiante de la misma manera que *E. cava*, *E. bicyclis*, y *E. stolonifera*, especies de la familia *Lessoniaceae* [34], obtuvimos extractos orgánicos (metanólico, clorofórmico, hexánico) de *E. menziesii*. Los resultados demostraron que el extracto metanólico presentó un mayor rendimiento, seguido del clorofórmico y el hexánico. Este patrón en el rendimiento de la extracción está directamente vinculado a la polaridad de los mismos. El metanol presenta un índice de polaridad P´5.1, el cual permite que la mayoría de los compuestos estructurales de las algas marinas sean solubles en él, seguido del cloroformo con P´4.1 y por último el hexano P´0.1 [34], la selección de estos solventes nos permitió abarcar una gama amplia de estructuras químicas, debido a la regla “lo similar disuelve a lo similar”.

Posteriormente correspondió la evaluación de la acción tóxica de los extractos del alga *E. menziesii*, ya que es indispensable a fin de considerarlo a futuro como un tratamiento seguro; ello incluye la evaluación de la toxicidad intrínseca del alga marina y de los efectos agudos de dosis excesivas. En la actualidad existe una tendencia encaminada a sustituir el uso de los animales de laboratorio en pruebas toxicológicas, debido a los altos costos y el sufrimiento causado a los animales en estas pruebas [55,68]. Una de las tecnologías de vital importancia para el descubrimiento y desarrollo de nuevos productos de origen natural son los ensayos biológicos o bioensayos. En la última década, se han incorporado algunos ensayos de gran utilidad y eficacia que requieren pequeñas cantidades de muestras, resultan baratos, fáciles de utilizar, y permiten evaluar de una forma rápida la bioactividad de extractos crudos y de fracciones, conduciendo con seguridad a los principios activos y descartando todo lo que no sea de interés [69]. Uno de los bioensayos más utilizados es el ensayo de *Artemia salina*. Este es un ensayo general, de amplio uso para determinar el efecto letal de los materiales en nauplios de *A. salina*, ya que es muy sensitivo a una variedad de sustancias y puede considerarse un bioensayo útil, rápido y simple para predecir la toxicidad de extractos de algas marinas [55].

El extracto metanólico del alga *E. menziesii* en el modelo de *A. salina* mostró una $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$, considerándose no tóxico, mientras que los extractos hexánico y clorofórmico mostraron actividad citotóxica con una CL_{50} en el rango de 100 a 200 $\mu\text{g/mL}$, de la misma manera que el ácido ascórbico (control positivo), se consideraron tóxicos.

Análisis en otras especies de algas marinas utilizando el modelo de *A. salina* [70,71] han mostrado que de la misma manera que *E. menziesii* los extractos metanólicos son no tóxicos, mientras que los extractos hexánicos y clorofórmicos son tóxicos. Este patrón nos permite deducir que hay compuestos poco polares en común entre las algas marinas con actividad tóxica.

Una vez obtenido el dato de la evaluación de toxicidad *in vivo* se evaluó el efecto tóxico de los extractos de *E. menziesii in vitro* en dos linajes celulares i) linfocitos humanos, ii) Fibroblastos 3T3-L1 (línea celular). Los modelos se eligieron de acuerdo a lo siguiente:

i) Los linfocitos son las células efectoras del sistema inmunológico, en la DM Tipo 1 y 2 el sistema inmunológico se ve alterado promoviendo inflamación, particularmente en la DM Tipo 1 hay una inflamación aguda en el páncreas, mientras que en DM Tipo 2 se presenta una inflamación sistémica, lo cual está relacionado con la etiología diabética y con las consecuencias de la patología [59,72]. Los resultados indican que el extracto metanólico no disminuyó la viabilidad de los linfocitos a la concentración más alta evaluada (500 $\mu\text{g/mL}$), obteniendo una $CI_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$, por lo cual se puede clasificar como no tóxico, dicho resultado sugiere que el extracto metanólico de *E. menziesii* en caso de utilizarse como tratamiento y/o complemento en la tratamiento diabética no afectaría a las células linfocíticas de los pacientes, lo cual retrasaría y/o impediría algunas de las complicaciones diabéticas. Los extractos hexánico y clorofórmico en el modelo de linfocitos humanos obtuvieron una CI_{50} 50-100 $\mu\text{g/mL}$ por lo cual se consideran modernamente tóxicos.

ii) Al evaluar la toxicidad de los extractos del alga *E. menziesii* en la línea celular de fibroblastos 3T3-L1, el extracto metanólico en este modelo mostró un comportamiento no tóxico con una $CI_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ aun con un tiempo de incubación más largo (72 h), mientras que los extractos hexánico y clorofórmico fueron tóxicos con una $CI_{50} \approx 10 \mu\text{g/mL}$ en ambos casos. Seleccionamos la línea celular 3T3-L1 debido a que presenta el sistema bioquímico de receptor de insulina-transportador Glut4 [21], el cual se ve afectado en la Diabetes II [59]. La activación de este sistema es considerado uno de los principales mecanismos moleculares de acción de los compuestos antidiabéticos. El identificar el

comportamiento toxicológico de los extractos de *E. menziesii* en esta línea celular nos permite evaluar el comportamiento de los extractos en un modelo especializado en transporte de glucosa.

Aunado a lo anterior, la obesidad se ha descrito como uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de la DM, además de que en esta condición existe un estado de estrés oxidativo, el cual se ha asociado directamente con la resistencia a la insulina. La línea celular 3T3-L1 tiene la capacidad de diferenciarse en adipocitos y con el fin de evaluar el comportamiento de los extractos de *E. menziesii* en un linaje de adipocitos, utilizamos esta línea celular en forma diferenciada.

La forma adipocita de la línea celular 3T3-L1 resultó ser sensible a las diferentes concentraciones de los extractos metanólico, hexánico y clorofórmico, induciendo un decremento en la viabilidad celular. Particularmente con el extracto metanólico este decremento en la viabilidad se considera tóxico hasta las 48 y 72 h de incubación; mientras que en el caso de los extractos hexánico y clorofórmico se consideran tóxicos desde las 24 h de incubación. Cabe resaltar que no hay diferencia significativa entre los valores de las IC₅₀ de ambos extractos, lo anterior abre la posibilidad de que sea un grupo químico similar el que esté actuando inhibiendo el metabolismo de los adipocitos.

Particularmente el extracto metanólico del alga *E. menziesii* tiene un efecto tóxico en adipocitos sin dañar a fibroblastos, esto se puede considerar como un efecto adipocito selectivo, lo cual abriría la posibilidad de una actividad hipolipémica y/o antiobésica. De hecho este tipo de bioactividades se ha reportado en otras algas marinas marrón. Un ejemplo es el extracto de *Laminaria japónica* que en la línea celular 3T3-L1 inhibió a C/EBP- α/β y PPAR- γ , dando un efecto antiobésico [73–75]. Algo similar se observó también con el alga *Sargassum thunbergii* en la línea celular 3T3-L1, en donde ésta inhibió la adipogénesis mediante la activación de AMPK [76]. En definitiva una de las perspectivas de este proyecto es evaluar la actividad antiobésica del extracto metanólico de *E. menziesii*.

Es claro que el extracto metanólico de *E. menziesii* fue no tóxico en las pruebas *in vivo* e *in vitro*, por lo tanto, fue lo considerado apto para evaluar con él la actividad antihiperglicémica. Los resultados de los ensayos de toxicidad además de permitirnos realizar una bioselección de extracto, nos permitieron calcular la concentración de extracto a utilizar en las determinaciones de la actividad antidiabética.

Al evaluar el extracto metanólico de *E. menziesii* en un modelo de hiperglicemia *in vivo*, observamos un decremento en la concentración de glucosa de los grupos administrados con el extracto de *E. menziesii*, específicamente a la concentración de 50mg/kg obtuvimos un decremento en los niveles de glucosa del mismo modo que el grupo administrado con el fármaco metformina (250mg/kg), no obstante la diferencia en la concentración para observar dicho efecto hipoglucemiante es cinco veces mayor en el caso de la metformina con respecto al extracto del alga *E. menziesii*. Esto nos permite inferir que el extracto metanólico de *E. menziesii* es más efectivo disminuyendo los niveles de glucosa periféricos. Este decremento en la concentración de glucosa en modelos *in vivo* se ha visto en otras algas marinas como es *E. cava*, en donde el extracto metanólico de esta alga a una concentración de 300mg/kg disminuyó los niveles de glucosa en un modelo de ratón hiperglicémico (inducido con estreptozotocina) [48]. Cabe resaltar que las algas *E. cava* y *E. menziesii* se clasifican taxonómicamente en la misma familia, ambas tienen la capacidad de disminuir la concentración de glucosa en sangre periférica *in vivo*, pero el extracto de *E. menziesii* lo hace a una concentración 6 veces menor (50mg/kg) que el extracto metanólico de *E. cava*; lo cual demuestra que el extracto de *E. menziesii* es más efectivo como antidiabético, no solo con respecto al extracto de *E. cava*, sino en comparación con el fármaco metformina.

Con respecto a los parámetros fisiológicos (ingesta de alimento, agua y peso corporal) no encontramos una diferencia entre los grupos evaluados. No obstante el bienestar (parámetro no medible) de los individuos tratados con el extracto metanólico de *E. menziesii* en comparación del grupo tratado con vehículo era evidente.

Los fármacos utilizados en el tratamiento diabético tienen diversos efectos secundarios, uno de los principales es la hipoglucemia. Por esta razón evaluamos el extracto metanólico de *E. menziesii* a la concentración que resultó tener la mayor actividad disminuyendo los niveles de glucosa en un modelo de ratón hiperglicémico (50mg/kg), pero ahora en un modelo de ratón normoglicémico. Observamos que hay un decremento significativo en los niveles de glucosa periférica con respecto al grupo tratado con vehículo. Sin embargo dicho decremento se encuentra dentro de los parámetros fisiológicos considerados como normales en los roedores, es decir, el extracto metanólico de *E. menziesii* disminuye la concentración de glucosa periférica sin llegar a causar hipoglucemia.

Con respecto a los parámetros fisiológicos el grupo que fue administrado con el extracto metanólico se observó un decremento significativo en peso corporal (el cual se mantuvo

dentro de los parámetros fisiológicos normales). Por el contrario no hubo diferencia significativa en el consumo de agua y alimento con respecto al grupo control. Este dato resulta ser muy interesante debido a que el extracto de algas marinas podría además de controlar la hiperglicemia y ayudar al sobrepeso. Este patrón bioactivo se ha observado en otras especies de algas marinas, por ejemplo el alga *Undaria Pinnatifida*, de la cual se ha reportado que reduce los niveles de glucosa y de lípidos *in vivo* [77]. Trasladando este dato a investigaciones en poblaciones humanas, se ha reportado que las regiones en donde se consume una dieta alta en algas marinas, ha demostrado sus índices de masa corporal son menores y que tienen un menor riesgo a desarrollar DM [78,79].

Una vez identificado el efecto antidiabético del extracto metanólico de *E. menziesii* continuamos a identificar el mecanismo de acción implicado. Sabiendo de antemano que en toda reacción enzimática es necesario que la enzima y sustrato se aproximen entre sí, y que la velocidad de este mecanismo de proximidad interfiere directamente con la velocidad de la respuesta biológica (en este caso en particular la respuesta es el incremento intracelular de glucosa marcada radiactivamente), planteamos dos condiciones a evaluar la captura de glucosa una con preincubación (30 min) del extracto metanólico de *E. menziesii* y la otra sin preincubación. Observamos una mayor respuesta sin preincubación del extracto, lo cual nos indica que el mecanismo cinético de proximidad ocurre tan rápido que si se preincuba el extracto. No observamos el pico máximo de la respuesta y por dicho motivo seleccionamos la condición de sin preincubación para los posteriores experimentos.

Asimismo el experimento de evaluación de la captura de glucosa nos permitió identificar la concentración del extracto metanólico de *E. menziesii* a la que se obtiene la velocidad máxima de respuesta (10 y 100 µg/mL). Concentraciones superiores a estas muestran un decremento en la captura de glucosa intracelular denotando que el proceso enzimático implicado en la respuesta está saturado, por lo cual seleccionamos dichas concentraciones para evaluar el tiempo de respuesta.

Ya con estas características definidas, observamos que el extracto metanólico de *E. menziesii* incrementó el transporte de glucosa en la línea celular HepG2 hasta un 800% con respecto a las células no estimuladas, este resultado se obtuvo utilizando una concentración de 100 µg/mL del extracto durante 5 min de captura. Lo anterior nos muestra que la respuesta (captura de glucosa) es muy rápida, esto de entrada sugiere que el extracto metanólico de *E. menziesii* posiblemente activa la translocación de los

transportadores de glucosa sin la participación de la unión insulina-receptor de insulina. La respuesta obtenida con el extracto de *E. menziesii* pareciera más eficaz, ya que superó a la obtenida con insulina. Cabe resaltar que el extracto metanólico está conformado por cientos de compuestos químicos y probablemente uno grupo pequeño de estos son los responsables de la actividad antidiabética, si los compuestos implicados en la actividad se aislaran del resto probablemente la concentración eficaz media sería menor que la de la insulina.

El resultado de la captura de glucosa también nos permite identificar la ruta mediante la cual está actuando el extracto metanólico de *E. menziesii*, para regular la concentración de glucosa se han descrito dos vías principales de señalización: 1) La vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y 2) Vía de la fosfoinositol-3-cinasa (PI3K) [21]. La primera vía está enfocada en la regulación de la expresión génica en tejidos sensibles a la insulina; debido a que la respuesta en el transporte de glucosa con el extracto metanólico de *E. menziesii* ocurrió desde los 5min, y el proceso de regulación génica (transcripción y traducción) tiene una duración de 3 a 6 h, deducimos que el mecanismo de acción del extracto metanólico de *E. menziesii* no ocurre a través de la vía de las MAPKs cinasas [21].

La vía de señalización de PI3K es el mecanismo principal mediante el cual la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa, en esta ruta participa la proteína cinasa B (AKT). AKT regula varios de los efectos metabólicos de la insulina como la activación de la síntesis de glucógeno, la lipogénesis y la translocación de los transportadores de glucosa [48]. La translocación del transportador GLUT4 implica la activación de PI3K (a través del receptor de insulina) y de AKT [22]. Sin embargo se han descrito proteínas que convergen en ambas vías de señalización y que podrían activar AKT sin la activación de PI3K [21], es decir saltarse el paso de la unión insulina-receptor pero tener el resultado de la translocación del transportador y por consecuencia transporte de glucosa. Estas vías han sido evaluadas mediante western blot utilizando extracto metanólico del alga *E. cava* (Familia *Lessoniaceae*), en donde se observa la activación de AKT a los 5 min de la presencia del estímulo y declina a los 10 min [48]. Lo anterior coincide con los resultados obtenidos con el extracto metanólico *E. menziesii* (Familia *Lessoniaceae*), por lo cual sugerimos este como un posible mecanismo de acción, sin embargo es necesario realizar los experimentos que lo demuestren.

Se han reportado que los extractos de algas marinas con actividad antidiabética tienen los siguientes mecanismos de acción: 1) inhiben a las enzimas alfa-glucosidasa, alfa-

galactosidasa, e inhibición del factor PTP-B1, por lo cual restaría evaluar dichos blancos con el extracto metanólico de *E. menziesii*.

Eventualmente se han logrado aislar de los extractos de otras especies de algas marinas los compuestos con actividad antidiabética y en su mayoría son estructuralmente polifenólicos, particularmente en las algas marrón tienen una concentración mayor de polifenoles y tipos de polifenoles que no se encuentran en otras especies de algas [80]. En las algas marrón los polifenoles representan entre el 1% y el 10% del peso seco [43]. Para el alga marrón *Egrecia menziesii* encontramos un porcentaje total de polifenoles del 4.41%, del cual 3.16% corresponde al extracto metanólico y un 1.25% al extracto clorofórmico. Al comparar estos porcentajes con los reportados en otras especies de algas como *Ulva lactuca* (2.86%), *Turbinaria coloides* (1.23%), *Gracilaria birdae* (1.13%) [30], podemos deducir que la especie *E. menziesii* presenta un alto porcentaje de polifenoles totales, sobretodo en el extracto metanólico.

Una característica de las estructuras polifenólicas es la capacidad de atrapar radicales libres (actividad antioxidante); debido a que el extracto metanólico *E. menziesii* tiene mayor concentración de polifenoles, evaluamos en él la capacidad atrapadora de radicales libres, obteniendo un 27.52%, dicho resultado permite clasificar al extracto metanólico como un antioxidante *in vitro*. Al comparar el resultado anterior con lo reportado para otras especies de algas como *Ulva rigida* 23%, *Cystoseria barbata* 2.4%, *Ceramion diaphanon* 0.8% [81], podemos observar que la actividad de *E. menziesii* es superior, lo que permite considerar evaluarlo en modelos *in vivo*. De igual forma se ha reportado una correlación entre la actividad de captación de DPPH y la concentración de fenoles totales [81], lo cual se aprecia en el extracto metanólico de *E. menziesii*, con lo que se sugiere que los polifenoles podrían estar directamente relacionados en la actividad antioxidante.

12. CONCLUSIÓN

El extracto metanólico del alga *E. menziesii* es un excelente candidato para la búsqueda de compuestos con actividad anti-hiperglicémica, debido a que en un modelo de ratón hiperglicémico disminuyó eficazmente la concentración de glucosa y en un lapso de tiempo muy corto (5min), por lo que podría utilizarse para el control postprandial en el tratamiento diabético; además demostró que no causa hipoglucemia, que es el efecto secundario más común de los fármacos actualmente usados.

La actividad anti-hiperglicémica del extracto metanólico de *E. menziesii* se observó a concentraciones menores en comparación a lo reportado para otras algas marinas, por lo que los compuestos químicos implicados en dicha actividad podrían proveer de estructuras químicas novedosas para el tratamiento de la DM.

13. REFERENCIAS

- [1] National Diabetes Data Group. Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Other Categories of Glucose Intolerance 1979;28:1039–57.
- [2] Edition S. Diabetes. 2015. doi:10.1289/image.ehp.v119.i03.
- [3] Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research* 2010;107:1058–70. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.223545.
- [4] Rao S V, Bethel MA, Feinglos MN. Treatment of diabetes mellitus: implications of the use of oral agents. *Am Heart J* 1999;138:S334–7.
- [5] Mohamed S, Hashim SN, Rahman HA. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends in Food Science and Technology* 2012;23:83–96. doi:10.1016/j.tifs.2011.09.001.
- [6] Yuan Y V., Walsh NA. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food and Chemical Toxicology* 2006;44:1144–50. doi:10.1016/j.fct.2006.02.002.
- [7] Jung HA, Islam MN, Lee CM, Jeong HO, Chung HY, Woo HC, et al. Promising antidiabetic potential of fucoxanthin isolated from the edible brown algae *Eisenia bicyclis* and *Undaria pinnatifida*. *Fisheries Science* 2012;78:1321–9. doi:10.1007/s12562-012-0552-y.
- [8] Federation ID. Diabetes atlas. 2017.
- [9] Boulos MNK, Inform M, Gammon S, Dixon MC, Hon BAP, Macrury SM, et al. Digital Games for Type 1 and Type 2 Diabetes : Underpinning Theory With Three Illustrative Examples Corresponding Author : 2015;3:1–15. doi:10.2196/games.3930.
- [10] Helaine, Resnick BD. Diagnostic Criteria , A d v a n c i n g Age , and. *Diabetes Care*

2000;23.

- [11] Ppens MACE. Prevalence of Diabetes Complications in Adolescents With Type 2 Compared With Type 1 Diabetes 2006. doi:10.2337/dc05-2470.
- [12] Engelgau MM. Diabetes Diagnostic Criteria and Impaired Glycemic States: Evolving Evidence Base 2004;22:2003–4.
- [13] Pitozzi V, Giovannelli L, Bardini G, Maria C, Dolara P. Oxidative DNA damage in peripheral blood cells in type 2 diabetes mellitus : higher vulnerability of polymorphonuclear leukocytes 2003;529:129–33. doi:10.1016/S0027-5107(03)00114-3.
- [14] Quema ES. Metabolismo n.d.
- [15] Arraiz N, Leal E, Linares S, Mengual E, Valdelamar L, Seyfi H, et al. Biología molecular de los transportadores de glucosa : clasificación , estructura y distribución 2007.
- [16] Bermúdez V, Bermúdez F, Arraiz N, Leal E, Linares S, Mengual E, et al. Transportadores de glucosa : clasificación , estructura y distribución Sociedad Venezolana de Farmacología Clínica y Terapéutica 2007.
- [17] Cruz M, Velasco E, Kumate J. Señales intracelulares que intervienen en el control de la glucosa 2001;137.
- [18] Rodríguez-Rodríguez AE, Triñanes J, Porrini E, Velázquez-García S, Fumero C, Vega-Prieto MJ, et al. Cambios en la homeostasis de la glucosa y la proliferación de la célula beta pancreática tras el cambio a ciclosporina en la diabetes inducida por tacrolimus. Nefrología 2015;35:264–72. doi:10.1016/j.nefro.2015.05.007.
- [19] Díaz-Flores M, Baiza-Gutman LA, Ibáñez-Hernández MA, Pascoe-Lira D, Guzmán-Greenfel AM, Kumate-Rodríguez J. Aspectos moleculares del daño tisular inducido

por la hiperglucemia crónica. *Gaceta Medica de Mexico* 2004;140:437–47.

- [20] Rodríguez-rodríguez AE, Tri J, Porrini E, Velázquez-garcía S, Fumero C, Vega-prieto MJ, et al. Original article Glucose homeostasis changes and pancreatic β -cell proliferation after switching to cyclosporin in tacrolimus-induced diabetes mellitus & 2015;5:264–72. doi:10.1016/j.nefro.2015.06.006.
- [21] Olivares JA, Arellano A. Bases Moleculares de las Acciones de la Insulina. *Rev* 2008;27:9–18.
- [22] Eduardo C, Lucía M, Carolina M, Pinzón CE, Serrano ML, Sanabria MC. Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K / Akt) en humanos 2009.
- [23] Ishii M, Maeda A, Tani S, Akagawa M. Palmitate induces insulin resistance in human HepG2 hepatocytes by enhancing ubiquitination and proteasomal degradation of key insulin signaling molecules. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2015;566:26–35. doi:10.1016/j.abb.2014.12.009.
- [24] Guti C, Roura-guiberna A, Olivares-reyes A. Mecanismos Moleculares de la Resistencia a la Insulina : Una Actualización 2017:2–10.
- [25] Ramos Ibarra ML, Bautista González, Cecilia Margarita; Gómez Meda, Belinda Claudia; Zamora Pérez AL. Diabetes , estrés oxidativo y antioxidantes. *Investigación En Salud* 2006;VIII:7–15.
- [26] Bell JA, Kivimaki M, Hamer M. Metabolically healthy obesity and risk of incident type 2 diabetes : a meta-analysis of prospective cohort studies 2014:504–15. doi:10.1111/obr.12157.
- [27] De I. Diagnóstico y Tratamiento Farmacológico de la Evidencias y Recomendaciones 2018.
- [28] General H, Gonz MG. Tratamiento farmacológico para la diabetes mellitus 2002;5.

- [29] Escorcia S. Hipoglucemia por fármacos antidiabéticos 2009;17:120–8.
- [30] Barde SR, Sakhare RS, Kanthale SB, Chandak PG, Jamkhande PG. Marine bioactive agents: A short review on new marine antidiabetic compounds. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2015;5:S209–13. doi:10.1016/S2222-1808(15)60891-X.
- [31] Brownlee I, Fairclough A, Hall A, Paxman J. Dietary seaweed and human health. *Culinary Arts and Sciences VII: Global, National and Local Perspectives* 2011:82–8.
- [32] Dhargalkar V, Kavlekar D. *Seaweeds -a field manual*. Goa: National Institute of Oceanography; 2004.
- [33] Bocanegra A, Bastida S, Benedí J, Ródenas S, Sánchez-Muniz FJ. Characteristics and Nutritional and Cardiovascular-Health Properties of Seaweeds. *Journal of Medicinal Food* 2009;12:236–58. doi:10.1089/jmf.2008.0151.
- [34] Pádua D, Rocha E, Gargiulo D, Ramos AA. Phytochemistry Letters Bioactive compounds from brown seaweeds : Phloroglucinol , fucoxanthin and fucoidan as promising therapeutic agents against breast cancer. *Phytochemistry Letters* 2015;14:91–8. doi:10.1016/j.phytol.2015.09.007.
- [35] Vishchuk OS, Ermakova SP, Zvyagintseva TN. The fucoidans from brown algae of Far-Eastern seas : Anti-tumor activity and structure – function relationship. *Food Chemistry* 2013;141:1211–7. doi:10.1016/j.foodchem.2013.03.065.
- [36] Senthilkumar K, Manivasagan P, Venkatesan J. *International Journal of Biological Macromolecules* Brown seaweed fucoidan : Biological activity and apoptosis , growth signaling mechanism in cancer. *International Journal of Biological Macromolecules* 2013;60:366–74. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.06.030.
- [37] Marbà N, Krause-Jensen D, Olesen B, Christensen PB, Merzouk A, Rodrigues J, et al. Climate change stimulates the growth of the intertidal macroalgae *Ascophyllum nodosum* near the northern distribution limit. *Ambio* 2017;46:119–31.

doi:10.1007/s13280-016-0873-7.

- [38] Gutiérrez-Rodríguez AG, Juárez-Portilla C, Olivares-Bañuelos T, Zepeda RCRC. Anticancer activity of seaweeds. *Drug Discovery Today* 2018;23:434–47. doi:10.1016/j.drudis.2017.10.019.
- [39] El-din SMM, El-ahwany AMD. Bioactivity and phytochemical constituents of marine red seaweeds (*Jania rubens* , *Corallina mediterranea* and *Pterocladia capillacea*). *Integrative Medicine Research* 2016;10:471–84. doi:10.1016/j.jtusci.2015.06.004.
- [40] Wijesinghe WAJP, Jeon YJ. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. *Carbohydrate Polymers* 2012;88:13–20. doi:10.1016/j.carbpol.2011.12.029.
- [41] Osuna-ruiz I, Burgos-hernández A, Velázquez C, Nieves-soto M, Hurtado-oliva MA, Burgos-hernández A, et al. Antioxidant , antimutagenic and antiproliferative activities in selected seaweed species from 2016;0209. doi:10.3109/13880209.2016.1150305.
- [42] Lopes G, Pinto E, Andrade PB, Valentão P. Antifungal Activity of Phlorotannins against Dermatophytes and Yeasts: Approaches to the Mechanism of Action and Influence on *Candida albicans* Virulence Factor. *PLoS ONE* 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0072203.
- [43] Shi Q, Wang A, Lu Z, Qin C, Hu J, Yin J. Overview on the antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides from seaweeds. *Carbohydrate Research* 2017;453–454:1–9. doi:10.1016/j.carres.2017.10.020.
- [44] Xue M, Ge Y, Zhang J, Wang Q, Hou L, Liu Y, et al. Anticancer Properties and Mechanisms of Fucoidan on Mouse Breast Cancer In Vitro and In Vivo 2012;7:3–11. doi:10.1371/journal.pone.0043483.
- [45] Lee H, Kang C, Jung ES, Kim JS, Kim E. Antimetastatic activity of polyphenol-rich

extract of *Ecklonia cava* through the inhibition of the Akt pathway in A549 human lung cancer cells. *Food Chemistry* 2011;127:1229–36.
doi:10.1016/j.foodchem.2011.02.005.

- [46] De Jesus Raposo MF, De Morais AMB, De Morais RMSC. Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Marine Drugs* 2015;13:2967–3028. doi:10.3390/md13052967.
- [47] Lee S, Park M, Kang S, Ko S, Kang C, Cho S, et al. Dieckol Isolated from *Ecklonia cava* Protects against High-Glucose Induced Damage to Rat Insulinoma Cells by Reducing Oxidative Stress and Apoptosis Dieckol Isolated from *Ecklonia cava* Protects against High-Glucose Induced 2014;8451. doi:10.1271/bbb.120096.
- [48] Kang MC, Wijesinghe WAJP, Lee SH, Kang SM, Ko SC, Yang X, et al. Dieckol isolated from brown seaweed *Ecklonia cava* attenuates type II diabetes in db/db mouse model. *Food and Chemical Toxicology* 2013;53:294–8.
doi:10.1016/j.fct.2012.12.012.
- [49] Gabbia D, Acqua SD, Maria I, Gangi D, Bogialli S, Caputi V, et al. The Phytocomplex from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum* Controls Postprandial Plasma Glucose Levels : An In Vitro and In Vivo Study in a Mouse Model of NASH n.d.:1–12. doi:10.3390/md15020041.
- [50] MOON HE, ISLAM MN, AHN BR, CHOWDHURY SS, SOHN HS, JUNG HA, et al. Protein Tyrosine Phosphatase 1B and α -Glucosidase Inhibitory Phlorotannins from Edible Brown Algae, *Ecklonia stolonifera* and *Eisenia bicyclis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2011;75:1472–80. doi:10.1271/bbb.110137.
- [51] Wijesekara I, Yoon NY, Kim SK. Phlorotannins from *Ecklonia cava* (Phaeophyceae): Biological activities and potential health benefits. *BioFactors* 2010;36:408–14.
doi:10.1002/biof.114.
- [52] Lee SH, Jeon YJ. Anti-diabetic effects of brown algae derived phlorotannins, marine polyphenols through diverse mechanisms. *Fitoterapia* 2013;86:129–36.

doi:10.1016/j.fitote.2013.02.013.

- [53] Suganya AM, Sanjivkumar M, Chandran MN, Palavesam A, Immanuel G. Pharmacological importance of sulphated polysaccharide carrageenan from red seaweed *Kappaphycus alvarezii* in comparison with commercial carrageenan. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2016;84:1300–12. doi:10.1016/j.biopha.2016.10.067.
- [54] Kwon HJ, Bae SY, Kim KH, Han CH, Cho SH, Nam SW, et al. Induction of apoptosis in HeLa cells by ethanolic extract of *Corallina pilulifera*. *Food Chemistry* 2007;104:196–201. doi:10.1016/j.foodchem.2006.11.031.
- [55] Sánchez L, Neira A. Bioensayo General de la letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava*. L y *Psidium guineense*. *Sw. Cultura Científica* 2005:40–5.
- [56] Carballo J, Hernández Z, Pérez P, García M. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology* 2002;2:17. doi:10.1186/1472-6750-2-17.
- [57] Pour BM, Sasidharan S. In vivo toxicity study of *Lantana camara*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2011;1:230–2. doi:10.1016/S2221-1691(11)60033-6.
- [58] Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ. *Cell Viability Assays* 2016:1–31.
- [59] Abriel HÉG, Odríguez RAR, División B, Posgrado DE De. *DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL* 1994.
- [60] Etuk EU. Animals models for studying diabetes mellitus Department of Pharmacology , College of Health Sciences , Usmanu Danfodiyo University ,. *Agriculture and Biology Journal of North America* 2010;1:130–4. doi:10.1002/elps.201000583.

- [61] Kore KJ, Shete R V, Desai N V, Dnyanpeeths R. Antidiabetic activity of ethanolic leaf extract of panicum maximum. *Drug Delivery* 2011;3:260–6.
- [62] Han X, Tao Y, Deng Y, Yu J, Cai J. Metformin ameliorates insulinitis in STZ- induced diabetic mice 2017:1–13. doi:10.7717/peerj.3155.
- [63] Mendez-Flores OG, Hernández-Kelly LC, Suárez-Pozos E, Najimi M, Ortega A. Coupling of glutamate and glucose uptake in cultured Bergmann glial cells. *Neurochemistry International* 2016;98:72–81.
- [64] Rafael A, Agudelo IJ, Wagner ML. Métodos empleados en el análisis de los polifenoles en un laboratorio de baja complejidad 2015.
- [65] Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay 2011;48:412–22. doi:10.1007/s13197-011-0251-1.
- [66] Al-Fatlawi AA, Al-Fatlawi AA, Irshad M, Rahisuddin, Ahmad A. Effect of parthenolide on growth and apoptosis regulatory genes of human cancer cell lines. *Pharmaceutical Biology* 2015;53:104–9. doi:10.3109/13880209.2014.911919.
- [67] Collins K, Fitzgerald G, Stanton C, Ross R. Looking Beyond the Terrestrial: The Potential of Seaweed Derived Bioactives to Treat Non-Communicable Diseases. *Marine Drugs* 2016;14:60. doi:10.3390/md14030060.
- [68] Favilla M, Macchia L, Gallo A, Altomare C. Toxicity assessment of metabolites of fungal biocontrol agents using two different (*Artemia salina* and *Daphnia magna*) invertebrate bioassays. *Food and Chemical Toxicology* 2006;44:1922–31. doi:10.1016/j.fct.2006.06.024.
- [69] Rajabi S, Ramazani A, Hamidi M, Naji T. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015;23:1–6. doi:10.1186/s40199-015-0105-x.
- [70] Rana S, Hasan SMR, Hossain M, Das N. Cytotoxic (Brine Shrimp Lethality

Bioassay) and Antioxidant Investigation of *Barringtonia Acutangula* (L .)”
2015;6:1179–85.

- [71] Ara J, Sultana V, Ehteshamul-haque S, Qasim R, Uddin V, Borg B, et al. Cytotoxic Activity of Marine Macro-algae on *Artemia salina* (Brine Shrimp) 1999;307:304–7.
- [72] Ramachandran S, Rajasekaran A, Manisenthilkumar KT. Investigation of hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant activities of aqueous extract of *Terminalia paniculata* bark in diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2012;2:262–8. doi:10.1016/S2221-1691(12)60020-3.
- [73] Vishwanath D, Srinivasan H, Patil MS, Seetarama S, Agrawal SK, Dixit MN, et al. Novel method to differentiate 3T3 L1 cells in vitro to produce highly sensitive adipocytes for a GLUT4 mediated glucose uptake using fluorescent glucose analog. *Journal of Cell Communication and Signaling* 2013;7:129–40. doi:10.1007/s12079-012-0188-9.
- [74] Kanthimathi JCSLMS, Kuppusamy UR. Gene regulation in b -sitosterol-mediated stimulation of adipogenesis , glucose uptake , and lipid mobilization in rat primary adipocytes 2011:181–8. doi:10.1007/s12263-010-0196-4.
- [75] Ko SC, Lee M, Lee JH, Lee SH, Lim Y, Jeon YJ. Dieckol, a phlorotannin isolated from a brown seaweed, *Ecklonia cava*, inhibits adipogenesis through AMP-activated protein kinase (AMPK) activation in 3T3-L1 preadipocytes. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2013;36:1253–60. doi:10.1016/j.etap.2013.10.011.
- [76] Wang, Zhi-jiang, Wei Xu, Jian-Wen Liang, Cai-Sheng Wang YK. Effect of fucoidan on B16 murine melanoma cell melanin formation and apoptosis 2017;14:149–55.
- [77] Tanemura Y, Yamanaka-okumura H, Sakuma M, Nii Y, Taketani Y, Takeda E. Effects of the intake of *Undaria pinnatifida* (Wakame) and its sporophylls (Mekabu) on postprandial glucose and insulin metabolism 2014;61.
- [78] Nanri A, Mizoue T, Shimazu T, Ishihara J, Takachi R, Noda M, et al. Dietary

patterns and all-cause, cancer, and cardiovascular disease mortality in Japanese men and women: The Japan public health center-based prospective study. PLoS ONE 2017;12:1–15. doi:10.1371/journal.pone.0174848.

- [79] Nelson SM, Gao Y-T, Nogueira LM, Shen M-C, Wang B, Rashid A, et al. Diet and biliary tract cancer risk in Shanghai, China. PLOS ONE 2017;12:e0173935. doi:10.1371/journal.pone.0173935.

- [80] Laurienzo P. Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: An overview. Marine Drugs 2010;8:2435–65. doi:10.3390/md8092435.

- [81] Athukorala Y, Kim KN, Jeon YJ. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. Food and Chemical Toxicology 2006;44:1065–74. doi:10.1016/j.fct.2006.01.011.