



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

PARÁMETROS CLÍNICOS, MICROBIOLÓGICOS
E INMUNOLÓGICOS EN EL MODELO DE RATAS
CON DIABETES MELLITUS TRATADAS CON
MICROALGAS MARINAS

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biotecnología)

P r e s e n t a

Karla Janette Nuño Anguiano

La Paz, Baja California Sur, Julio de 2013

Comité tutorial

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Co-director de tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dra. Angélica Villarruel López

Co-directora de tesis

Universidad de Guadalajara, CUCEI

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Co-tutora

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dra. María Antonia Guzmán Murillo

Co-tutora

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Enrique Romero Velarde

Co-tutor

Universidad de Guadalajara, CUCS

Jurado de examen

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Dra. Angélica Villarruel López

Dra. Thelma Castellanos Cervantes

Dra. María Antonia Guzmán Murillo

Dr. Enrique Romero Velarde

Suplentes

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Angel Isidro Campa Córdova

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Resumen

Las microalgas contienen compuestos biológicamente activos con potencial aplicación en alimentos funcionales o como nutraceutico, lo cual podría ayudar en el control metabólico de diabetes mellitus. El objetivo de este estudio fue conocer los efectos clínicos, microbiológicos e inmunológicos del consumo de dos microalgas marinas en un modelo en ratas con diabetes mellitus. El estudio se llevó a cabo en dos fases. En la primera se utilizaron las microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oculata* para conocer sus efectos sobre glucosa, peso corporal, lípidos, lipoproteínas, compuestos nitrogenados, microbiota y cambios histopatológicos de intestino en ratas diabéticas y no diabéticas durante ocho semanas. Las microalgas fueron cosechadas por centrifugación. En la prueba preliminar de dosis letal no se observó toxicidad aguda en las dosis utilizadas. Las microalgas disminuyeron el peso corporal de los animales. El grupo diabético tratado con *I. galbana* mostró disminución de los valores de glucosa, triglicéridos y colesterol, así como un incremento en el recuento de bacterias ácido lácticas (*BAL*) y signos menores de inflamación intestinal. El grupo diabético tratado con *N. oculata* no mostró cambios en valores clínicos, presentaron disminución en el recuento de *BAL* y daño intestinal. Ambas microalgas incrementaron la lipoproteína de baja densidad y disminuyeron la lipoproteína de alta densidad.

En la segunda fase del estudio fue seleccionada *I. galbana*. La microalga fue cosechada por floculación con hidróxido de sodio. Se evaluó el efecto sobre glucosa, hemoglobina glucosilada, lípidos, lipoproteínas, biota intestinal, cambios histopatológicos de intestino, hígado y riñón, parámetros inmunológicos como TNF α , IL6, Leptina y GLP-1, además de la expresión génica a nivel hepático en ratas diabéticas y no diabéticas tratadas durante 14 semanas. El contenido de nutrimentos de *I. galbana* fue alterado debido a la floculación. El consumo de la microalga disminuyó el peso corporal en sujetos sanos y lo mantuvo en los sujetos enfermos. La glucosa y hemoglobina glucosilada no mostraron diferencias estadísticas. Los animales diabéticos tratados con microalga incrementaron el recuento de *BAL* y disminuyeron las enterobacterias. Se observaron diferencias en el tipo de *BAL* entre

grupos. No se reportó daño histológico en intestino, hígado o riñón en los animales tratados con la microalga. Se observaron cambios en los parámetros inmunológicos y sobre la expresión de genes hepáticos relacionados con metabolismo.

Palabras clave: *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis oculata*, diabetes mellitus.

Dr. Felipe Ascencio Valle

VoBo

Abstract

Microalgae contain biologically active compounds with potential applications in functional foods and nutraceuticals which could help in the metabolic control of diabetes mellitus. The objective of the study was to know the effects of consumption of two marine microalgae on diabetic rats. This study was done in two phases. In the first phase were used the microalgae *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oculata* to know the effects on glucose, body weight, lipids, lipoproteins, nitrogen compounds, intestine biota and gastrointestinal histopathology in a diabetic and non-diabetic rat model during eight weeks. These microalgae were harvested by centrifugation. At preliminary lethal dose test was no observed acute toxicity from the microalgae at the tested doses. In the randomized biological model, the microalgae produced weight loss on the animal. The *I. galbana* diabetic group exhibited decreased glucose, triacylglycerol and cholesterol values, as well as higher lactic acid bacteria (*LAB*) counts and only minor signs of intestinal inflammation. The *N. oculata* diabetic group exhibited no changes in clinical values, a lower *LAB* counts and intestinal damage. Both microalgae increased low density lipoproteins and decreased high density lipoproteins in healthy and diabetic rats.

In the second phase of the study was selected *I. galbana*. The microalga was harvested by flocculation with sodium hydroxide. It was evaluated its effect on body weight, glucose, glycosylated hemoglobin, lipids, lipoproteins, intestinal biota, gastrointestinal, hepatic and renal histopathology changes, immunological parameters such like, TNF α , IL6, Leptine and GLP-1, and hepatic gene expression in diabetic and non-diabetic rats treated during fourteen weeks. *I. galbana* nutrimental levels were altered by the flocculation. Microalga consumption decreased body weight in healthy subjects while it remained constant in diabetic rats. Glucose and glycated hemoglobin showed no statistical difference between diabetic groups. Diabetic animals treated with microalgae increased lactic acid bacteria (*LAB*) enumeration and decreased enterobacteria. There were differences in the type of *LAB* between groups. No histological damage was observed in the intestine, liver or kidney

in animals treated with microalgae. There were changes in immunological parameters and hepatic genes related with metabolism.

Key word: *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis oculata*, diabetes mellitus.

DEDICATORIA

A mi esposo, por siempre creer en mí y apoyarme en el camino

A mis padres, por su amor en cada

etapa de mi vida.

A mi hermano, siempre juntos,

mi amigo de toda la vida

*A Angélica, porque hay investigadores
que te enseñan más de vida que definiciones*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado para la realización del doctorado.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, al personal docente y de apoyo por las facilidades prestadas durante mi trabajo académico.

Quiero expresar mi gratitud al Dr. Felipe Ascencio, Dr. Enrique Romero, Dra. Tony Guzmán y Dra. Thelma Castellanos por su apoyo y tiempo durante este camino.

Agradezco a la Fundación Samuel Joaquín Flores por el apoyo económico y moral brindado para la elaboración de este proyecto.

Así mismo agradezco al biólogo marino y técnico del laboratorio de biotecnología marina H. Latisnere Barragán, al M. en C. y técnico R. Rebollar del laboratorio de cromatografía, al técnico Ángel Carrillo del laboratorio de ecología molecular microbiana y al personal del laboratorio de alimento vivo del CIBNOR por la asesoría técnica.

A la Dra. Maurilia Rojas, Dr. Juan Manuel Pacheco, Dr. Marco Cadenas y la bióloga marina Elizabeth de la Universidad Autónoma de Baja California Sur por su amistad y gran ayuda durante la parte más difícil de este proyecto.

Al M. en C. Arturo Sierra Beltrán del laboratorio de proteómica del CIBNOR, la M. en C. Lorena Godoy y la Dra. Ana Graciela Pérez Mora de la Universidad de Guadalajara por su ayuda académica.

Agradezco de gran manera a la Dra. Ana María Puebla por haberme brindado su apoyo, tiempo y enseñanza durante el proceso de doctorado.

A mis amigos cibeños Coy, Natalia, Toño, Hever, David, Rafa, Martita, Esteban y Rosi que me hicieron sentir acompañada y querida durante mi estancia en la Paz.

Agradezco a mis compañeritas de laboratorio Esthercita, Olga, Katy, Luzvy, Norma y Ale por su ayuda, apoyo, amistad y divertidos ratos juntas.

CONTENIDO

	Página
Introducción	1
Antecedentes	3
Justificación	13
Objetivos	14
Hipótesis	15
Material y Métodos	16
• Obtención de la microalga	17
• Análisis bromatológico y microbiológico	17
• Determinación de dosis letal 50	18
<i>Ensayo biológico preliminar</i>	
• Inducción de hiperglucemia.	19
<i>Ensayo biológico primera fase</i>	
• Determinación de peso corporal de ratas	21
• Obtención de valores de glucosa, lípidos y compuestos nitrogenados en sangre	21
• Análisis histopatológico	22
• Cuantificación de bacterias ácido lácticas (BAL)	22
• Identificación de enterobacterias	23
<i>Ensayo biológico segunda fase</i>	
• Obtención de la microalga	25
• Análisis bromatológico	25
• Determinación de grupos de estudio	25
• Determinación de peso corporal	26
• Obtención de glucosa, lípidos y lipoproteínas	26
• Determinación de hemoglobina glucosilada	26
• Cuantificación e identificación de BAL	26
• Cuantificación e identificación de enterobacterias	27
• Análisis histopatológico	27
• Determinación de TNF α , IL6, Leptina y GLP-1	27
• Microarreglo de hígado de rata	27
• PCR tiempo real	28
• Análisis estadístico	29
• Consideraciones éticas	29
Resultados	
<i>Primera etapa</i>	
• Análisis microbiológico	30
• Análisis bromatológico	30

• Contenido de ácidos grasos	30
• Dosis letal 50 (DL ₅₀)	32
<i>Ensayo biológico preliminar</i>	32
<i>Ensayo biológico primera fase</i>	33
• Peso corporal	33
• Glucosa sérica	34
• Lípidos y lipoproteínas	35
• Compuestos nitrogenados	38
• Análisis histopatológico	38
• Cuantificación e identificación de BAL	41
• <i>Enterobacteracea</i>	42
<i>Segunda etapa</i>	
<i>Ensayo biológico segunda fase</i>	43
• Análisis microbiológico	43
• Análisis bromatológico	43
• Peso corporal	45
• Glucosa sérica y hemoglobina glucosilada	46
• Lípidos y lipoproteínas	47
• Histopatológicos	49
• Recuento e identificación de BAL	50
• Recuento e identificación de enterobacterias	51
• Factor de necrosis tumoral alfa, IL6, Leptina y GLP-1	52
• Microarreglo de hígado de rata	55
• PCR tiempo real	62
Discusión	63
Conclusiones	78
Literatura citada	79

Lista de Figuras	Página
Figura 1. Familia de ácidos grasos poliinsaturados	7
Figura 2. Eicosanoides derivados de los ácidos grasos poliinsaturados	8
Figura 3. Esquema general de metodología	16
Figura 4. Esquema general de la primera fase del bioensayo	20
Figura 5. Esquema general de la segunda fase del bioensayo	24
Figura 6. Peso corporal de grupos diabéticos y grupo control	33
Figura 7. Concentración de glucosa de grupos diabéticos y grupo	35
Figura 8. Concentración de lípidos y lipoproteínas de los grupos de estudio	37
Figura 9. Efectos del consumo de microalgas en secciones de intestino delgado	39
Figura 10. Imágenes macroscópicas de intestino delgado de ratas diabéticas tratadas con microalgas	40
Figura 11. Recuento de bacterias ácido lácticas de los grupos de estudio	41
Figura 12. Agrupamiento de enterobacterias de los grupos de estudio	42
Figura 13. Peso corporal de grupos de estudio a lo largo del tiempo	45
Figura 14. Glucosa de grupos de estudio a lo largo del tiempo	46
Figura 15. Valores de lípidos y lipoproteínas de los grupos de estudio	48
Figura 16. Efectos del consumo de <i>Isochrysis galbana</i> en el grupo diabético en secciones de intestino, hígado y riñón	49
Figura 17. Recuento de bacterias ácido lácticas de los grupos de estudio	50
Figura 18. Proporción de bacterias ácido lácticas en los diferentes grupos de estudio	51
Figura 19. Recuento de enterobacterias de los grupos de estudio	52
Figura 20. Valores de factor de necrosis tumoral alfa e interleucina 6 de los grupos de estudio	53
Figura 21. Valores de Leptina y GLP-1 (pg/ml) de los grupos de estudio.	54
Figura 22. Verificación de ARN de hígado de grupo diabético con tratamiento de <i>Isochrysis galbana</i> y marcador de peso molecular de hígado de ratón.	55

Figura 23. Fragmento de microarreglo de hígado de rata.	55
Figura 24. Análisis de genes de microarreglo de hígado de rata con puntaje $z > 2$	56
Figura 25. Gráfico de Venn con analogía en expresión génica entre grupos diabético sin tratamiento, diabético tratado con <i>Isochrysis galbana</i> y grupo sano tratado con <i>I. galbana</i>	57
Figura 26. Gráfico de Venn con analogía de genes relacionados con metabolismo de macronutrientes entre el grupo sano tratado con <i>Isochrysis galbana</i> y el grupo diabético con <i>I. galbana</i>	58
Figura 27. Expresión de los genes <i>Preprorelina</i> y <i>APOA-IV</i> determinados por PCR tiempo real en ratas sanas tratadas con la microalga <i>Isochrysis galbana</i>	62
Figura 28. Metabolismo lipídico regulado por la apolipoproteína A-IV	76

Lista de Tablas	Página
Tabla I. Clasificación de diabetes de acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes (ADA)	4
Tabla II. Algas de mayor uso en acuicultura	10
Tabla III. Dosis de <i>I. galbana</i> y <i>N. oculata</i> utilizadas para la determinación de la DL ₅₀	18
Tabla IV. Diseño experimental del ensayo preliminar biológico	19
Tabla V. Grupos de estudio de bioensayo primera fase	21
Tabla VI. Grupos de estudio de bioensayo segunda fase	26
Tabla VII. Composición proximal (% peso seco) de <i>Isochrysis galbana</i> y <i>Nannochloropsis oculata</i>	30
Tabla VIII. Contenido de ácidos grasos (mg/g) de <i>Isochrysis galbana</i> y <i>Nannochloropsis oculata</i>	31
Tabla IX. Composición proximal (% peso seco) de <i>Isochrysis galbana</i>	43
Tabla X. Contenido de ácidos grasos (mg/g) de <i>Isochrysis galbana</i> cosechada por floculación-NaOH	44
Tabla XI. Porcentaje de sales de <i>Isochrysis galbana</i> por cada 100g de muestra	44
Tabla XII. Genes de relevancia en el grupo sano tratado con <i>Isochrysis galbana</i>	60
Tabla XIII. Genes de relevancia en el grupo diabético tratado con <i>Isochrysis galbana</i>	61

Lista de Anexo	Página
<hr/>	
<i>Anexo I. Artículo primer bioensayo</i>	
K. Nuño, A. Villarruel López, A.M. Puebla-Pérez, E. Romero-Velarde, A.G. Puebla-Mora, F. Ascencio. 2013. Effects of the marine microalgae <i>Isochrysis galbana</i> and <i>Nannochloropsis oculata</i> in diabetic rats. <i>JFF</i> , 5:106-115	95
<i>Anexo II. Artículo segundo bioensayo.</i>	
Nuño K., Villarruel-López A., Puebla-Mora A.G., Pacheco-Vega J.M., Ascencio, F. Consumption effects of <i>Isochrysis galbana</i> biomass harvested by a high- pH flocculation procedure on alloxan-induced diabetic rats. <i>Int J Food Sci Nutr. Sometido</i>	

1. INTRODUCCION

Diabetes mellitus es una enfermedad crónica degenerativa caracterizada por hiperglucemia, la cual es resultado de un desequilibrio en la secreción o acción de la insulina y que afecta el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. El control de la hiperglucemia es el principal objetivo del tratamiento multidisciplinario del paciente diabético. En dicho tratamiento, la intervención nutricional juega un papel importante en la disminución de la glucosa sanguínea y así prevenir o controlar las complicaciones micro y macrovasculares. La inclusión dietética de alimentos funcionales o compuestos bioactivos derivados de plantas u otras fuentes tales como fibra dietética y ácidos grasos poliinsaturados, proporcionan efectos benéficos al paciente diabético ya sea a nivel gastrointestinal favoreciendo el crecimiento o actividad de las bacterias ácido lácticas, disminuyendo peso corporal, regulando procesos inflamatorios o disminuyendo resistencia a la insulina, entre otras actividades (Liu et al., 2007)

Se ha reportado que tales compuestos bioactivos se encuentran en las microalgas de origen marino, sin embargo varían la cantidad y tipo de acuerdo a la microalga y condiciones de cultivo (Stengel et al., 2011). De forma general, las microalgas marinas contienen 50-70% de proteínas, 30% de lípidos, 5-23% de carbohidratos y 8-14% de caroteno, pigmentos y vitaminas del complejo B así como del tipo E, K y D (Avagyan, 2010; Brown et al., 1997)

Debido a lo anterior el potencial de uso de las microalgas marinas en el mercado de la salud ha incrementado su producción para comercialización, aunque son pocas las especies cuyas propiedades benéficas han sido investigadas en esta área. Algunas de las algas utilizadas en la industria han sido *Spirulina plantesis* (actividad antioxidante, disminución de peso corporal y efectos hipocolesterolémicos), *Chlorella vulgaris* (contenido de proteínas y posible nutraceutico en pacientes con síndrome de intestino corto), *Dunaliella salina* (concentración de proteínas y pigmentos) y *Porphyridium* sp. (fibra dietética, polisacáridos sulfatados, efectos benéficos gastrointestinales y metabolismo lipídico (Dvir et al., 2000, Salman et al., 2007).

Otras microalgas contienen dichos compuestos en altas cantidades, no obstante mayor número de investigaciones son necesarias antes de comercializarse. Ejemplo de ello es *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oculata*, conocidas por tener gran cantidad de polisacáridos solubles e insolubles así como porcentajes significativos de ácidos grasos poliinsaturados. Siendo *I. galbana* quien posee mayor cantidad del ácido graso omega-3 docosahexaenoico (DHA), mientras que *N. oculata* contiene un porcentaje mayor del ácido graso omega-3 eicosapentaenoico (EPA) (Brown, et al., 1997; Reboloso-Fuentes *et al.*, 2001).

En pacientes diabéticos, dichos polisacáridos y ácidos grasos pueden ayudar en la regulación de glucosa, metabolismo lipídico, compuestos nitrogenados, repuesta inmunológico así como incrementar las bacterias benéficas al intestino, contribuyendo en la modulación de la disfunción de la mucosa y epitelio intestinal. Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo conocer el efecto de los compuestos bioactivos de las microalgas *I. galbana* y *N. oculata* como parte del tratamiento nutrimental en un modelo biológico con diabetes mellitus.

2. ANTECEDENTES

Diabetes mellitus es una enfermedad crónico-degenerativa que se caracteriza por la elevación de glucosa en sangre como resultado de un defecto en la secreción de insulina, su acción o ambas. Anteriormente, la diabetes se dividía en dos grupos respecto al uso de insulina como tratamiento, en insulino-dependiente e insulino-independiente, sin embargo causaba confusión, lo que propició que se propusiera una nueva clasificación en cuatro grupos: diabetes mellitus tipo 1, diabetes mellitus tipo 2, el grupo III en donde se presentan varios tipos específicos de esta patología y por último la diabetes gestacional (Tabla I) (Guzmán-Juárez *et Madrigal-Bujaidar*, 2003; Oviedo-Mota *et al.*, 2003).

El diagnóstico de esta enfermedad está basado en la presencia de hiperglucemia (≥ 126 mg/dL) y se confirma con la presencia de síntomas característicos como poliuria, polifagia, polidipsia, entre otros. Sin embargo, cuando la hiperglucemia es crónica y no controlada, se genera un proceso denominado glucosilación, en el cual la glucosa excedente se adhiere a sustratos como proteínas, carbohidratos, lípidos, bases nitrogenadas, entre otros, lo que da como resultado la generación de productos avanzados de la glucosilación (AGE, siglas en inglés); dichos AGE son capaces de modificar señales de transmisión celular en endotelio bloqueando parcialmente la acción de los receptores de superficie y la expresión de genes específicos así como incrementando citocinas inflamatorias y rigidez en la pared arterial. Por otra parte, al elevarse la glucosa se genera sorbitol y se incrementa diacilglicerol (DAG), el primero induce la reducción de la producción de ATP-asa dependiente de Na y K, perdiéndose el potencial redox, mientras que el DAG potencia la acción de las proteínas cinasa C que reduce la producción de óxido nítrico y otras prostaciclina vasodilatadoras. La presencia de AGE, polioles y diacilglicerol ocasionan al paciente una serie de repercusiones micro y macrovasculares así como el incremento en el estrés oxidativo, el cual ha sido aceptado como uno de los principales causantes del incremento en la producción de radicales libres, sobrepasando la capacidad de los sistemas antioxidantes y a su vez participando en la progresión de la diabetes (Maritim *et al.*, 2003; Oviedo-Mota *et al.*, 2003).

Tabla I. Clasificación de diabetes de acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes

Tipo	Características
<i>Diabetes tipo 1</i>	Existe destrucción de células β del páncreas, generalmente con deficiencia absoluta de insulina
<i>Diabetes tipo 2</i>	Predomina incapacidad para incorporar glucosa a las células y deficiencia de la secreción o acción de insulina
<i>Grupo III, presencia de varios tipos específicos de Diabetes</i>	a) Por defectos genéticos en las células β del páncreas y se manifiesta con un deterioro en la secreción de insulina, se presenta a temprana edad (Diabetes tipo MODY)
	b) Por defectos genéticos en la acción de insulina
	c) Originada por enfermedades del páncreas exócrino
	d) Por endocrinopatías, en la que varias hormonas antagonizan la acción de la insulina o la inhiben
	e) Inducida por drogas que afectan la acción o secreción de la insulina
	f) Asociada a infecciones que destruyen las células β del páncreas
	g) Mediada por alteraciones no comunes de inmunidad, presencia de anticuerpos anti-receptor de insulina
	h) Asociada con síndromes genéticos relacionados con la deficiencia de insulina
<i>Diabetes Gestacional</i>	Se presenta por intolerancia a la glucosa debido a cambios metabólicos de origen hormonal

En base a la Asociación Americana de Diabetes (ADA), 2008.

Las consecuencias macro y microvasculares de la diabetes pueden ser cardiopatías, neuropatías y nefropatías que llegan a afectar el estilo de vida del paciente. Algunos autores mencionan que los pacientes diabéticos tienen 25% más posibilidades de presentar un problema de ceguera en comparación con personas sanas, así mismo hacen referencia sobre la nefropatía diabética como la primera causa de insuficiencia renal crónica en esta patología, la gastroparesia su principal repercusión en aparato gastrointestinal, el pie diabético la más frecuente neuropatía y los problemas cardiovasculares como la mayor

causa de morbilidad y mortalidad en la diabetes mellitus. Las complicaciones metabólicas más comunes derivadas de la resistencia a la insulina son los valores anormales de lípidos (elevación de colesterol y triglicéridos) y lipoproteínas en sangre (disminución de la lipoproteína de alta densidad (HDL), elevación de la lipoproteína de baja densidad (LDL)), la aterosclerosis en cuya causa intervienen la disfunción endotelial y diversos fenómenos inflamatorios del estrés oxidativo característico de la patología (Guzmán-Juárez *et al.*, 2003; Oviedo-Mota *et al.*, 2003; Sabag-Ruiz *et al.*, 2006)

El control glucémico del sujeto diabético a través de la alimentación es fundamental para prevenir y/o limitar las consecuencias de su enfermedad, ya que se ha observado un efecto fisiológico benéfico en el organismo al consumir cierto tipo de alimentos; incluso se ha utilizado la terapia nutrimental como herramienta para el cumplimiento de objetivos en el tratamiento del paciente, ya sea llevando a cabo cambios en los hábitos de alimentación, realizando dietas individualizadas y/o adicionando alimentos funcionales como fibra dietética y ácidos grasos poliinsaturados; debido a que ha sido reportado que la fibra dietética al ser un polímero de carbohidratos no digeribles, ofrecen un efecto benéfico al humano, asimismo es considerada un prebiótico, ya que estimula el crecimiento y/o actividad de las bacterias benéficas presentes en el intestino que al fermentarla, generan ácidos grasos de cadena corta que proporcionan beneficios a la salud (Cummings *et al.*, 2001; Peña, 2007).

La fibra dietética se clasifica en base a su solubilidad, la fibra insoluble es esencial para la estructura celular de las plantas, no se disuelve en agua y su principal impacto está en el colon e intestino grueso ya que aumenta el bolo fecal y lo hace más suave, disminuyendo así las heces sobre la pared intestinal al acelerar su movimiento y evacuación, evitando la constipación; mientras que la fibra soluble beneficia en mayor porcentaje al intestino delgado debido a que absorbe mayor cantidad de agua a nivel intestinal. (Nakaji *et al.*, 2002).

Se han realizado estudios con beta glucanos de levadura, en donde se demuestra que hay una disminución del colesterol total y un incremento de la lipoproteína de alta densidad (HDL) (Nicolosi *et al.*, 1999); mientras que otras investigaciones han descrito que el consumo de fibra insoluble disminuye el apetito y con ello la ingesta dietética, ayudando al control de peso (Hamedani *et al.*, 2009). Por su parte, la fibra soluble tiene impacto al disminuir los riesgos de enfermedades cardiovasculares, como la aterosclerosis y dislipidemia, al disminuir el colesterol sérico y la lipoproteína de baja densidad (LDL) (Peña, 2007; Wolever *et al.*, 2009). El mecanismo por el cual disminuye el colesterol y la LDL no es claro, pero hay cuatro mecanismos sugeridos: i) uniéndose a los ácidos biliares en el intestino delgado, ii) incrementando la excreción fecal de los ácidos biliares, iii) incrementando la síntesis primaria de los ácidos biliares, lo que reduce la absorción del colesterol así como el de carbohidratos, y por último, iv) al inhibir la síntesis de colesterol a través de los ácidos grasos de cadena corta generados durante la fermentación (Wolever *et al.*, 2009). Otras investigaciones en el área clínica han demostrado que el consumo de fibra, ayuda al manejo de otras patologías como la diabetes mellitus, ya que su ingesta influye sobre el control glucémico, aumenta la sensibilidad a la insulina, facilita la pérdida de peso y puede reducir la necesidad de medicamentos, así como mantener la salud del tracto gastrointestinal en este tipo de pacientes (Jenkins *et al.*, 2002; Wolever *et al.*, 2009).

Por su parte, los ácidos grasos poliinsaturados se caracterizan por presentar más de un doble enlace y pueden dividirse en dos familias: omega-3 y omega-6, ambos esenciales y necesarios en la dieta (Fig. 1). La estructura y posición de los dobles enlaces de estos ácidos grasos, le confiere propiedades fisiológicas al ser humano. Además de ser fuente de energía, también se incorporan a las membranas celulares donde son precursores de mediadores químicos llamados eicosanoides, tales como las prostaglandinas (PG), los tromboxanos (TX) y los leucotrienos (LT), que intervienen en numerosos procesos como la coagulación de la sangre o la respuesta inflamatoria e inmunológica (Calder, 2006; Companioni-Gázquez, 2000).

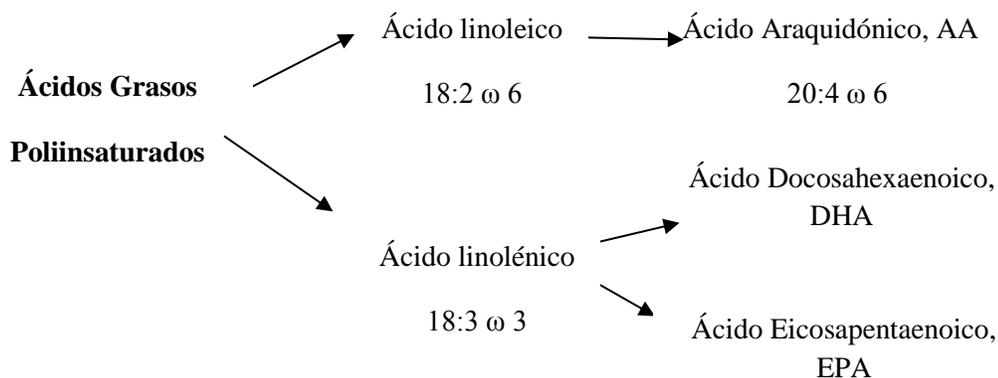
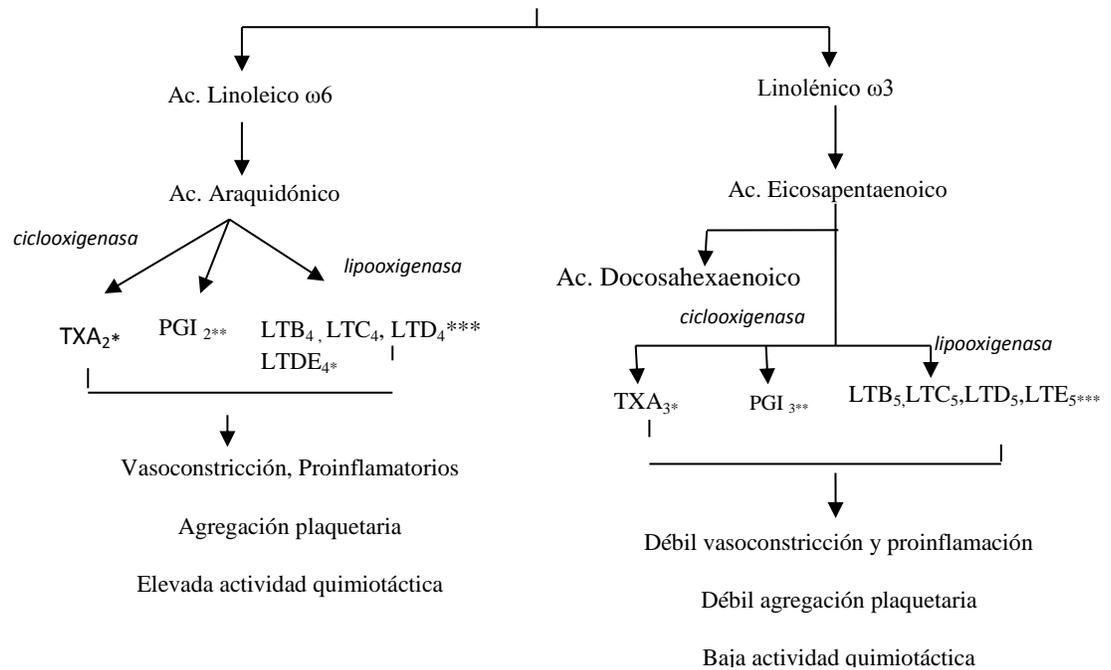


Figura 1. Familia de ácidos grasos poliinsaturados

El ácido graso que se une mayormente a los fosfolípidos de la membrana celular, es el araquidónico (AA), precursor más importante de eicosanoides. Sin embargo el ácido EPA compite directamente con el AA por las enzimas implicadas en su metabolismo, por lo que dependiendo de su disponibilidad, se sintetizará el tipo de eicosanoides, es decir, ante la presencia del ácido AA se generarán prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) de la serie dos y leucotrienos (LT) de la serie cuatro, que son moléculas con elevada actividad inflamatoria, mientras que frente al ácido eicosapentaenoico (EPA) se obtendrán TX de la serie tres y LT de la serie cinco, cuya actividad inflamatoria es débil, además la enzima ciclooxigenasa es poco eficiente cuando se utiliza al EPA como sustrato (Fig. 2) (Arterburn *et al.*, 2006; Carrero *et al.*, 2005, Kew *et al.*, 2004; Mesa-García *et al.*, 2006).

La respuesta inflamatoria es de carácter protector, aunque al prolongarse dicho estado se puede ocasionar un riesgo a la salud, ya que los eicosanoides de la serie dos y cuatro elevan la actividad de monocitos o macrófagos, que a su vez generan la aparición de citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF) y las interleucinas (IL) 1, 6 y 10, que aumentan el nivel de estrés oxidativo, el cual se encuentra elevado en los pacientes diabéticos (Companioni-Gázquez, 2000).

Ácidos Grasos Poliinsaturados



*TX: tromboxanos, **PGI: prostaglandinas, ***LT: leucotrienos

Figura 2. Eicosanoides derivados de los ácidos grasos poliinsaturados

El uso de alimentos funcionales como la fibra dietética y ácidos grasos poliinsaturados ha permitido el incremento en la investigación de moléculas con alto valor biológico cuyo origen sea natural. Es debido a esto, que el uso de microalgas marinas en el área de la salud ha comenzado a generar interés, ya que brindan una fuente de sustratos de importancia biológica y terapéutica como son: vitaminas, proteínas, polisacáridos y ácidos grasos omega-3 y omega-6 (Raja *et al.*, 2008; Spolaore *et al.*, 2006).

Microalgas marinas

El cultivo de organismos marinos, como las microalgas, se ha convertido en una industria importante en todo el mundo. Han generado interés gracias a su uso en la acuicultura y en el desarrollo de tecnología ambiental y farmacéutica al obtener sustancias de valor agregado a partir de sus componentes estructurales o sustratos metabólicos (Wu *et al.*, 2006). Las microalgas son un conjunto de organismos fotosintéticos que además de constituir el fitoplancton, juegan un papel importante en la producción de oxígeno y materia orgánica. El uso de estos organismos marinos por los humanos data de hace 2000 años por los chinos, aunque la biotecnología con microalgas empezó a desarrollarse en la mitad del siglo pasado (Spolaore *et al.*, 2006). El cultivo de éstas, estriba en que son las primeras formadoras de materia orgánica y por su tamaño fácilmente capturables, asimismo presentan una diversidad de relaciones con la comunidad microbiana, sirviendo como fuente de alimento para una gran variedad de larvas y estadios juveniles de moluscos, crustáceos y peces (Tabla II) (Stanley *et al.*, 1976).

No obstante, en los últimos años se ha observado que su uso biotecnológico puede generar un mayor éxito comercial debido a su aplicación en el área de la salud, al obtener de los constituyentes de estos microorganismos moléculas de valor biológico y terapéutico como son: proteínas, ácidos grasos poliinsaturados, carbohidratos, vitaminas y otras moléculas como carotenoides, clorofilas, entre otros (Abalde *et al.*, 1995; Raja *et al.*, 2008; Spolaore *et al.*, 2006).

Tabla II. Algas de mayor uso en acuicultura (Wikfors *et* Ohno, 2001)

Clase	Género	Uso
<i>Cyanophyceae</i>	<i>Spirulina</i>	Alimento para humano, componente para alimento de pez dorado en Japón y China
<i>Eustigmatophyceae</i>	<i>Nannochloropsis</i>	Alimento vivo para moluscos y crustáceos
<i>Prasinophyceae</i>	<i>Tetraselmis</i>	Alimento vivo para moluscos y crustáceos
<i>Chlorophyceae</i>	<i>Chlorella</i>	Alimento vivo para moluscos y crustáceos
	<i>Dunaliella</i>	Extracción de pigmentos, beta caroteno
	<i>Hematococcus</i>	Extracción de pigmentos, astaxantinas
<i>Cryptophyceae</i>	<i>Rhodomonas</i>	Alimento vivo para moluscos y crustáceos
	<i>Cryptomonas</i>	Alimento vivo para moluscos y crustáceos
<i>Dinophyceae</i>	<i>Cryptocodinium</i>	Extracción de lípidos, Acido docosaheptaenoico (DHA), alimento para humano
<i>Prymnesiophyceae</i>	<i>Isochrysis</i>	Alimento vivo para invertebrados marinos
	<i>Pavlova</i>	Alimento vivo para invertebrados marinos
<i>Bacillariophyceae</i>	<i>Chaetoceros</i>	Alimento vivo para moluscos y crustáceos
	<i>Thalassiosira</i>	Alimento vivo para moluscos y crustáceos
<i>Chorophyta</i>	<i>Monostroma</i>	Alga comestible, alimento para humano
<i>Phaeophyceae</i>	<i>Laminaria</i>	Alga comestible, alginatos
<i>Rhodophyceae</i>	<i>Gelidiella</i>	Agar, alimento para humano y medicinal
	<i>Chondrus</i>	Carragenatos, alimento para humano

*Wikfors *et* Ohno, 2001

Cabe mencionar que la composición bioquímica de estos microorganismos marinos puede modificarse si se varían las condiciones de cultivo, sin embargo Brown *et al.*, (1997) describe una proporción de hidratos de carbono en un 5-23%, lípidos de un 7-23% y proteínas entre el 6-52%, mientras que Abalde *et al.*,(1995) menciona que el 90% del peso seco de una célula algal está constituido de proteínas, lípidos y carbohidratos, siendo el componente principal la proteína, que supone más del 50% del peso seco. No obstante son los carbohidratos los que forman parte del material de reserva o son componentes de la pared celular, dichos carbohidratos están entre el 45 a 97% en forma de polisacáridos, aunque existe variación en el tipo de monosacárido que compone dichos polímeros se

puede encontrar de manera frecuente glucosa, galactosa, fucosa, ramnosa, manosa, arabinosa y xilosa, siendo los dos primeros los que predominan (Abalde *et al.*, 1995; Xue-hong *et al.*, 2004).

Los carbohidratos algales pueden encontrarse en varias formas, ya sea como celulosa, almidón, azúcares y otros polisacáridos. El polisacárido predominante en las diatomeas es la crisolaminaria, también conocida como leucocina, que se encuentra almacenada en vacuolas en las células de dichos microorganismos. Dicho polímero está constituido en un 99.5% de glucosa con enlaces β -1,3 y β -1,6 en una relación 11:1. (Abalde *et al.*, 1995; Beattie *et al.*, 1961). Por su parte, el beta-glucano manano, también ha sido descrito como un polisacárido presente en las diatomeas (Abalde *et al.*, 1995, Painter, 1983).

Algunas microalgas almacenan polisacáridos de reserva en forma de gránulos de almidón, en otras como las *Chlorophyceae* y *Prasinophyceae* están dentro de los cloroplastos, mientras que las *Dinohpyceae* y *Rhodophyceae* contienen gránulos de almidón que están libres en el citoplasma. Por último en las *Euglenophyceae* encontramos al polisacárido paramilón, un beta glucanopiranosos con enlaces glucosídicos β -1,3; que forma gránulos libres en el citoplasma o en el pirenoide (Abalde, *et al.*, 1995; Sánchez *et al.*, 2004). La importancia de los beta glucanos, en especial aquellos con enlace glucosídico 1,3, como la crisolaminaria, es su actividad sobre el sistema inmune, ya que se ha reportado que estimulan la actividad antitumoral y antimicrobiana (Brown et Gordon, 2001). Mientras que los manano-oligosacáridos han sido utilizados como prebiótico en el tratamiento de problemas gastrointestinales previniendo adherencia de lecitinas bacterianas lo que reduce la colonización del tracto gastrointestinal de patógenos causantes de diarrea (Domínguez-Vergara *et al.*, 2009; Finucane *et al.* 1999). Cabe mencionar que las cadenas de glucosa β -1,3/ β -1,6 de los beta-glucanos mencionados, le permiten tener características de fibra dietética (Nicolosi *et al.*, 1999).

Con respecto a los ácidos grasos poliinsaturados, las microalgas han sido cultivadas a gran escala en acuicultura por su futuro comercial en la nutrición humana gracias a su contenido

omega-3, como el ácido eicosapentaenoico 20:5 n-3 (EPA) y el ácido docosahexaenoico 22:6 n-3 (DHA) (Brown *et al.*, 1997, Mori *et al.*, 2000). Ensayos clínicos han descrito que el consumo de EPA y DHA de microalgas, genera un efecto similar al del aceite de pescado, pues ayuda a disminuir factores de riesgo cardiovasculares, aterosclerosis y diabetes mellitus (Doughman *et al.*, 2007). El efecto protector de los omega-3, podría derivar de la sustitución del ácido araquidónico a nivel de membrana, pues cuando las células sufren algún daño, se desencadena el proceso de agregación plaquetaria, sin embargo los intermediarios derivados del omega-3 ejercen un efecto protrombótico y vasoconstrictor de menor intensidad. Estudios han indicado que el consumo de estos ácidos grasos poliinsaturados disminuye el pico postprandial de triglicéridos en personas sanas y dislipidémicos (Doughman *et al.*, 2007; Kew *et al.*, 2004; MacKenney *et al.*, 2007).

Debido a la actividad biológica de dichos compuestos y su presencia en las microalgas, la industria alimenticia ha comenzado a utilizar a las microalgas marinas como alimentos funcionales o como ingredientes de éstos, ejemplo de ello son *Spirulina platensis* por su potencial antioxidante, para control de peso y efecto hipocolesterolémico, *Chlorella vulgaris* y *Donaliella salina* por su contenido proteico y pigmentos, además de *Porphyridium* sp. en alteraciones gastrointestinales y metabolismo de lípidos por su contenido de fibra dietética y polisacáridos sulfatados (Dvir *et al.*, 2000; Salman *et al.*, 2007). Así mismo se ha reportado que las microalgas marinas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oculata* poseen características funcionales debido a su contenido en polisacáridos, proteínas y ácidos grasos poliinsaturados, siendo *I. galbana* rica en ácido graso eicosapentaenoico (EPA) en contraste con *N. oculata* que contiene una mayor cantidad de ácido graso docosahexaenoico (DHA) (Brown *et al.*, 1997; Reboloso Fuentes *et al.*, 2001; Sukenik and Wahnnon, 1991). No obstante hay pocos estudios que reporten el efecto de su consumo.

3. JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus es un padecimiento crónico degenerativo cuya contribución en la morbilidad y la mortalidad en México ha sido progresivo, sobre todo a partir de la década de los 80s. Su importancia se incrementa por las complicaciones que se derivan de ella como la retinopatía, la neuropatía, nefropatía y cardiopatías (Gervaise *et al.*, 2000; Guzmán-Juárez *et al.*, 2003).

El control de la glucosa sanguínea, permite al paciente diabético tener una mejor calidad de vida al retardar la presentación de las complicaciones macro y microvasculares ó al limitar sus efectos una vez presentes. Actualmente en el mercado existen productos que se administran junto con el tratamiento principal de dieta y medicamento, con el fin de aumentar las posibilidades de alivio. Sin embargo son los prebióticos y los ácidos grasos omega poliinsaturados los que han cobrado importancia, ya que se ha comprobado en diversas investigaciones con pacientes diabéticos los efectos benéficos que brindan a la salud como alimentos funcionales, aunque son pocas las microalgas marinas que se han utilizado con dicho propósito (Arenas-Márquez et Arenas Montoya, 2007).

Es en esta área, donde las microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oculata* pueden tener un potencial importante, ya que dentro de sus componentes se encuentran los polisacáridos con características de fibra dietética y los ácidos poliinsaturados omega-3. Los polisacáridos de estos organismos marinos podrían ser considerados un prebiótico, pues debido a sus enlaces beta no puede digerirse, solo fermentarse, generando así ácidos grasos de cadena corta. Por otra parte se ha observado que los omega 3 que contienen estas microalgas pueden influir en la respuesta inmune, disminuyendo los parámetros inflamatorios con los que cursa dicha patología (Sierra *et al.*, 2004)

Por lo tanto, la adición de dichas microalgas marinas en el régimen alimenticio de los sujetos con diabetes mellitus, puede generar una nueva oportunidad en el control metabólico de la enfermedad así como ayudar a restaurar la biota intestinal del paciente.

4. OBJETIVO GENERAL

Conocer los efectos clínicos, microbiológicos, histopatológicos e inmunológicos en ratas *Sprigie-Dawley* con diabetes mellitus inducidas con aloxano, tratadas con *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oculata*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto del consumo de microalgas marinas sobre el peso corporal, los niveles de glucosa, lípidos y lipoproteínas VLDL, HDL y LDL de ratas diabéticas.
- Determinar la respuesta moduladora del consumo de microalgas marinas sobre la estructura anatómica y microbiota del tracto digestivo de ratas con diabetes mellitus.
- Cuantificar los niveles de factor de necrosis tumoral alfa, interleucina 6, leptina y péptido similar al glucágon-1, en ratas diabéticas tratadas con microalgas marinas

5. HIPOTESIS

Si el consumo de ácidos grasos poliinsaturados y polisacáridos se asocia al control metabólico de diabetes mellitus, entonces la ingesta de las microalgas marinas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oculata* que contienen dichos compuestos bioactivos podrían ayudar al control de peso corporal, los niveles elevados de glucosa, lípidos y lipoproteínas en sangre, modular la microbiota intestinal y la síntesis de citocinas proinflamatorias en ratas con diabetes mellitus.

6. MATERIAL Y METODOS

La metodología se dividió en siete etapas, que incluyeron la obtención de *I. galbana* y *N. oculata*, su análisis microbiológico, bromatológico y perfil de ácidos grasos, la determinación de la dosis letal 50, ensayo preliminar y bioensayo así como el análisis estadístico de los resultados (Fig. 3).

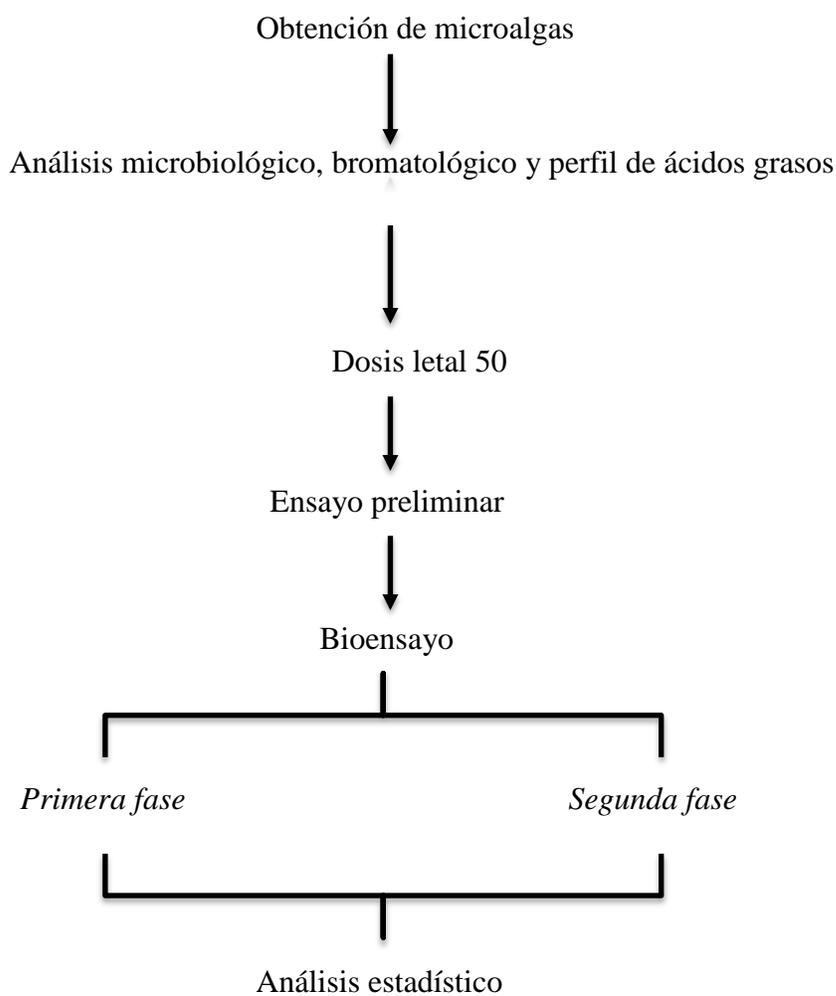


Figura 3. Esquema general de metodología

1. Obtención de las microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oculata* por centrifugación

Las microalgas *Isochrysis galbana* (T-ISO; UTEX Culture LB 2307) y *Nannochloropsis oculata* (NNO-1 UTEX Culture LB 2164), fueron obtenidas del cepario del laboratorio de Alimento vivo del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, CIBNOR, en donde fueron cultivadas en medio f/2 (pH 8), con 30ppm de NaCl en un sistema Batch con aeración continua, temperatura controlada a 21°C y bajo iluminación de tubo fluorescente 2x75 watts. Las microalgas fueron recolectadas en el quinto día de crecimiento para *I.galbana* y el sexto día para *N. oculata*.

Posteriormente se centrifugaron en flujo continuo (JCF-Z, Beckman, Brea, CA, USA) a 6000 rpm/20°C en un tiempo aproximado de 3h. La biomasa se colocó en frascos de manera equitativa para volver a centrifugarse a 3000 rpm/20°C por 10 min (GS-6R Allegra, Beckman, Palo alto, CA, USA). Finalmente se liofilizaron a -56°C (VirTis Model 10-145 MR-BA, SP Scientific, Stone Ridge, NY, USA). Las microalgas fueron distribuidas, empacadas, selladas y conservadas a -20°C hasta su uso.

2. Análisis bromatológico y microbiológico

El análisis bromatológico del liofilizado se realizó en el laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos, de la Universidad Autónoma de Baja California Sur. Los hidratos de carbono solubles se determinaron por el método colorimétrico de Dubois. El contenido de fibra dietética se determinó por el método ácido sulfúrico-hidróxido de sodio de AOAC. Las proteínas fueron determinadas por el método de Kjeldahl cuyo resultado fue multiplicado por 6.25 para la obtención de proteínas totales. El método de Bligh & Dyer (cloroformo: metanol, 1:2) se utilizó para la determinación y cuantificación de ácidos grasos (Reboloso-Fuentes *et al.*, 2001, Bligh *et Dyer*, 1959).

Así mismo, se analizó la ausencia de *Vibrio* y *Pseudomonas* en el laboratorio de Microbiología Sanitaria e Investigación del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías (CUCEI) de la Universidad de Guadalajara.

3. Determinación de dosis letal 50

La dosis letal 50 (DL₅₀) se llevó a cabo en ratas sanas, así como en ratas con hiperglucemia inducidas por aloxano. Se formaron nueve grupos de ratas macho *Sprague –Dawley* ($n=5$) de $200 \pm 8g$ alimentadas *ad libitum* (Rodent Laboratory, Chow, 5001, PMI Nutrition Int'l, LLC, Brentwood, MO, USA) (Tabla III) y se les administraron dosis únicas de cada microalga utilizando una cánula dosificadora (VWR[®], 20068-642, West Chester, PA, USA). Las ratas estuvieron bajo observación durante una semana para determinar signos y síntomas de toxicidad o muerte.

Tabla III. Dosis de *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oculata* para la determinación de la dosis letal 50

Microalga	Dosis	N
<i>Isochrysis galbana</i>	5µg	5
	50µg	5
	5 mg	5
	50mg	5
<i>Nannochloropsis oculata</i>	5 µg	5
	50µg	5
	5mg	5
	50mg	5
Placebo*	0.5mL	5

*Agua.

4. Ensayo biológico preliminar

Inicialmente se hizo una prueba preliminar para determinar las condiciones del ensayo y la dosis de microalgas que se suministraría a las ratas. Se utilizaron ratas *Sprague-Dawley* de 200g de 8 a 16 semanas de vida, proporcionadas por el bioterio del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, CIBO-IMSS.

4.1 Inducción de hiperglucemia

La hiperglucemia fue inducida mediante la aplicación de aloxano monohidratado (A7413, Sigma-Aldrich[®], St Louis, MO, USA), el cual fue administrado por vía intraperitoneal. El medicamento se proporcionó en dos dosis de 150 mg/kg cada una, en un intervalo de 48 h diluyéndolo en 0.5mL de solución salina fisiológica. Las inyecciones se realizaron posteriores a un periodo de ayuno de 8 h. Transcurridas 72 h de la última inyección, se realizó una toma de sangre para ratificar la hiperglucemia (>200mg/dL) (Szudelski, 2001).

4.2 Distribución de grupos de estudio, ensayo preliminar

El ensayo preliminar se realizó con cuatro grupos distribuidos de forma aleatoria, tres de ellos inyectados con aloxano para inducir la elevación de glucosa y el cuarto como grupo control. Una vez confirmado el cuadro de hiperglucemia se prosiguió con la administración oral de la microalga. Esta prueba fue dividida en dos períodos de dos semanas con diferente dosis cada uno. En el primer periodo se administraron 50µg/microalga/rata disuelto en 0.5mL de agua, mientras que en las últimas dos semanas se dosificó cada microalga en 50mg/rata disueltas en 0.5mL de agua (Tabla IV).

Tabla IV. Diseño experimental del ensayo preliminar biológico.

Grupo	Dosis/Periodo		Tratamiento	N
	1	2		
Aloxano	50µg	50mg	<i>N. oculata</i>	4
Aloxano	50µg	50mg	<i>I. galbana</i>	4
Aloxano	0.5mL	0.5mL	Placebo*	3
Sano	0.5mL	0.5mL	Placebo*	3

*Agua

5. Ensayo biológico (primera fase)

El ensayo biológico se llevó a cabo durante ocho semanas utilizando ratas macho *Sprague-Dawley* con un peso de 200 g y 8 a 16 semanas de vida, proporcionadas por el bioterio del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, CIBO-IMSS (Fig. 4).

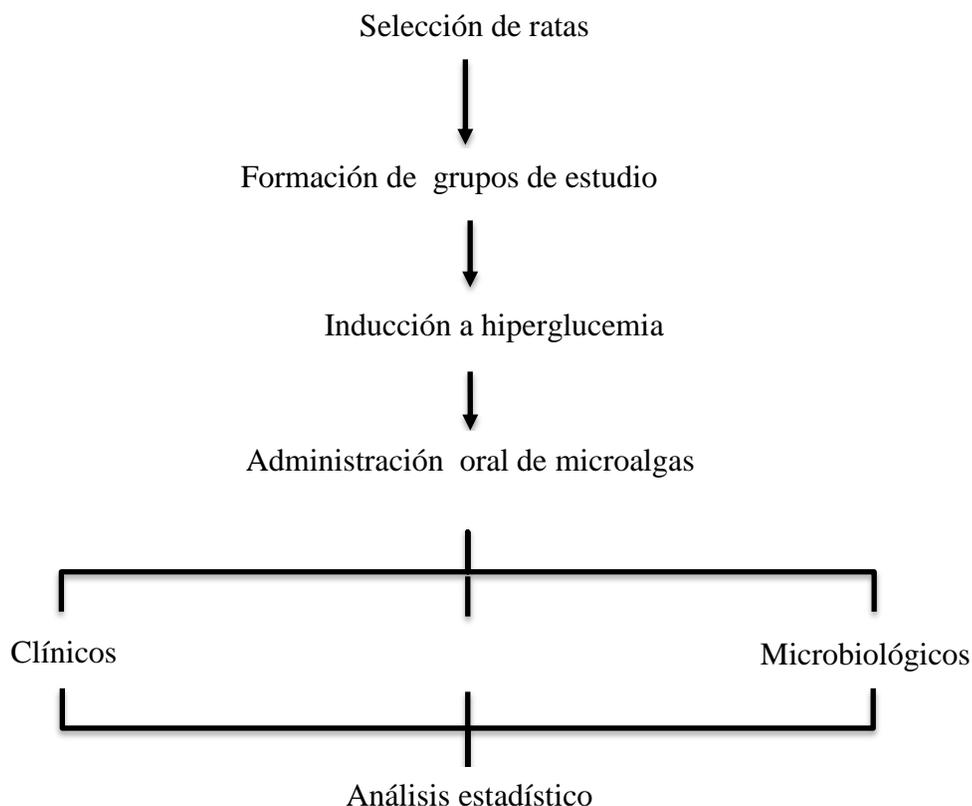


Figura 4. Esquema general de la primera fase del bioensayo

El grupo de ratas estuvo en condiciones de temperatura controlada de 21°C con 50-80% de humedad y fueron alimentadas *ad libitum* (Rodent Laboratory, Chow 5001, PMI Nutrition Int'l, Brentwood, MO, USA). Las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en siete grupos ($n=5$), de los cuales cuatro fueron inducidos a hiperglucemia. (Tabla V).

Tabla V. Grupos de estudio de la primera fase del bioensayo

Grupo	Dosis	Tratamiento	N
Sano	0.5mL	Placebo*	5
	50mg	<i>I. galbana</i>	5
	50mg	<i>N. oculata</i>	5
Aloxano	0.5mL	Placebo*	5
	50mg	<i>I. galbana</i>	5
	50mg	<i>N. oculata</i>	5
	600µg	Glibenclamida**	5

*Agua, **Hipoglucemiante

Al confirmar el cuadro de hiperglucemia, se comenzó el tratamiento con microalga e hipoglucemiante según correspondiera. Ambas microalgas fueron administradas utilizando una cánula dosificadora (VWR[®], 20068-642, West Chester, PA, USA) durante ocho semanas en una toma diaria de 50mg/rata, mientras que la glibenclamida (Sigma Aldrich[®]; St. Louis, MO, USA) se proporcionó en dosis de 600µg/kg/día (Saravanan *et Pari*, 2007)

5.1. Determinación de peso corporal

La obtención de este parámetro se hizo una vez por semana. Se utilizó una báscula de triple brazo con canastilla (730-SW, OHAUS, Pine Brook, NJ, USA).

5.2. Obtención de valores de glucosa, lípidos y compuestos nitrogenados en sangre

Para identificar los cambios bioquímicos fueron analizados los parámetros de glucosa, triglicéridos, lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL) y compuestos nitrogenados (creatinina, urea y ácido úrico). La glucosa fue determinada semanalmente durante 8 semanas (Accu-Check[®], Roche Diagnostics; Indianapolis, IN, USA; rango de 10–600mg/dl). Al finalizar el estudio, los lípidos, lipoproteínas y compuestos nitrogenados fueron analizados con kits comerciales (Spinreact[®], Barcelona, Spain) para triglicéridos (1001312), enzimático para colesterol

(1001090), kit para LDLc-D (41023), agente de precipitación para HDL-colesterol (1001095), creatinina (1001010), ácido úrico (1001325) y urea (1001111). El análisis de los parámetros se realizó después de un periodo de ayuno de 12h.

5.3. Análisis histopatológico

Al finalizar el ensayo biológico, se extrajo el intestino y se colocó en un recipiente estéril. En condiciones asépticas se extrajo el bolo que contenían, el cual fue puesto en un tubo falcon estéril para la determinación de la comunidad microbiana, mientras que el intestino se depositó en buffer de formalina al 10% (HT 501128, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) para su análisis histológico mediante la técnica de inclusión en parafina y tinción con hematoxilina y eosina. El diagnóstico de anormalidades intestinales se basó en la observación al microscopio de los cortes histológicos.

5.4. Cuantificación e identificación de bacterias ácido lácticas (BAL)

La cuantificación de BAL se hizo a partir de 1g de muestra de materia fecal a la que se adicionaron 9mL de solución salina fisiológica estéril (SSF), se homogenizó y posteriormente se hicieron tres diluciones decimales más (1:10, 1:100 y 1:100, v/v). Se tomó 0.1mL de cada dilución y se transfirió a una placa de agar M.R.S (Man, Rogose and Sharpe, BD, Difco Laboratories®, Sparks Maryland, MD, USA) para realizar la técnica de extensión por superficie. Una vez inoculado el medio se incubó a 35°C/48±2h en atmósfera reducida de oxígeno (Rengipat *et al.*, 2008). Transcurrido el tiempo de incubación, se prosiguió a realizar el conteo de las unidades formadoras de colonias. La confirmación del género se hizo mediante la selección de tres a cinco colonias por caja contable a las que se les identificó mediante tinción de gram, catalasa y pruebas bioquímicas miniaturizadas (API, 50CHL, BioMerieux®, Marcy-l'Etoile, France).

5.5. Identificación de enterobacterias

Las enterobacterias fueron identificadas a partir de 1g de muestra al que se le adicionaron 9mL de SSF estéril para lograr una emulsión homogénea en la que fue humedecido un hisopo con el cual se realizó siembra masiva en los siguientes agares: Eosina y Azul de Metileno (EMB), MacConkey, Bilis Verde Brillante (ABVB), *Salmonella-Shigela* y Hektoen Entérico. Después de incubar a 35°C por 24h, las colonias representativas fueron aisladas, purificadas y nuevamente cultivadas en los mismos medios selectivos. Se les realizó tinción de Gram y pruebas bioquímicas como: catalasa (Cura Pack Degasa[®], Morelos, México), oxidasa (BD Difco Laboratories[®], Sparks Maryland, MD, USA), MIO (movilidad-indol-ornitina), LIA (agar lisina hierro), Citrato, TSI (triple azúcar hierro), O/F (oxidación/fermentación de glucosa), hidrólisis de esculina, RM-VP (rojo de metilo-Vogues Proskauer) y fermentación de azúcares como glucosa, xilosa, lactosa y sacarosa. Los medios fueron utilizados de acuerdo a las especificaciones del proveedor (BD Bioxon[®], Estado de México, México).

6. Ensayo biológico (segunda fase)

A partir de los resultados del primer bioensayo se seleccionó a *Isochrysis galbana* como la microalga para administrar en el segundo bioensayo, además se incrementó el número de animales por grupo, tiempo y pruebas de estudio (Fig. 5).

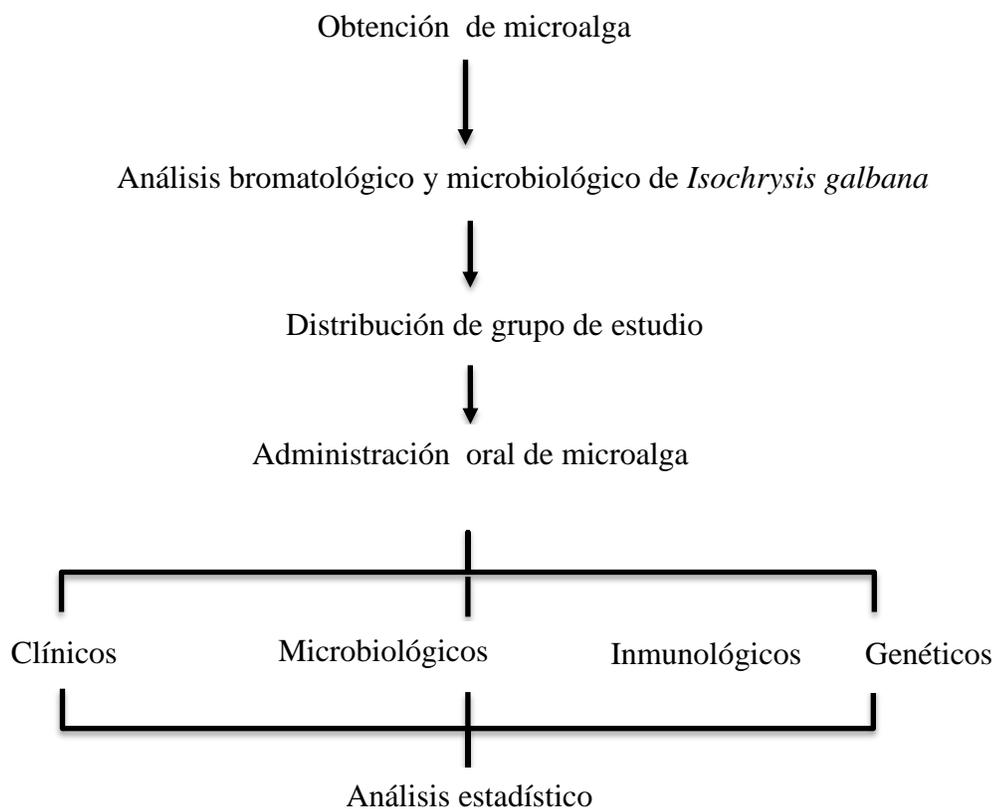


Figura 5. Esquema general de la segunda fase del bioensayo

6.1. Obtención de *Isochrysis galbana* por floculación

La microalga *I. galbana* (T-ISO; UTEX Culture LB 2307) fue obtenida del cepario del laboratorio Alimento Vivo del CIBNOR. Fue purificada y cultivada en la unidad de Pichilingue de la Universidad Autónoma de Baja California Sur, UABS, en tanques de fibra de vidrio de 400 L con medio f/2 (pH 8), a 30 ppm de NaCl, en un sistema Batch con aeración continua, temperatura controlada a 20°C y bajo iluminación de 1100 lux por 24h.

La microalga fue cosechada incrementando el pH adicionando a los cultivos 1.5 mL de hidróxido de sodio al 40% (CAS 1310-73-2, FERMONT[®], Monterrey, México) por cada litro de cultivo, para alcanzar un pH de 10. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm/20°C por 10 min (IEC Centra GP8R, DJB Labcare, Bristol, UK) y se restauró el pH de 8 del precipitado con 7mL de ácido clorhídrico concentrado (CAS 7647-01-0, FERMONT[®], Monterrey, México) por cada litro de microalga (Jun-Ichi et al., 2003). El paquete celular se colocó en frascos de manera equitativa para centrifugar a 3000 rpm/20°C por 10 min (GS-6R Allegra, Beckman, Palo alto, CA, USA). Finalmente se liofilizó a -56°C (VirTis Model 10-145 MR-BA, SP Scientific, Stone Ridge, NY). Las microalgas fueron distribuidas, empacadas, selladas y conservadas a -20°C hasta su uso.

6.1.1. Análisis bromatológico y microbiológico de *Isochrysis galbana*

El análisis bromatológico y microbiológico de *I. galbana* se realizó utilizando las técnicas descritas en el apartado 2. La determinación de ácidos grasos se llevó a cabo en el laboratorio de alimentos de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS).

Debido a la variante en la técnica de concentración de microalgas, adicionalmente se determinaron los porcentajes de sodio, calcio, magnesio, potasio y fósforo.

6.2. Determinación de grupos de estudio

El ensayo biológico se llevó a cabo con ratas macho *Sprague-Dawley* de 230g±10 proporcionadas por el bioterio del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, CIBO-IMSS. Los animales estuvieron en condiciones de temperatura controlada de 21°C con 50-

80% de humedad y alimentadas *ad libitum*. Las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en cuatro grupos ($n=10$), de los cuales, cuatro fueron inducidos a hiperglucemia (Tabla VI)

Tabla VI. Grupos de estudio de la segunda fase del bioensayo

Grupo	Dosis	Tratamiento	N
Sano	0.5mL	Placebo*	10
	50mg	<i>Isochrysis galbana</i>	10
Aloxano	0.5mL	Placebo*	10
	50mg	<i>Isochrysis galbana</i>	10

*Agua

Al confirmar el cuadro de hiperglucemia, se comenzó el tratamiento de catorce semanas con una dosis única de 50mg/rata/día de *I. galbana* diluida en 0.5 ml de agua purificada, utilizando una cánula dosificadora (VWR[®], 20068-642).

6.3. Determinación de peso corporal

La obtención de este parámetro se hizo una vez por semana durante catorce semanas. Se utilizó una báscula de triple brazo (730-SW, OHAUS) con canastilla.

6.4. Obtención de valores de glucosa, lípidos y lipoproteínas en sangre

Para identificar los cambios en parámetros bioquímicos se realizó la técnica descrita en el apartado 5.2.

6.5. Determinación de hemoglobina glucosilada

Se analizó la hemoglobina glucosilada al terminar el estudio tras un periodo de ayuno de 12h. El análisis se llevó a cabo con base a las especificaciones del kit Glycohemoglobin Unitest (GH-330, EAGLE Diagnostics[®], De Soto, TX, USA).

6.6. Cuantificación e identificación de bacterias ácido lácticas (BAL)

La cuantificación de BAL se hizo a partir de 1g de muestra de materia fecal utilizando la técnica descrita en el apartado 5.4 de la metodología.

6.7. Cuantificación e identificación de enterobacterias.

La identificación de enterobacterias se hizo a partir de 1g de muestra de materia fecal, al que se le adicionaron 9mL de solución salina al 0.85%, se homogenizó y posteriormente se hicieron cinco diluciones decimales más (1:10, 1:100, 1:100, 1:1000 y 1:10 000, v/v). Se tomó 1 mL de cada dilución y se transfirió a una placa petrifilm para *Enterobacteriaceae* (3M, St. Paul, MN, USA). Se incubó a 35°C por 24h e hizo recuento de unidades formadoras de colonias. Al mismo tiempo se realizó siembra masiva en los medios de cultivo específicos para enterobacterias (punto 5.5) y CHROMagar (Becton Dickinson, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México) para conocer características coloniales. Las colonias representativas fueron aisladas, purificadas y se les realizó tinción de Gram y pruebas bioquímicas miniaturizadas (API 20E, BioMerieux[®], Marcy-l'Etoile, France).

6.7. Análisis histopatológico

El análisis histopatológico de intestino, hígado, pulmón y riñón se realizó de manera similar a lo descrito en el punto 5.3.

6.8. Determinación de factor de necrosis tumoral alfa, interleucina 6, leptina y péptido similar al glucagón tipo 1

A partir 50µL de suero se analizaron los valores de TNF α , IL6, leptina y GLP-1, a través del sistema multiplex Bio-Plex (Bio-Rad, Hercules, CA) utilizando el Bio-Rat plex cytokine array. Los resultados fueron expresados en picogramos por mililitro.

6.9 Microarreglo

Los hígados de rata se obtuvieron posterior el sacrificio de los animales. Fueron colocados en nitrógeno líquido y almacenados a -70°C hasta su uso. La extracción de ARN se realizó utilizando el agente TRIzol (TRI Reagent[®], SIGMA-ALDRICH, Spruce Street 3050, St. Louis, MO, USA). La cuantificación se realizó en UV/VIS Spectrofotómetro Optizen (POP BIO, Mecasys Co., Ltd. 10F, 640-3 Rep. of Korea) bajo las especificaciones de protocolo. La integridad de ARN se confirmó en gel de agarosa y visualizó en el documentador Gel

DocTM EZ Imager (BIO-RAD) con el software Image LabTM versión 4.1 (BIO-RAD). Se utilizó como marcador de referencia ARN de hígado de ratón recién sacrificado.

El ARN fue colocado en pools por grupo de estudio, se precipitaron con acetato de sodio 3M, pH 5.2 y se enviaron a la unidad de microarreglos de la UNAM donde se realizó la síntesis de cDNA para su posterior hibridación. Las muestras fueron marcadas en el chip con sonda fluorescente y se hicieron hibridaciones de Control vs Sano tratamiento *I. galbana*, y Diabético sin tratamiento vs Diabético con tratamiento de microalga, cada hibridación con su respectivo SWAP. La interpretación de los resultados se llevaron a cabo con los datos cuyo puntaje z (z score) fuera mayor o menor a 2 z score. Se utilizaron programas (DAVID, AmiGO, Blast2GO) que permitieran la interpretación por jerarquía ontológica.

6.9.1. PCR tiempo real

Se realizó la cuantificación por PCR tiempo real de los genes con mayor impacto metabólico en animales tratados con *I. galbana*. Con base a lo anterior fueron seleccionados los genes preprogreлина y apolipoproteína A-IV. Las secuencias utilizadas fueron: preprogreлина-F (5'TTC AAC GGC ACA GTC AAG GC-3'), preprogreлина-R (5' GCT CCT GAC AGC TTG ATG CCA-3'), APOAIV-F (5'-AAG CTG AAA GGC AAC ACG GA-3') y APOAIV-R (5'TGC CTG AAC TTC TCC ATC TGC-3'). Se utilizó como control interno el gen endógeno GAPDH: GAPDH-F (5'TTC AAC GGC ACA GTC AAG GC-3') y GAPDH-R (5'TGC CTG AAC TTC TCC ATC TGC-3').

El protocolo de PCR se basó en una desnaturalización inicial a 95°C por 2 min y 20-40 ciclos de amplificación, éste último comprende una desnaturalización a 95°C por 15 s, alineación a 60°C por 30 s y elongación a 72°C por 55 s. Posteriormente se hace un análisis de las curvas de fusión (*melting curves*) a un rango de temperatura de 50°C a 99°C con un rango de calentamiento de 0.1°C/s y medición continua de fluorescencia. La identificación de longitud y amplificación de producto se realizó en gel de agarosa 1.5% (Fukuhura, et al., 2004; Shen et al., 2008)

7. Análisis estadístico

Para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio, los datos fueron analizados por ANOVA (SPSS-PC, versión 19.0). En aquellos casos donde la desviación estándar no fuera similar, se realizó una prueba multivariada no paramétrica U Mann-Whitney y Kruskal-Wallis con un intervalo de confianza de 95% ($p < 0.05$). Se realizó una prueba Cluster con método Ward para el análisis de comunidades bacterianas mediante el criterio de grupos pareados y la similitud con distancias euclidianas.

8. Consideraciones éticas.

Los procedimientos utilizados en el ensayo biológico se llevaron a cabo mediante los cuidados establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 que indica las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

7. RESULTADOS

7.1. PRIMERA ETAPA

7.1.1 Análisis microbiológico

Los resultados del análisis microbiológico de *I. galbana* y *N. oculata* no mostraron presencia de los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas*.

7.1.2. Análisis bromatológico

Las muestras liofilizadas de microalgas revelaron diferencias cuantitativas en el contenido de: lípidos, fibra cruda, proteína y humedad. *I. galbana* posee mayor porcentaje carbohidratos (13%), ácidos grasos (51%) y humedad (24.41%) que *N. oculata*, mientras que esta última tiene mayor cantidad de proteínas (40%) y fibra (2.7%) (Tabla VII).

Tabla VII. Composición proximal (% peso seco) de *I. galbana* y *N. oculata*

Microalga	Carbohidratos	Lípidos	Proteínas	Fibra total	Cenizas
<i>galbana</i>	13±0.73	51±0.5	31±0.08	2.1±0.5	2.9±0.16
<i>N. oculata</i>	10±1.4	43±0.7	40±0.03	2.7±0.0	4.3±0.1

7.1.3. Contenido de ácidos grasos

Ambas microalgas contienen ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. Por su parte, *I. galbana* contiene mayor cantidad y tipos de ácidos grasos, de los cuales predominan el ácido 14:0, 16:1, 18:1, 16:0, 18:0, 22:6 y 18:2. No se detectaron los ácidos grasos 18:2, 18:3 y 20:3 para esta microalga (Tabla VIII).

En la microalga *N. oculata* se observó una menor variabilidad de ácidos grasos en comparación a *I. galbana*. Sin embargo, en ambas microalgas se encontraron valores similares de los ácidos 16:0 y 16:1, mientras que el ácido 20:5 encontrado en *N. oculata* está en mayor proporción que en *I. galbana*.

Tabla VIII. Contenido de ácidos grasos (mg/g) de *I. galbana* y *N. oculata*

Ácidos grasos	Nomenclatura	Microalga	
		<i>N. oculata</i>	<i>I. galbana</i>
Laurico	12:0	0.019	0.031
Mirístico	14:0	0.242	0.956
Miristoleico	14:1n5	ND*	0.016
Pentadecaenoico	15:0	0.018	0.207
Palmítico	16:0	0.470	0.596
Palmitoleico	16:1	0.712	0.928
Margárico	17:0	0.018	0.352
Heptadecaenoico	17:1n7	ND*	0.183
Esteárico	18:0	0.056	0.571
Oleico	18:1 n9	0.045	0.700
Trans-linoleico	18:2 n6	0.152	ND
Linoleico	18:2 n6	NC**	0.378
Gamalinolénico	18:3 n6	NC**	NC
Alfa-linolénico	18:3 n3	NC**	0.322
Araquídico	20:0	ND*	0.125
Eicosaenoico	20:1 n9	ND*	0.287
Eicosadienoico	20:2 n6	ND*	0.040
Dihomogamalinolénico	20:3 n6	0.025	ND
Araquidónico	20:4 n6	0.184	0.119
Eicosapentaenoico	20:5 n3	1.047	0.224
Heneicosanoico	21:0	ND*	0.031
Behénico	22:0	ND*	0.117
Erúcico	22:1 n9	ND*	0.050
Docosahexaenoico	22:6 n3	ND*	0.515
Tricosanoico	23:0	ND*	0.047
Lignocerico	24:0	ND*	0.101
Nervónico	24:1 n9	ND*	0.113
Σ		2.988	7.010
Saturados		0.823	3.135
Monoinsaturados		0.757	2.277
Poliinsaturados		1.408	1.598
Omega 3		1.047	1.061
Omega 6		0.361	0.537

**NC, no cuantificado; *ND, no detectado

7.1.4. Dosis letal 50 (DL₅₀)

La DL₅₀ constituyó la base para evaluar el riesgo en el consumo de las microalgas seleccionadas. Las concentraciones utilizadas de *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oculata* en el experimento no mostraron signos de toxicidad o mortalidad, tales como alteraciones en la ingesta de alimentos, crecimiento corporal inusual, letargo, diarrea, sangrado o muerte.

7.1.5. Ensayo biológico preliminar.

La prueba preliminar permitió determinar la cantidad de 50mg de microalga como la dosis-respuesta óptima, debido a que al incrementar la cantidad, los animales presentaban distensión abdominal severa, dolor abdominal a la palpación y riesgo de desgarre de las paredes intestinales por el alto contenido de bolo alimenticio luminal y retardo en el vaciamiento gástrico.

Con respecto al análisis de parámetros clínicos de los animales del ensayo preliminar, se observó que el peso corporal de los animales con hiperglucemia tratados con *I. galbana* y *N. oculata* tuvieron un peso menor al grupo control durante todas las semanas y mayor al grupo diabético sin tratamiento. Por su parte, la glucosa en los grupos diabéticos tratados con microalgas disminuyeron sus valores a partir de la segunda semana a diferencia del grupo diabético sin tratamiento, no obstante dichos valores no lograron mantenerse. Por su parte, algunos animales con hiperglucemia tratados con *I. galbana* registraron valores similares de colesterol, triglicéridos, LDL y HDL al grupo control, en cambio aquellos tratados con *N. oculata* y sin tratamiento no mostraron mejoría.

Finalmente se debe mencionar que en el transcurso del ensayo preliminar, ninguna rata mostró signos de intoxicación, ascitis y/o edema, únicamente se observaron cambios en la consistencia de las heces sin llegar a presentar diarrea. Por otra parte, las ratas con diabetes y sanas tratadas con microalgas, tuvieron menor acumulo de grasa visceral, a diferencia del grupo sano y el grupo diabético sin tratamiento. En este último grupo, se presentó suero quiloso en uno de los sujetos de estudio.

7.1.6. Ensayo biológico (primera fase)

Durante el ensayo, dos ratas diabéticas sin tratamiento murieron al incrementar en demasía sus niveles de glucosa ($\geq 600\text{mg/dL}$) en la cuarta semana.

7.1.7. Peso corporal

Animales del grupo control, grupos sanos tratados con microalgas y grupo diabético con glibenclamida mostraron una ganancia de peso constante, con un peso inicial promedio de $\sim 218 \pm 10$ g y un peso final mayor a 300g con diferencias significativas entre semanas (Fig. 6).

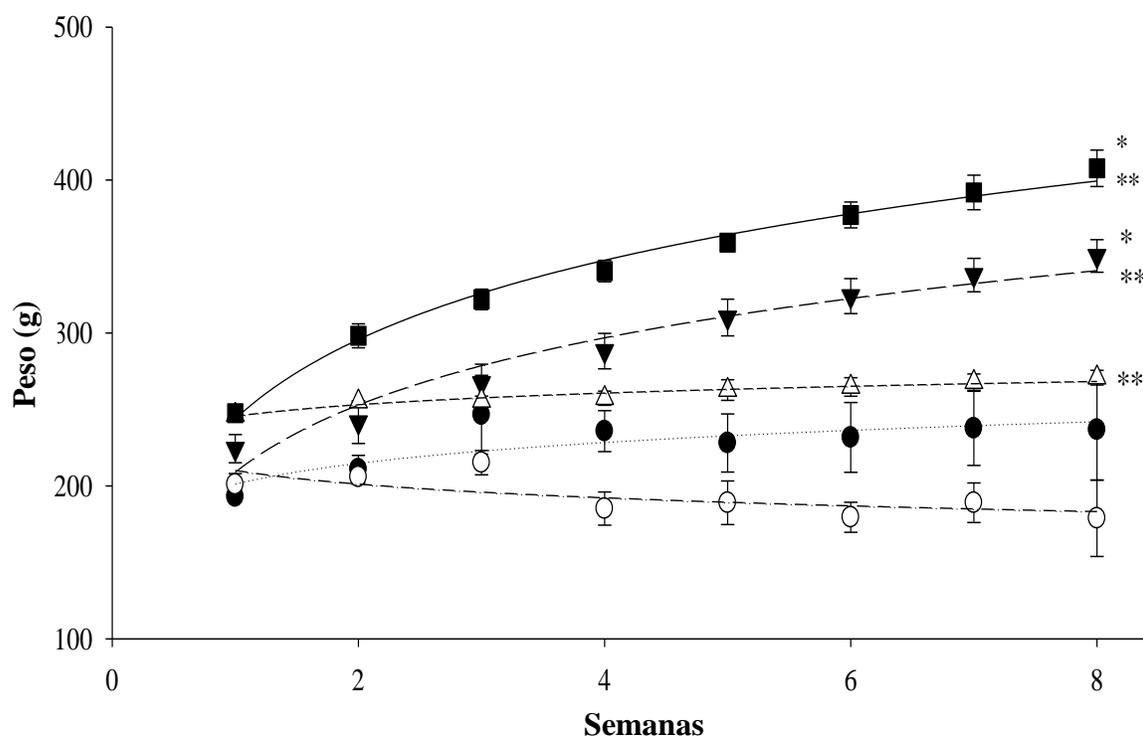


Figura 6. Peso corporal de grupos diabéticos y grupo control. ■ Grupo control, ● grupo diabético tratado con *Isochrysis galbana*, ○ grupo diabético tratado con *Nannochloropsis oculata*, ▼ grupo diabético tratado con glibenclamida y △ grupo diabético sin tratamiento. Valores expresados en media \pm ES. * $p < 0.05$ vs. grupo diabético tratado con *I. galbana*. ** $p < 0.05$ vs. grupo diabético tratado con *N. oculata*.

El peso corporal del grupo diabético sin tratamiento y grupo diabético tratado con *I. galbana* se mantuvo constante ($p>0.05$) durante el experimento. El grupo diabético tratado con *N. oculata* disminuyó de peso a lo largo del ensayo, sin diferencias estadísticas significativas entre la primera (200 ± 16 g) y la octava semana (186 ± 28.8 g). Los animales en este último grupo tuvieron diarrea, distensión abdominal y cambios de color en piel y pelaje.

Al finalizar el estudio, todos los grupo tratados con *I. galbana* y *N. oculata*, ya sea sanos o enfermos, tuvieron un peso final más bajo en comparación al grupo control ($p<0.05$). Los grupos diabéticos con *I. galbana* y *N. oculata* tuvieron pesos menores ($p<0.05$) que el grupo diabético al que se le administró glibenclamida. El peso final en el grupo diabético sin tratamiento no fue diferente ($p>0.05$) del grupo diabético tratado con *I. galbana*, aunque superior ($p<0.05$) al grupo diabético tratado con *N. oculata* (Fig. 6).

7.1.8. Análisis de glucosa sérica

El valor promedio de la glucosa inicial en los grupos sanos fue de 126.47 ± 12 mg/dl y para los grupos con hiperglucemia fue de 542 ± 103 mg/dl. Al comparar la primer semana con la octava, el grupo control no mostró cambios ($p>0.05$), mientras que los grupos sanos tratados con *I. galbana* y *N. oculata* disminuyeron sus valores ($p<0.05$) de 132.5 mg/dl a 83.80 mg/dl. Por otra parte, dos ratas del grupo diabético sin tratamiento murieron debido al incremento de glucosa (>600 mg/dl), aquellas que sobrevivieron mostraron un incremento de glucosa durante el experimento, aunque no se encontraron diferencias estadísticas. Los grupos diabéticos con tratamiento mostraron una glucosa final menor ($p<0.05$) en la octava semana: el grupo diabético con *I. galbana* 300 ± 197.4 mg/dl, grupo diabético con *N. oculata* 487 ± 56.07 mg/dl y grupo diabético con glibenclamida 100 ± 2 mg/dl.

El grupo diabético con *N. oculata* y el grupo diabético sin tratamiento tuvieron valores superiores ($p<0.05$) al grupo diabético con glibenclamida y grupo control. En contraste, los niveles de glucosa de tres ratas del grupo diabético tratado con *I. galbana* estuvieron por debajo de 140mg/dl, incluso una de ellas mostró signos y síntomas de hipoglucemia (glucosa debajo de 40mg/dl, letargia) en la séptima y octava semana. El grupo diabético

con *N. oculata* no tuvo diferencias estadísticas significativas con el grupo diabético sin tratamiento y el grupo con *I. galbana*, en contraste, éstos dos últimos grupos fueron estadísticamente significativos al finalizar el estudio (Fig. 7).

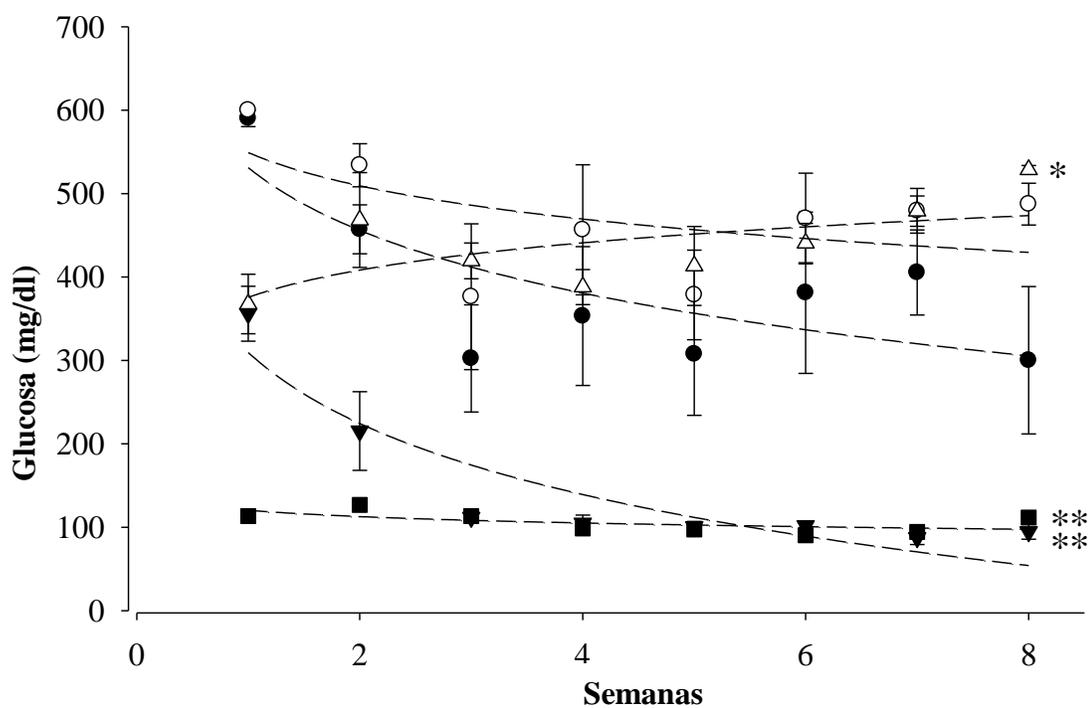


Figura 7. Concentración de glucosa de grupos diabéticos y grupo control. ■ Grupo control, ● grupo diabético tratado con *Isochrysis galbana*, ○ grupo diabético tratado con *Nannochloropsis oculata*, ▼ grupo diabético tratado con glibenclamida y △ grupo diabético sin tratamiento. Valores expresados en media \pm ES. * $p < 0.05$ vs. grupo diabético tratado con *I. galbana*. ** $p < 0.05$ vs. grupo diabético tratado con *N. oculata*.

7.1.9. Análisis de lípidos y lipoproteínas

Los niveles sanguíneos de colesterol en el grupo sano tratado con *I. galbana* fueron los menores (54 mg/dl), seguido del grupo sano tratado con *N. oculata* (61 mg/dl) y el grupo control (66 mg/dl). De los grupos diabéticos, el porcentaje menor fue en el grupo de *I. galbana* (70 mg/dl), seguido del grupo con *N. oculata* (73 mg/dl), el grupo tratado con glibenclamida (77mg/dl) y el grupo sin tratamiento (84mg/dl). El grupo diabético sin tratamiento mostró niveles superiores ($p<0.05$) a los grupos sanos tratados con microalga y el colesterol del grupo diabético con glibenclamida fue mayor ($p<0.05$) que el grupo sano tratado con *I. galbana* (Fig. 8A).

El valor promedio de triglicéridos fue similar en los grupos control y los grupos sanos tratados con microalga (18mg/dl). Los grupos con hiperglucemia tuvieron valores superiores al control, sin embargo, tres ratas diabéticas tratadas con *I. galbana* tuvieron niveles de triglicéridos iguales o menores al grupo control, de igual manera, dos ratas sanas tratadas con la misma microalga tuvieron niveles de triglicéridos menores al grupo control. No obstante, solo se encontraron diferencias estadísticas significativas entre el grupo diabético tratado con *N. oculata* y el grupo diabético con glibenclamida (Fig. 8B).

Con respecto a las lipoproteínas, no se encontraron diferencias de VLDL entre grupos ($p>0.05$), aunque el grupo diabético tratado con *N. oculata* obtuvo los valores más altos (60.64 mg/dl). La lipoproteína LDL fue superior en los grupos que recibieron microalga, ya sea sanos o diabéticos, sin embargo solo se encontraron diferencias estadísticas significativas al comparar los animales diabéticos tratados con *N. oculata* contra el grupo sano con *I. galbana* y el grupo control. El consumo de ambas microalgas disminuyó los valores de HDL en diabéticos y sanos, además de ser estadísticamente diferentes al grupo control y al grupo diabético sin tratamiento ($p<0.05$) (Fig. 8C, D).

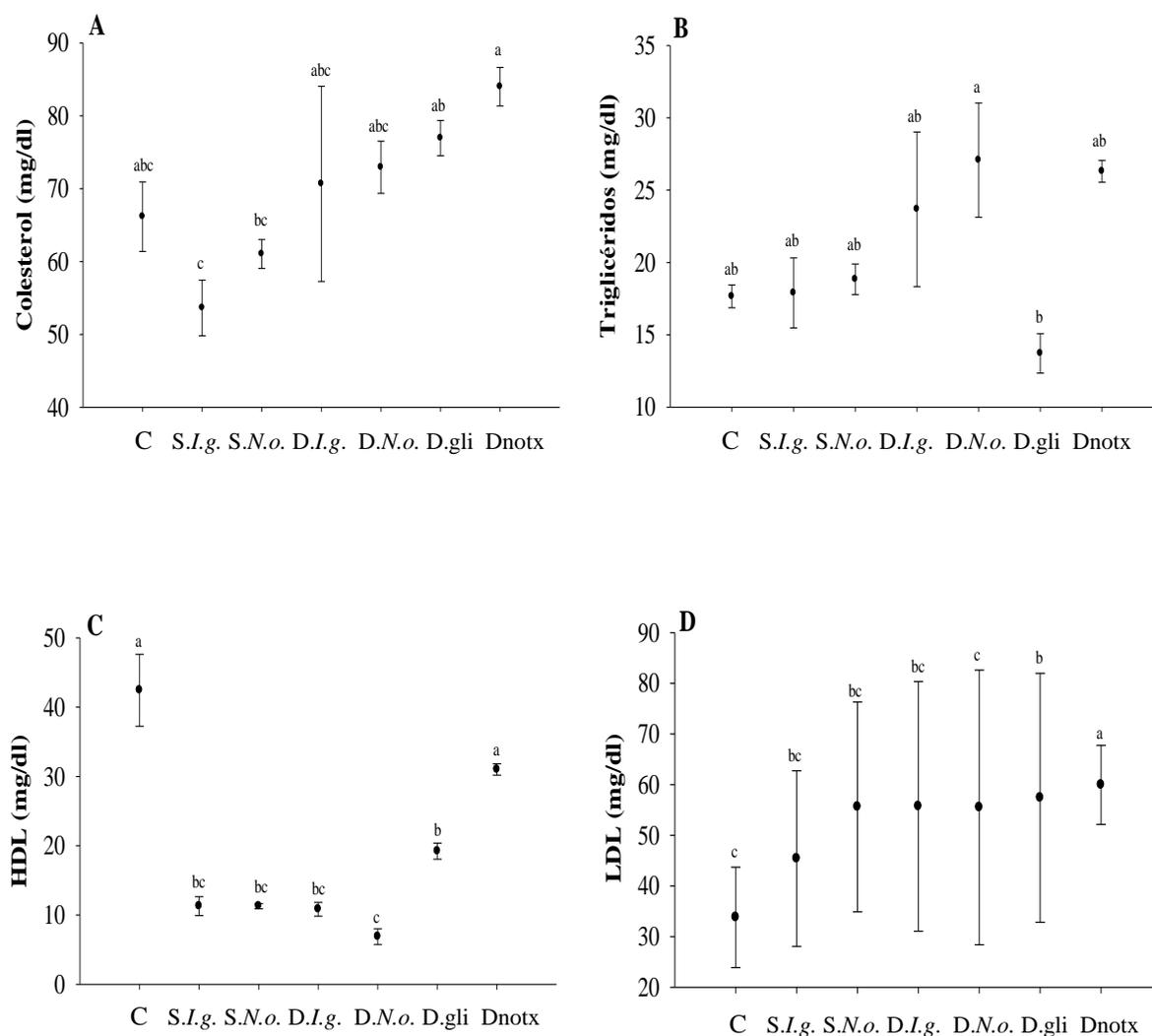


Figura 8. Concentración de lípidos y lipoproteínas de los grupos de estudio. (C) Control, (S.I.g.) grupo sano tratado con *Isochrysis galbana*, (S.N.o) grupo sano tratado con *Nannochloropsis oculata*, (D.I.g.) grupo diabético con *I. galbana*, (D.N.o) grupo diabético con *N. oculata*, (D. gli) grupo diabético con glibenclamida y (Dnotx) grupo diabético sin tratamiento. (A) Niveles de colesterol, (B) triglicéridos, (C) lipoproteína de alta densidad (HDL) y (D) lipoproteína de baja densidad (LDL). Los datos fueron expresados en media \pm ES. Los valores que no comparten la misma letra son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$).

7.1.10. Análisis de compuestos nitrogenados

No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre grupos en los diferentes compuestos nitrogenados. No obstante, se observaron niveles de ácido úrico mayores en el grupo diabético sin tratamiento (2.1mg/dl) y el grupo diabético con *N. oculata* (1.9mg/dl) a diferencia del grupo diabético con *I. galbana* (1.5mg/dl), diabético con glibenclamida (1.2mg/dl), grupo sano con *I. galbana* (1.5mg/dl), grupo sano con *N. oculata* (1.1mg/dl) y grupo control (1.0 mg/dl). Los valores de urea tuvieron un comportamiento similar al ácido úrico, siendo los niveles más altos los encontrados en el grupo diabético con *N. oculata* (59.5 mg/dl) y el grupo diabético sin tratamiento (61.3mg/dl), mientras que los grupos diabético con *I. galbana* (54.5mg/dl), diabético con glibenclamida (50.7mg/dl), sano con *N. oculata* (49.1mg/dl), diabético con *I. galbana* (48.9mg/dl) y control (48.6mg/dl) tuvieron niveles menores. Los valores de creatinina fueron similares en todos los grupos (0.45mg/dl).

7.1.11. Análisis histopatológico

Las secciones de tejido estudiadas mostraron dimensiones de 38 x 0.6 x 0.6 cm. Los resultados de las muestras del grupo control al igual que del sano tratado con *I. galbana*, tuvieron intestino revestido por epitelio cilíndrico propio sin datos histopatológicos de metaplasia, displasia o malignidad aunque en tres sujetos de dicho grupo se encontró una inflamación leve (Figura 9A). Las muestras del grupo tratado con *N. oculata* mostraron a cuatro sujetos con atrofia intestinal, de las cuales dos de ellas presentaron necrosis transmural. Solo un sujeto de este último grupo tuvo un intestino con histología normal pero con una periferia rodeada de adipocitos maduros que exhiben núcleos rechazados a la circunferencia.

Las secciones estudiadas del intestino de las ratas diabéticas sin tratamiento reflejaron un epitelio con datos de atrofia severa en zonas extensas además de aplanamiento de vellosidades e inflamación severa y una lámina propia con infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario y neutrofílico moderado pero negativo a malignidad (Fig. 9B). El tejido de los animales tratados con glibenclamida tuvieron secciones revestidas por un epitelio columnar con datos de inflamación y disminución leve en algunas zonas, además de un infiltrado linfoplasmocitario y neutrofílico moderado sin presencia de malignidad.

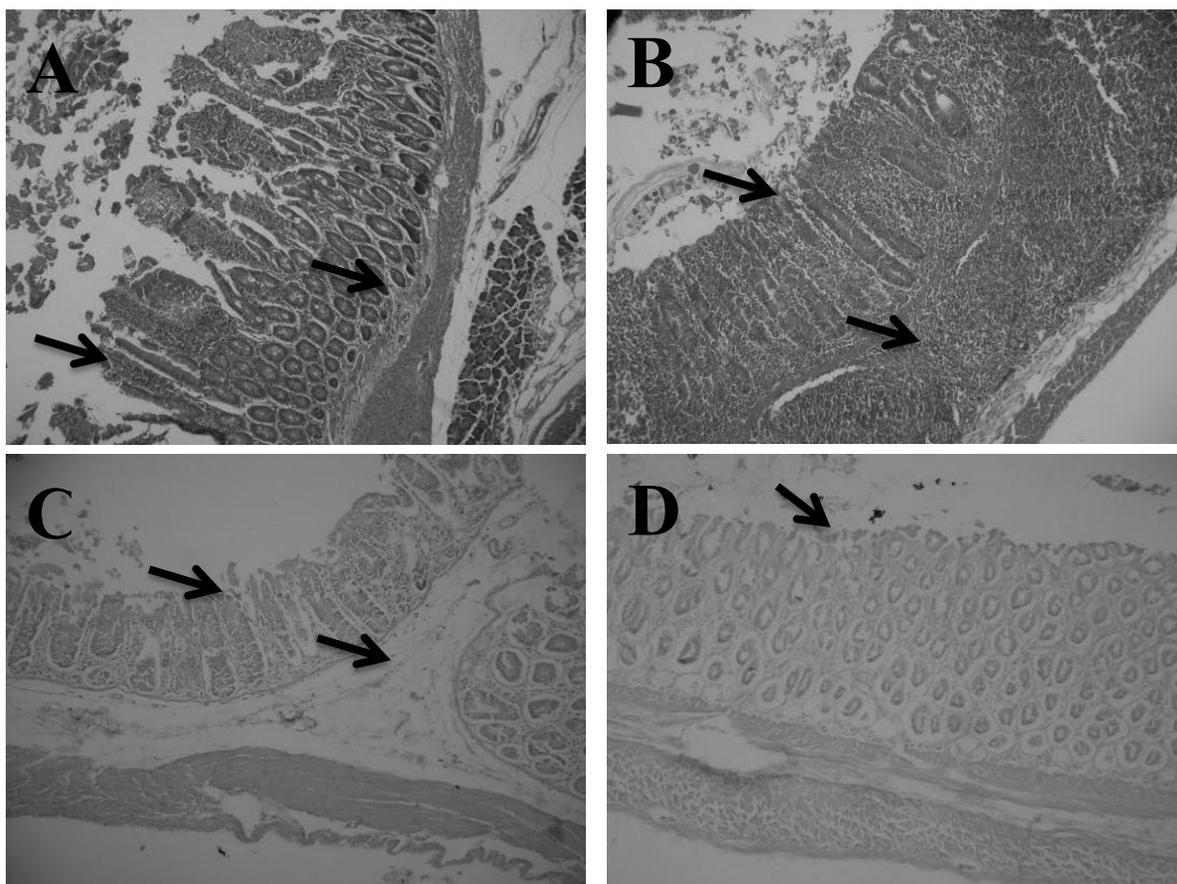


Figura 9. Efectos del consumo de microalgas en secciones de intestino delgado. (A) Grupo control, sección con vellosidades preservadas, histología normal (10x). (B) Grupo diabético sin tratamiento, sección con aplanamiento de vellosidades y proliferación de linfocitos (10x). (C) Grupo diabético tratado con *Isochrysis galbana*, sección con viabilidad de pared muscular y segmentos con daño local (10x). (D) Grupo diabético tratado con *Nannochloropsis oculata*, sección con necrosis total en la pared intestinal

Por su parte las muestras de los animales diabéticos tratados con de *I. galbana* tuvieron una lámina con moderado filtrado inflamatorio de linfocitos y neutrófilos con acúmulos linfoides con centros germinales, aumentados de tamaño con fragmentos de edema intersticial superficial con congestión capilar y sin metaplasia, displasia o malignidad. En cambio las secciones tisulares del grupo diabético tratado con *N. oculata* mostró revestimiento por un epitelio con zonas extensas de necrosis (Fig. 9 C, D; Fig. 10).

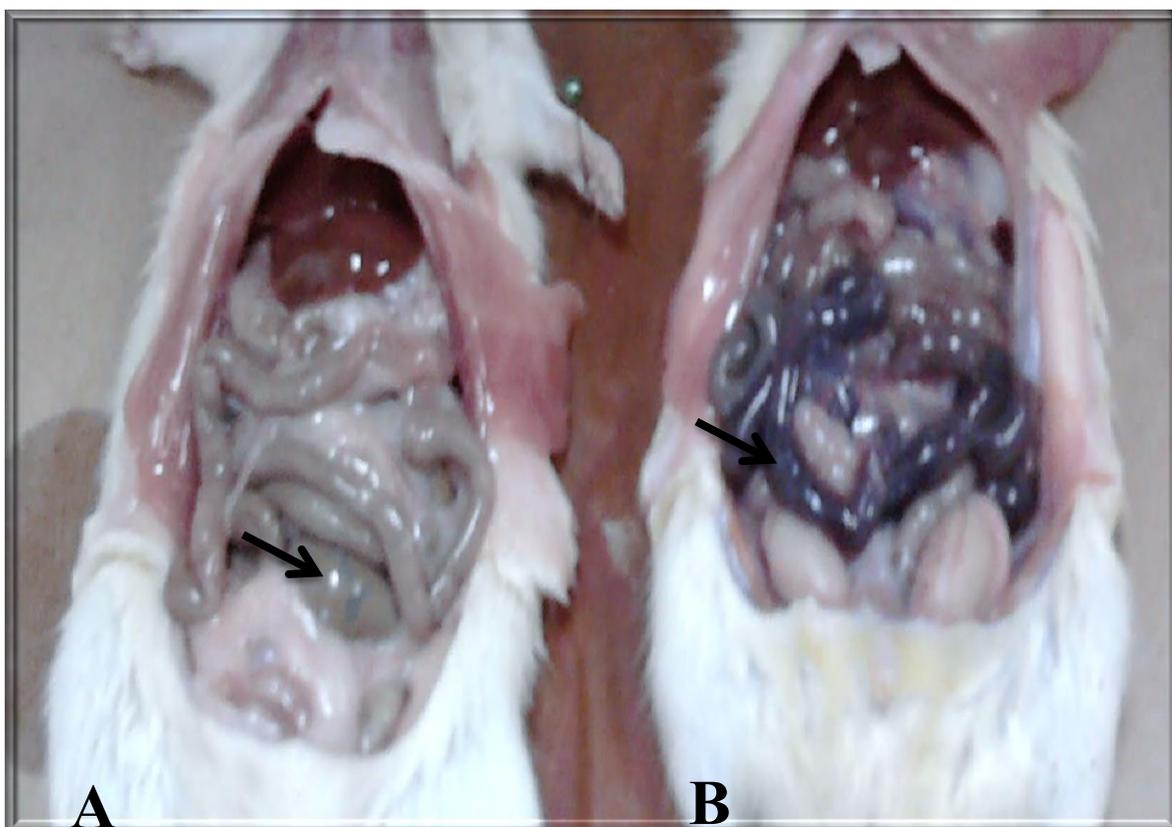


Figura 10. Imágenes macroscópicas de intestino delgado de ratas diabéticas tratadas con microalgas. (A) Rata diabética tratada con *Isochrysis galbana* con características de intestino normal y presencia de meteorismo. (B) Rata diabética tratada con *Nannochloropsis oculata* con segmentos de necrosis.

7.1.12. Cuantificación e identificación de bacterias ácido lácticas

El recuento de bacterias ácido lácticas no fue diferente entre el grupo control, el grupo sano tratado con *I. galbana*, el grupo sano tratado con *N. oculata*, grupo diabético sin tratamiento y grupo diabético con glibenclamida (6.3 log UFC/g). El grupo diabético con *N. oculata* obtuvo el menor ($p<0.05$) recuento (4.9 log UFC/g) y el grupo diabético tratado con *I. galbana* tuvo el mayor ($p<0.05$) recuento (7.1 log UFC/g) (Fig. 11).

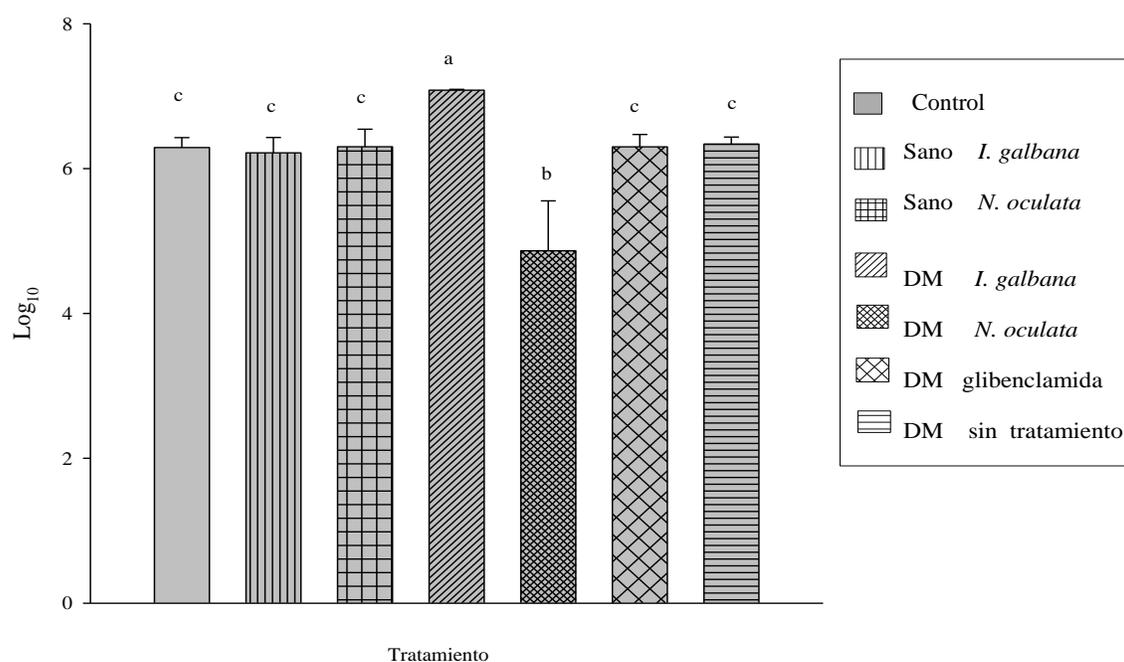


Figura 11. Recuento de bacterias ácido lácticas (Log₁₀) en los grupos de estudio. Las barras indican la media y el error estándar. Los valores que no comparten la misma letra son diferentes estadísticamente ($p<0.05$).

Lactococcus lactis fue la BAL más frecuente (90%) en el grupo control, sano con *I. galbana*, sano con *N. oculata* y el grupo diabético tratado con *I. galbana*. Esta especie fue seguida de *Lactobacillus brevis* (70%) y *Lactobacillus fermentum* (30%) en el grupo diabético con glibenclamida, diabético tratado con *N. oculata* y diabético sin tratamiento. Se encontraron levaduras en el grupo sano con *N. oculata*, diabético con *N. oculata* y diabético con glibenclamida.

7.1.13. *Enterobacteriaceae*

El análisis de materia fecal mostró como géneros predominantes a *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* y levaduras. Estas últimas solo se observaron en los grupos diabéticos tratados con glibenclamida y tratados con *N. oculata*. En menor proporción se identificó a *Providencia*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Morganiella*, *Hafnia* y *Edwardsiella*. Por otra parte *Salmonella* y *Shigella* fueron aislados del grupo diabético sin tratamiento y en los grupo diabético y sano con *N. oculata*. Es importante resaltar que los animales ya sean sanos o con hiperglucemia tratados con *N. oculata* perdieron durante el ensayo, presentaron diarrea y meteorismo.

El agrupamiento de comunidades bacterianas mostró similitud entre el grupo control y las ratas sanas tratadas con *I. galbana*, mientras que las comunidades bacterianas entre los grupos sanos y diabéticos tratados con *N. oculata* fueron similares. Los animales diabéticos tratados con *I. galbana* y glibenclamida mostraron agrupamientos semejantes (Fig. 12).

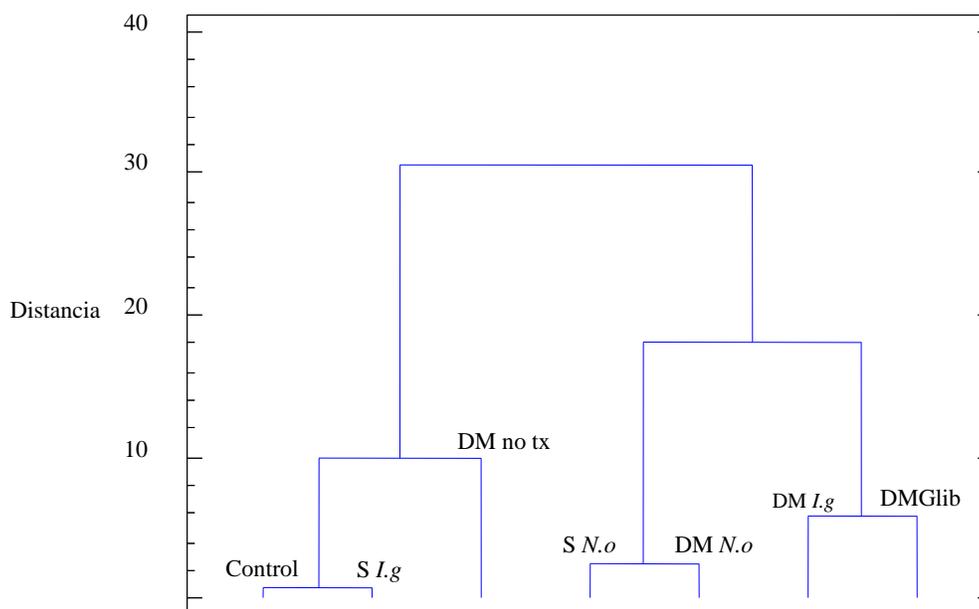


Figura 12. Agrupamiento de biota intestinal de los grupos de estudio. (S.I.g.) Grupo sano tratado con *Isochrysis galbana*, (S.N.o.) grupo sano tratado con *Nannochloropsis oculata*, (DM I.g) grupo diabético tratado con *I. galbana*, (DM N.o) grupo diabético tratado con *N. oculata*, (DM Glib) grupo diabético tratado con glibenclamida y (DM no tx) grupo diabético sin tratamiento.

7.2. SEGUNDA ETAPA

7.2.1. Ensayo biológico (segunda fase)

A diferencia del primer bioensayo, en el segundo experimento la obtención de biomasa microalgal fue por la técnica de floculación, por lo que debieron realizarse nuevamente los análisis para conocer la presencia de patógenos y composición nutricional.

7.2.2. Análisis microbiológico

Los resultados del análisis microbiológico de *I. galbana* no mostraron presencia de los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas*.

7.2.3. Análisis bromatológico

La composición proximal de *I. galbana* cosechada por floculación muestra una cantidad superior de proteínas, fibra total y cenizas además de un descenso en la concentración de lípidos y de carbohidratos en comparación de la muestra centrifugada utilizada en el bioensayo previo (Tabla IX).

Tabla IX. Composición proximal (% peso seco) de *Isochrysis galbana* por cada 100g de muestra

Carbohidratos	Lípidos	Proteínas	Fibra total	Cenizas
10 ±0.76	15 ±0.59	36 ±0.32	4.5±0.16	39 ±0.26

Por otra parte, se identificaron menor cantidad y tipos de ácidos grasos en la microalga floculada a diferencia de la utilizada en el primer experimento. No obstante, al igual que la *I. galbana* centrifugada, se observa que los ácidos grasos saturados palmítico y mirístico predominan sobre los mono y poliinsaturados (Tabla X).

Tabla X. Contenido de ácidos grasos (mg/g) de *I. galbana* cosechada por floculación-NaOH

Ácidos grasos	Nomenclatura	Concentración
Láurico	12:0	0.001
Mirístico	14:0	0.163
Miristoleico	14:1	0.004
Pentadecaenoico	15:0	0.030
Palmítico	16:0	0.100
Palmitoleico	16:1	0.025
Margárico	17:0	0.004
Estearico	18:0	0.008
Oleico	18:1 n9 c	0.070
Linoleico	18:2 n6 c	0.018
Gamalinolénico	18:3 n6 t	0.003
Gamalinolénico	18:3 n6 c	0.030
Behénico	22:0	0.001
Eicosapentaenoico	20:5 n3 c	0.002
Docosahexaenoico	22:6 n3 c	0.060
Σ		0.519
Saturados		0.307
Monoinsaturados		0.099
Poliinsaturados		0.113
Omega 3		0.095
Omega 6		0.018

La concentración de sales muestra un porcentaje bajo por cada 100g de muestra, lo que disminuye el riesgo de formación de cristales en los animales de experimentación (Tabla X).

Tabla XI. Porcentaje de sales de *Isochrysis galbana* por cada 100g de muestra

Sodio	Calcio	Magnesio	Potasio	Fósforo
3.32 ± 0.08	0.02 ± 0.01	5.70 ± 0.11	0.03 ± 0.02	0.07 0.01

7.2.4. Peso corporal

Los grupos de estudio tuvieron un peso inicial promedio de 294 ± 6.24 g ($p > 0.05$). El grupo control y sano con tratamiento de *I. galbana* tuvieron ganancia de peso constante, sin embargo el grupo sano con microalga obtuvo un peso final inferior (299 ± 40 g) en comparación al grupo control (403 ± 45 g), siendo 104 g menor y estadísticamente diferente ($p < 0.05$). Los grupos diabéticos disminuyeron su peso corporal en el transcurso del estudio con diferencias estadísticas significativas al grupo sano con tratamiento de microalga y control (Fig. 13). Por otra parte, el grupo diabético sin tratamiento mostró un peso final inferior (208 ± 42) al diabético tratado con *I. galbana* (237 ± 14.8 g) con diferencias estadísticas significativas $p < 0.05$.

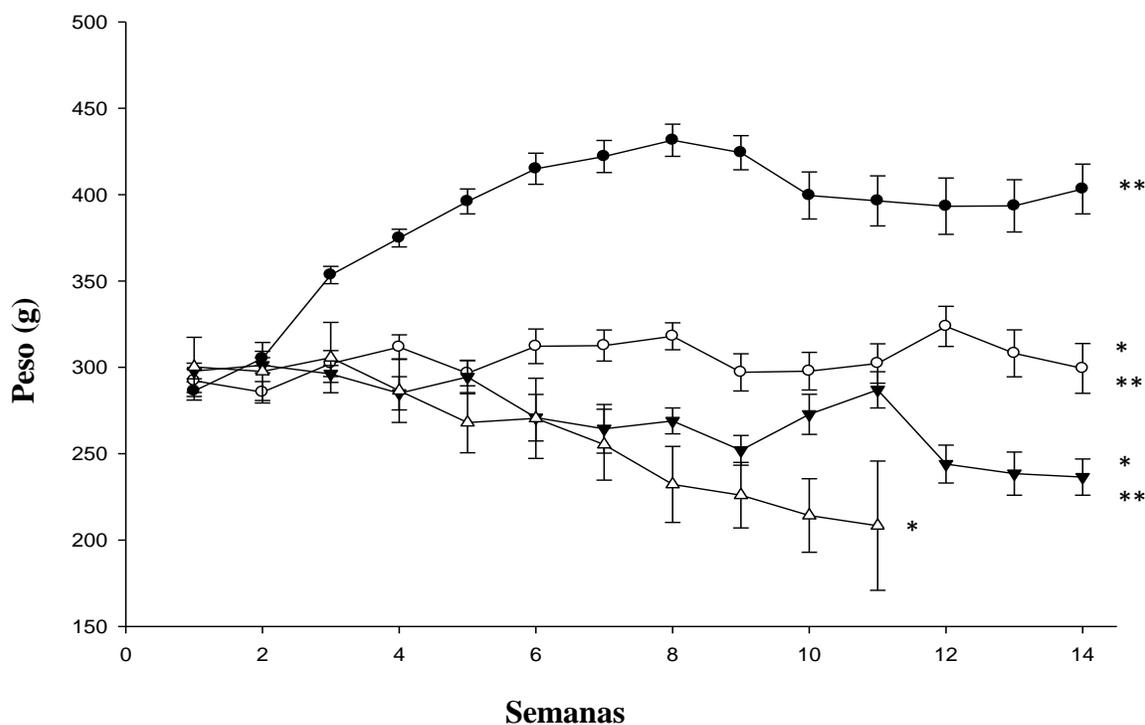


Figura 13. Peso corporal en los grupos de estudio ● Grupo control, ○ grupo sano tratado con *Isochrysis galbana*, ▼ grupo diabético tratado con *I. galbana* y △ grupo diabético sin tratamiento. Valores expresados en media \pm ES. * $p < 0.05$ vs. grupo control. ** $p < 0.05$ vs. grupo diabético sin tratamiento

7.2.5. Glucosa sérica y hemoglobina glucosilada

El valor promedio de la glucosa inicial en los grupos sanos fue de 104 ± 23 mg/dl y para los grupos con hiperglucemia fue de 333 ± 22.3 mg/dl. La glucosa del grupo control en el transcurso de las 14 semanas fue aproximadamente de 93 ± 2.9 mg/dl mientras que el grupo sano con tratamiento de *I. galbana* fue de 79 ± 4.0 mg/dl. No se encontraron diferencias estadísticas entre dichos grupos Cabe mencionar que dos ratas del grupo sano con tratamiento de microalga presentaron cuadro de hipoglucemia (glucosa < 35 mg/dl) en más de una ocasión, lo que provocó su muerte. No se encontró diferencias $p > 0.05$ en el porcentaje de hemoglobina glucosilada total (4.6%) entre estos grupos de estudio (Fig. 14).

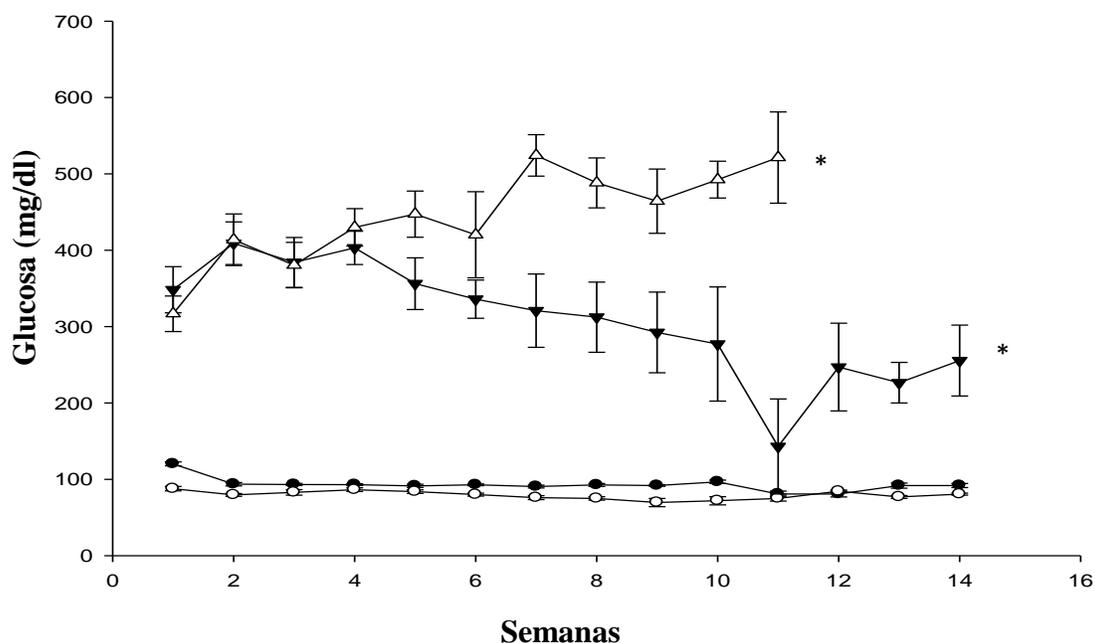


Figura 14. Glucosa de grupos de estudio a lo largo del estudio. ● Grupo control, ○ grupo sano tratado con *Isochrysis galbana*, ▼ grupo diabético tratado con *I. galbana* y △ grupo diabético sin tratamiento. Valores expresados en media \pm ES. * $p < 0.05$ vs. grupo control

El grupo diabético sin tratamiento obtuvo un valor promedio de glucosa de 445 ± 62.5 mg/dl durante el estudio, el poco control de la hiperglucemia aumentó la mortalidad de dicho grupo en la semana once. Por su parte el grupo diabético con tratamiento de *I. galbana* mantuvo una glucosa promedio de 308 ± 74.2 mg/dl, encontrándose animales con valores inferiores a los 200mg/dl en diversas ocasiones y dos sujetos con hipoglucemia. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticas significativas. Por su parte, la hemoglobina glucosilada total del grupo diabético con *I. galbana* fue en promedio de 9.1% lo cual indica un regular control de su glucosa durante el estudio, mientras que el grupo diabético sin tratamiento obtuvo un porcentaje promedio de 9.5% aunque no se encontraron diferencias estadísticas significativas

7.2.6. Lípidos y lipoproteínas

El valor promedio de colesterol del grupo control fue superior (86 ± 27.6 mg/dl) al grupo sano tratado con *Isochrysis galbana* (68 ± 9.5 mg/dl) encontrándose diferencias estadísticas significativas. El grupo diabético sin tratamiento presentó niveles de colesterol superiores (91 ± 53 mg/dl) al grupo diabético tratado con microalga (76 ± 16.7 mg/dl) aunque sin diferencias estadísticas significativas entre éstos, a pesar de que el grupo con hiperglucemia tratado con *Isochrysis galbana* obtuvo valores de colesterol en algunos animales iguales o menores al grupo control (Fig. 15 A).

Por otra parte, el grupo diabético sin tratamiento obtuvo el valor promedio (83 ± 53 mg/dl) de triglicéridos más alto, seguido del grupo diabético tratado con *I. galbana* (75 ± 64 mg/dl), el grupo control (29 ± 9.8 mg/dl) y el grupo sano con tratamiento de *Isochrysis galbana* (19 ± 7.1 mg/dl). Se observaron diferencias estadísticas significativas entre el grupo control y el resto de los grupos de estudio, así mismo al comparar el grupo sano tratado con *I. galbana* contra los grupos diabéticos ($p < 0.05$) (Fig. 15 B). Con respecto a las lipoproteínas, se observó que el valor de LDL fue mayor en el grupo sano con tratamiento de *I. galbana* (18 ± 5.1 mg/dl) con diferencias estadísticas significativas ante el resto de los grupos de estudio (12 ± 3 mg/dl).

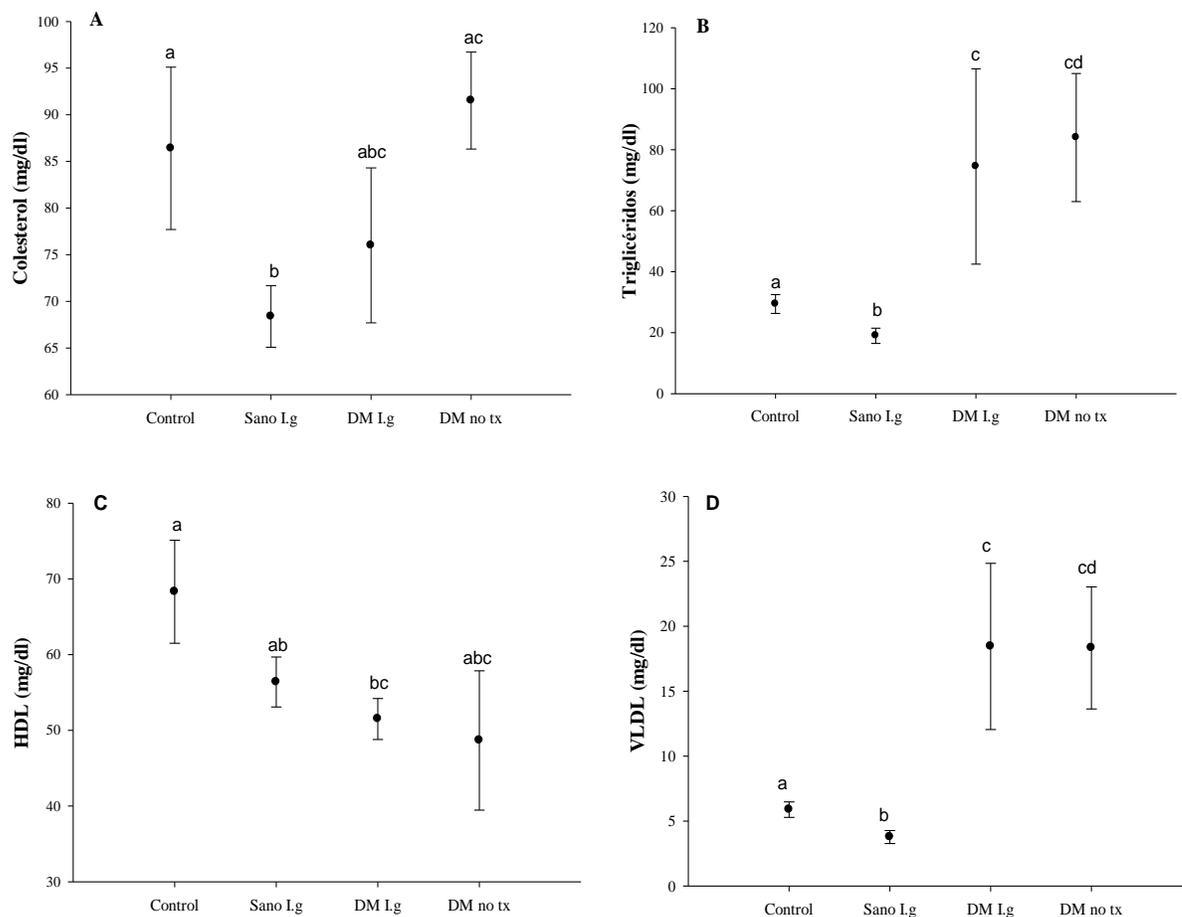


Figura 15. Concentración de lípidos y lipoproteínas de los grupos de estudio. (C) Control, (Sano I.g.) grupo sano tratado con *Isochrysis galbana*, (DM I.g.) grupo diabético con *I. galbana*, y (DMnotx) grupo diabético sin tratamiento. (A) Niveles de colesterol, (B) triglicéridos, (C) lipoproteína de alta densidad (HDL) y (D) lipoproteína de muy baja densidad (VLDL). Los datos fueron expresados en media±ES. Los valores que no comparten la misma letra son diferentes estadísticamente ($p<0.05$).

La lipoproteína de alta densidad fue superior en el grupo control (68 ± 21.6 mg/dl), similar en el grupo sano y diabético tratados con *I. galbana* (~ 54 mg/dl) e inferior en el grupo diabético sin tratamiento (49 ± 16 mg/dl). Al comparar la HDL se observaron diferencias ($p<0.05$) entre el grupo control y el grupo diabético sin tratamiento, así como entre el grupo sano con tratamiento de *I. galbana* y el grupo diabético sin tratamiento (Fig. 15C).

Los valores de VLDL fueron superiores para los grupos diabéticos (18 mg/dl) siendo éstos, estadísticamente diferentes al grupo control (6 ± 2 mg/dl) y al grupo sano con tratamiento con *I. galbana* (4 ± 1.4 mg/dl) (Fig. 15D)

7.2.7. Histopatológicos

Las secciones de tejido intestinal mostraron dimensiones de $38 \times 0.6 \times 0.6$ cm. Los resultados de las muestras del grupo control al igual que del sano tratado con *I. galbana*, tuvieron intestino revestido por epitelio cilíndrico propio sin datos histopatológicos de metaplasia, displasia o malignidad. El grupo diabético sin tratamiento reflejó un epitelio con datos de atrofia severa en zonas extensas además de aplanamiento de vellosidades e inflamación severa y una lámina propia con infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario y neutrofílico moderado pero negativo a malignidad (Fig. 16A). No se encontraron daños histopatológicos a nivel renal y hepático (Fig. 16B,C)

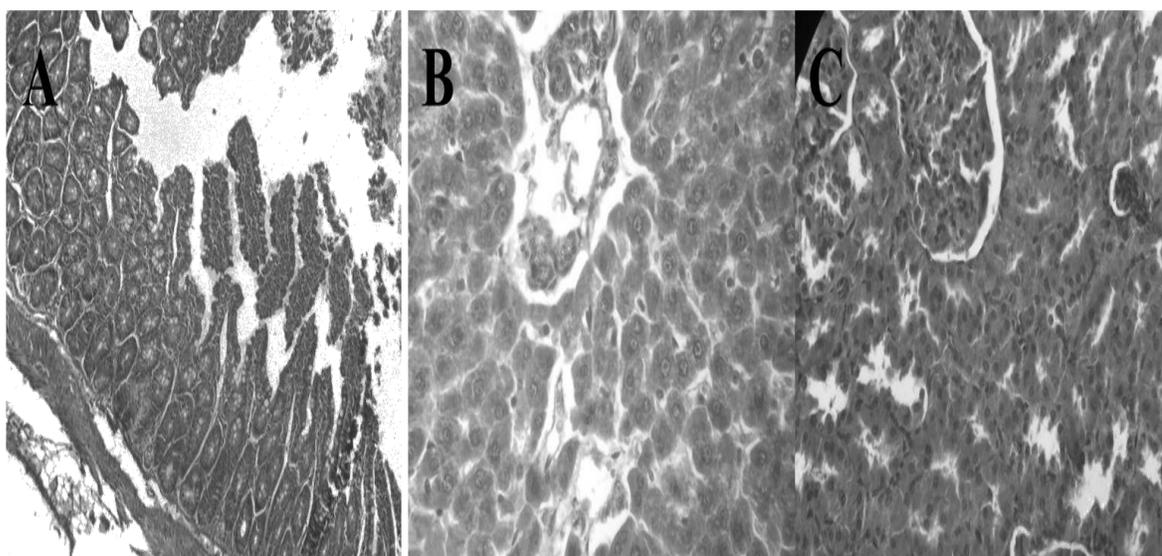


Figura 16. Efectos del consumo de *Isochrysis galbana* en el grupo diabético en secciones de intestino delgado, hígado y riñón. (A) Intestino, sección con vellosidades preservadas, histología normal (10x). (B) Hígado, (10x). (C) Riñón, (10x).

7.2.8. Recuento e identificación de bacterias ácido lácticas (BAL)

El recuento de bacterias ácido lácticas fue superior al bioensayo anterior. El grupo diabético con tratamiento de *I. galbana* obtuvo el mayor recuento (9.2 log UFC/g), seguido del grupo control (8.5 UFC/g), el grupo sano con tratamiento de microalga (8 log UFC/g) y el grupo diabético sin tratamiento (7.3 log UFC/g). Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre todos los grupos de estudio (Fig. 17).

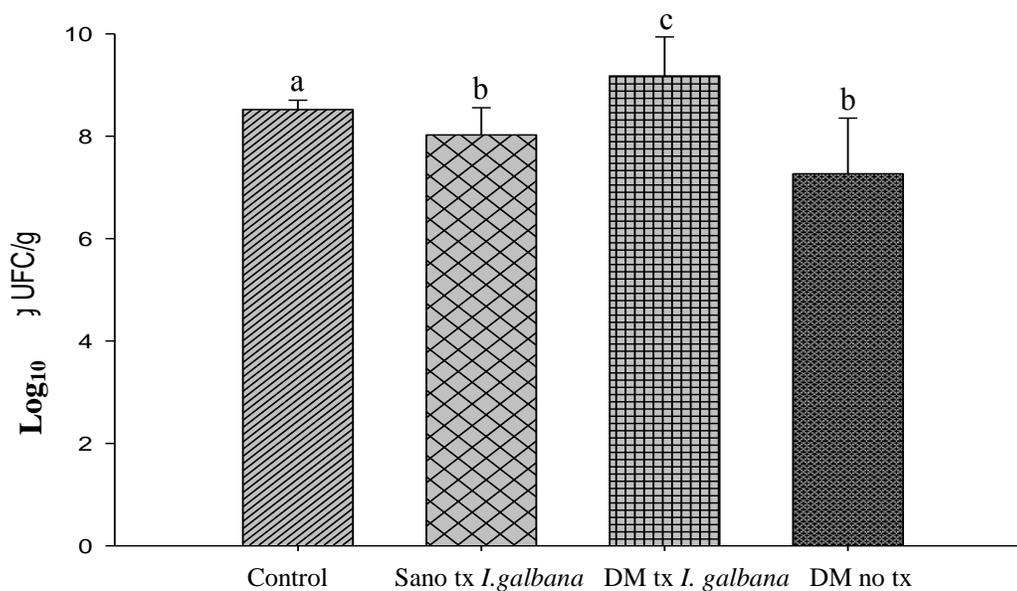


Figura 17. Recuento de bacterias ácido lácticas (Log₁₀) de los grupos de estudio. Las barras indican la media y el error estándar. Los valores que no comparten la misma letra son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$).

Las especies de BAL se encontraron en la diferente proporción por grupo de estudio. El grupo control y el grupo sano con microalga presentaron con mayor frecuencia *Lactobacillus plantarum* (70-80%), seguido de *Lactococcus lactis* (10-25%), *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus fermentum* (5-10%).

El grupo diabético con *Isochrysis galbana* mostró en mayor proporción a *L. lactis* (70%), seguido de *L. plantarum* (20%), *L. brevis* y *L. fermentum* (10%). Por su parte el grupo diabético sin tratamiento presentó un porcentaje similar entre de *L. lactis* (45%) y *L. brevis* (45%) mientras que *L. fermentum* estuvo en una menor proporción (10%) (Fig. 18).

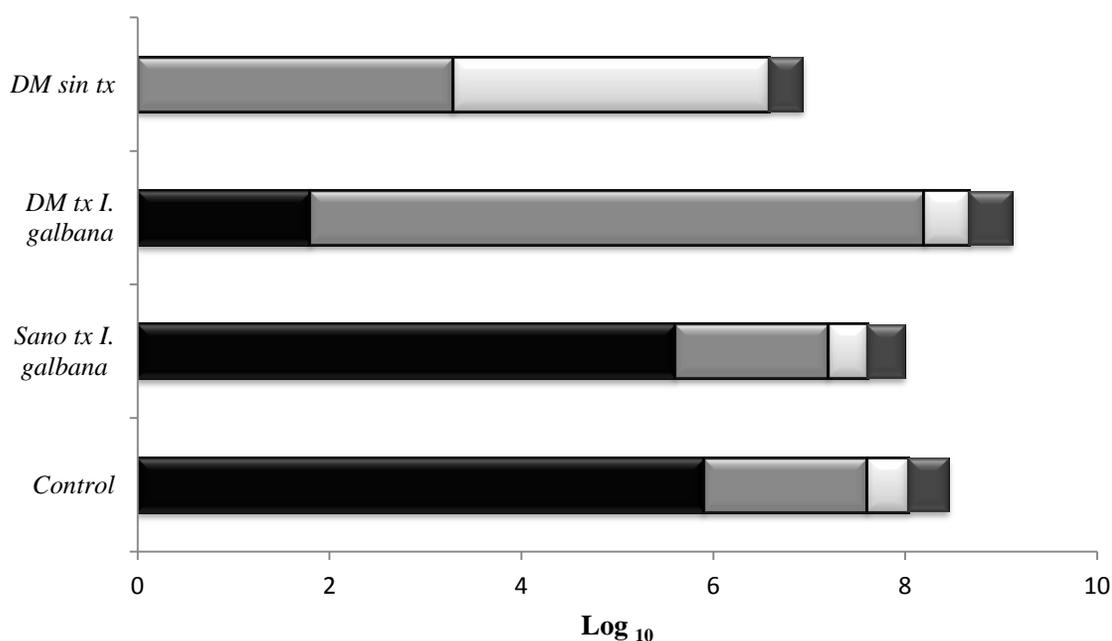


Figura 18. Proporción de bacterias ácido lácticas en los diferentes grupos de estudio.

■ *Lactobacillus plantarum*, ■ *Lactococcus lactis*, ■ *Lactobacillus brevis*, ■ *Lactobacillus fermentum*

7.2.9. Recuento e identificación de enterobacterias

El recuento mayor de enterobacterias fue en el grupo diabético sin tratamiento (6.9 log UFC/g), seguido del grupo sano con tratamiento de microalga (6.1 log UFC/g), el grupo diabético con tratamiento de *I. galbana* (5.5 log UFC/g) y finalmente el grupo control (4.9 log UFC/g).

Se observaron diferencias estadísticas significativas al comparar al grupo control contra el grupo sano con tratamiento de *I. galbana* y el grupo diabético sin tratamiento (Fig. 19). Por otra parte, se observó similitud al bioensayo anterior con respecto a los géneros bacterianos predominantes y los de menor proporción.

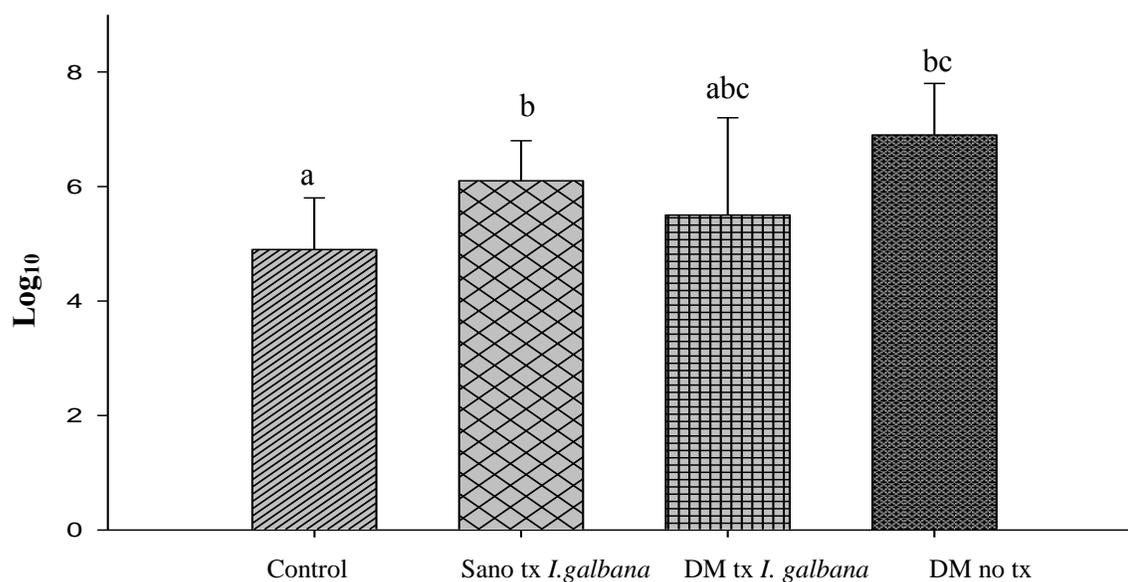


Figura 19. Recuento de enterobacterias (Log₁₀) de los grupos de estudio. Las barras indican la media y el error estándar. Los valores que no comparten la misma letra son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$).

7.2.10. Factor de necrosis tumoral alfa, Interleucina 6, leptina y péptido similar al glucagón tipo 1

El grupo diabético sin tratamiento obtuvo el valor de TNF α superior (119 pg/ml) además de ser estadísticamente diferente al resto de los grupos (49pg/ml). Por su parte la interleucina 6 fue inferior en el grupo control (207pg/ml), seguido de los grupos enfermo (282 pg/ml), sano tratado con *I. galbana* (272 pg/ml) y el grupo diabético sin tratamiento (733 pg/ml). Se observaron diferencias estadísticas significativas entre el grupo diabético sin tratamiento y el resto de los grupos de estudio (Fig.20).

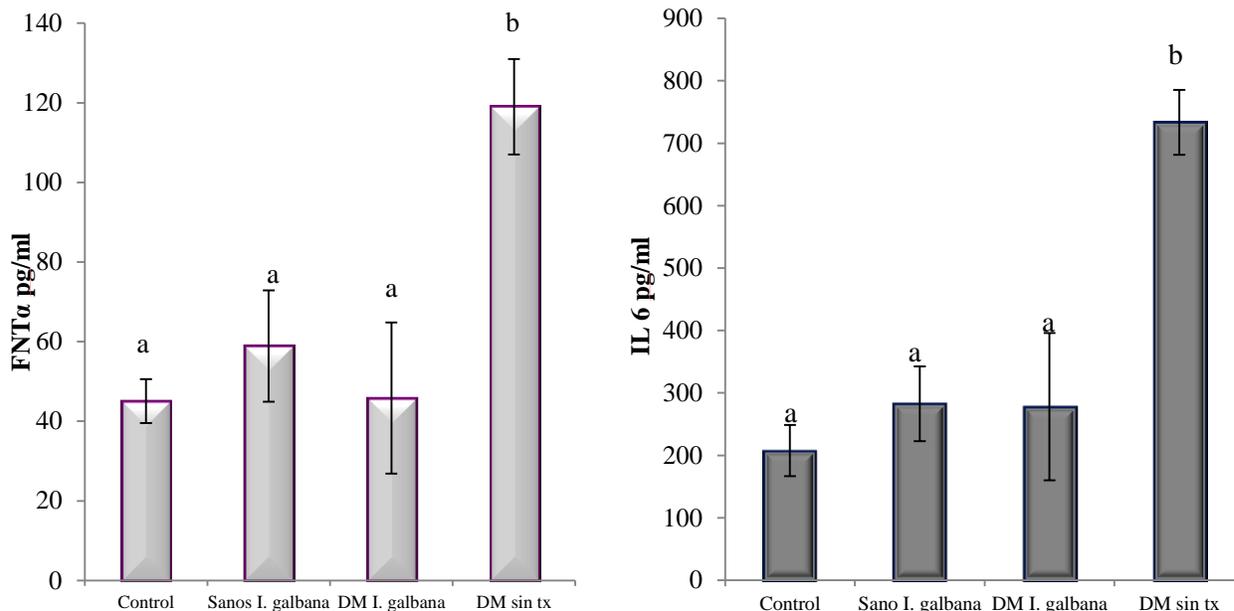


Figura 20. Valores de TNF- α e IL6 (pg/ml) de los grupos de estudio. Las barras indican la media y el error estándar. Los valores que no comparten la misma letra son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$).

Los niveles de leptina fueron superiores en el grupo diabético tratado con *I. galbana* (1705 ± 274.2 pg/ml), seguido del grupo diabético sin tratamiento (1539 ± 424.9 pg/ml), grupo sano tratado con microalga (1306 ± 212.8 pg/ml) y control (912 ± 52.1 pg/ml). Se encontraron diferencias estadísticas significativas al comparar el grupo control con el resto de los grupos (Fig. 21).

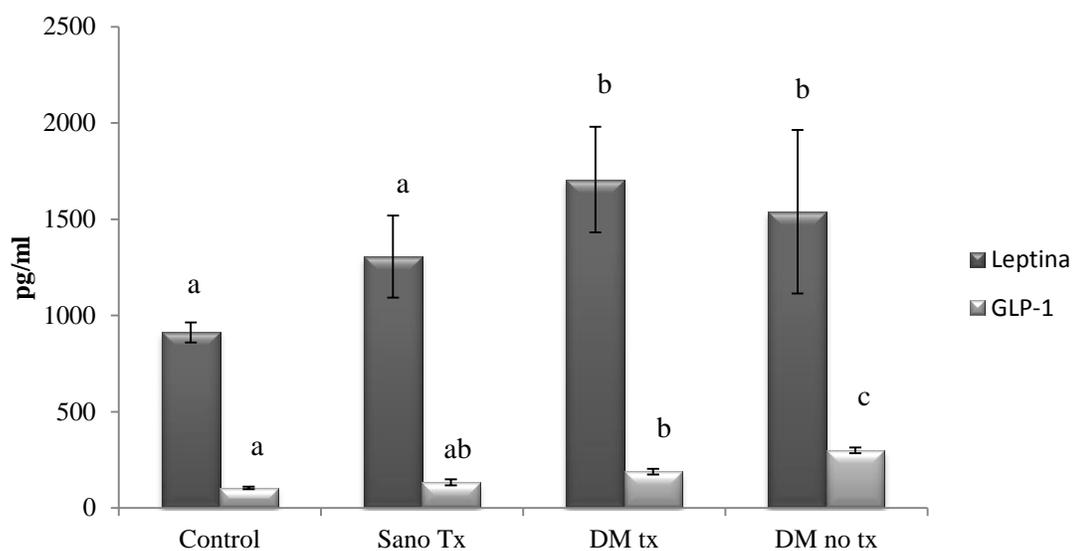


Figura 21. Valores de Leptina y GLP-1 (pg/ml) de los grupos de estudio. Las barras indican la media y el error estándar. Los valores que no comparten la misma letra son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$).

Por su parte, GLP-1 fue superior en el grupo diabético sin tratamiento (299 ± 15.1 pg/ml), seguido del grupo diabético tratado con *I. galbana* (189 ± 14.8 pg/ml), grupo sano tratado con microalga (132 ± 15.4 pg/ml) y grupo control (104.2 ± 7.3 pg/ml). La comparación entre grupos de estudio mostró diferencias entre el grupo diabético sin tratamiento ($p < 0.05$) y el resto de grupos de estudio, asimismo el grupo diabético tratado con *Isochrysis galbana* contra el grupo control ($p < 0.05$) (Fig. 21).

7.2.11. Microarreglo

La verificación del material genético se realizó en gel de agarosa observándose la fragmentación del ARN en una subunidad grande y subunidad pequeña (Fig. 22).

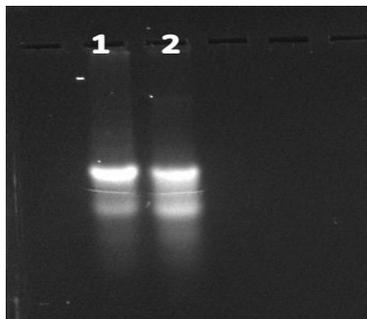


Figura 22. Verificación de ARN de hígado del grupo diabético con tratamiento de *Isochrysis galbana* (Carril 2) y marcador de peso molecular de hígado de ratón (Carril 1).

Las señales de fluorescencia contenidas en el microarreglo derivadas de la hibridación del *DNAc* fueron escaneadas y se generaron imágenes que permitieron el análisis estadístico, puntaje Z, para realizar la comparación entre tratamientos (Fig.23).

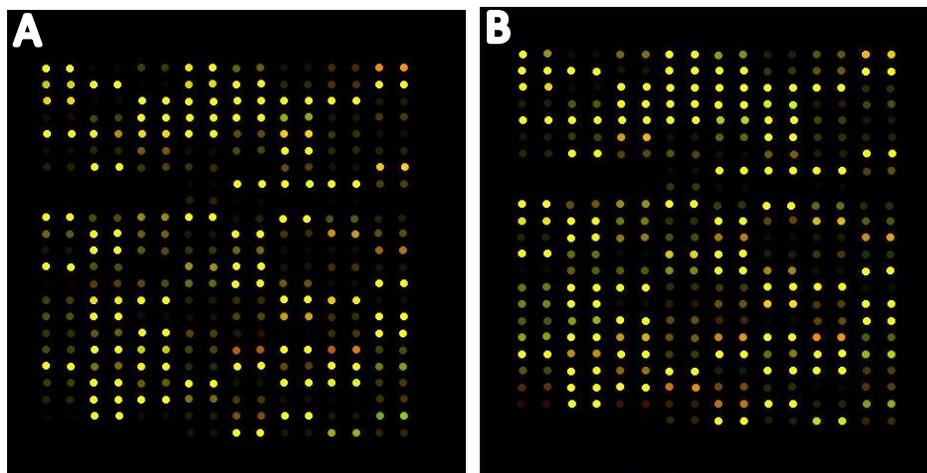


Figura 23. Fragmento de microarreglo de hígado de rata. **A**, señal de fluorescencia de grupo sano tratado con *Isochrysis galbana*. **B**, señal de fluorescencia de grupo diabético tratado con microalga. Los puntos verdes o tonalidades amarillo indican incremento en la expresión génica. Los puntos rojos o naranjas indican disminución de expresión.

El puntaje z (z score) permite conocer aquellos datos significativos y que representan un cambio al haber aumentado o disminuido su expresión (Figura 24).

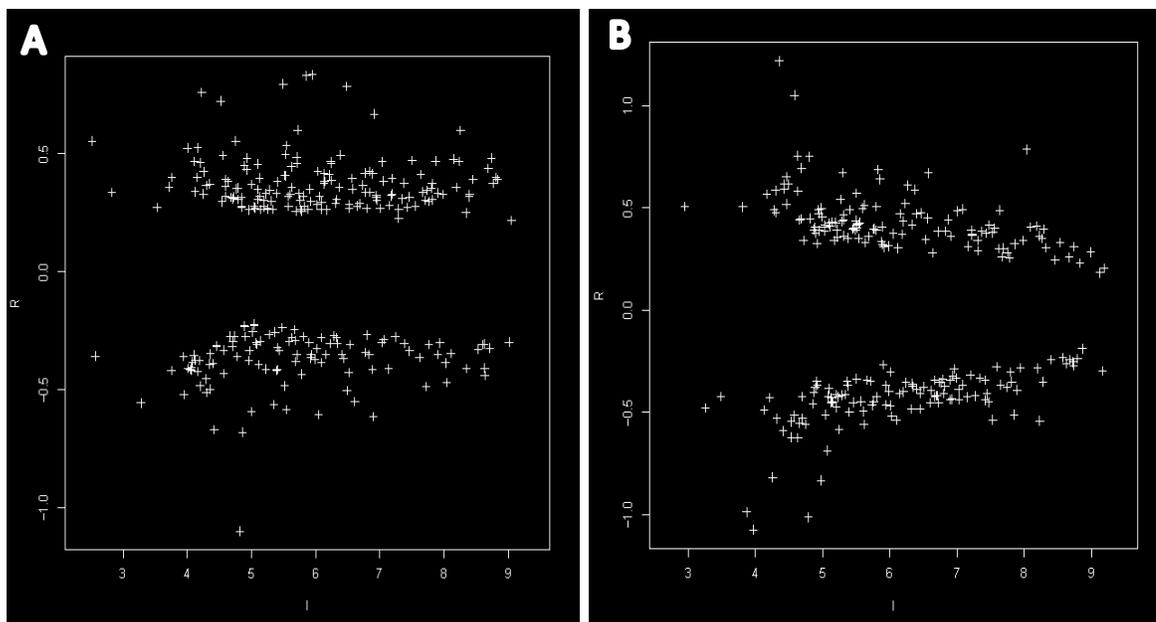


Figura 24. Análisis de genes de microarreglo de hígado de rata con puntaje $z > 2$. **A**, genes de grupo sano tratado con *Isochrysis galbana* vs grupo control. **B**, genes de grupo diabético tratado con microalga vs grupo diabético sin tratamiento.

Los genes fueron analizados en el programa *David Information Resources* obteniendo información sobre su jerarquía de ontología: función molecular, actividad en procesos biológicos y localización como componente celular. Así mismo se realizó el análisis de analogía génica entre grupos tratados con microalga a partir del programa GenArise y VennPlex. Se observaron genes análogos, 93 arriba de 2 z score y 146 abajo 2 z score, entre el grupo diabético tratado con microalga y el grupo diabético sin tratamiento, mientras que entre los grupos diabético tratado con *I. galbana*, grupo sano con microalga y grupo diabético sin tratamiento se reportó una similitud génica de 57 genes arriba de 2 z score y 32 por debajo de 2 z score (Fig. 25).

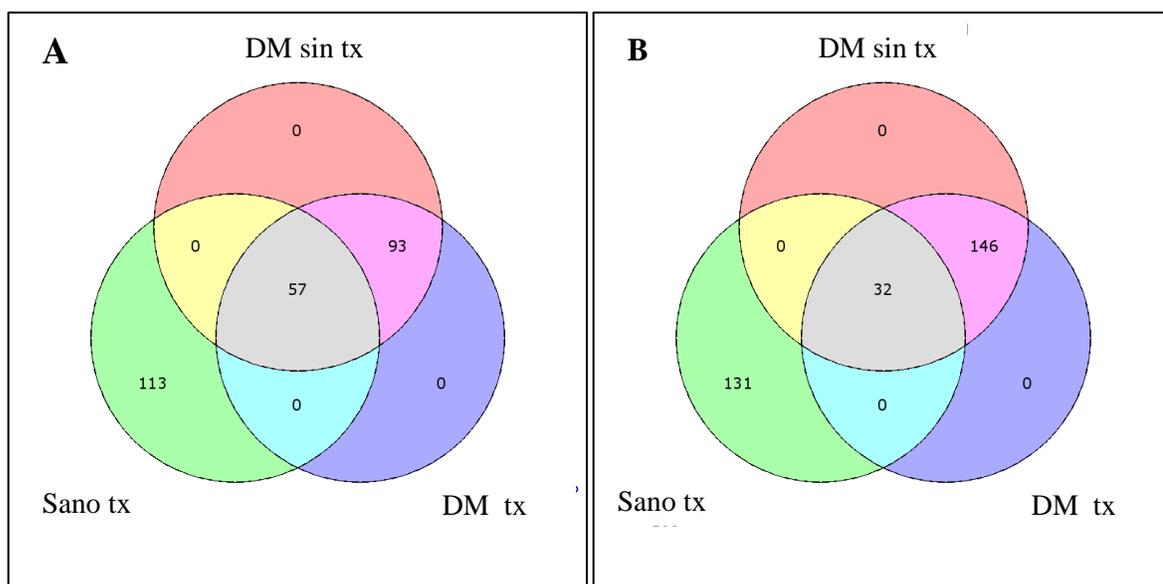


Figura 25. Gráfico de Venn con analogía en expresión génica entre grupo diabético sin tratamiento (DM sin tx), diabético tratado con *Isochrysis galbana* (DM tx) y grupo sano con tratamiento de *I. galbana* (Sano tx). **A**, genes arriba de 2 z score. **B**, genes debajo de 2 z score.

A partir de los resultados de los grupos de estudio que fueron tratados con *Isochrysis galbana*, se seleccionaron los genes con participación en alteraciones metabólicas de importancia. En general se observó una mayor cantidad de cambios en relación al metabolismo de lípidos e insulina en ambos grupos estudio sano y diabético. Mientras que en menor proporción estuvieron aquellos relacionados con el metabolismo de carbohidratos y proteínas. Se encontraron similitudes entre dichos grupos de estudio con cuatro genes arriba de 2 z score y tres genes por debajo de 2 z score (Fig. 26)

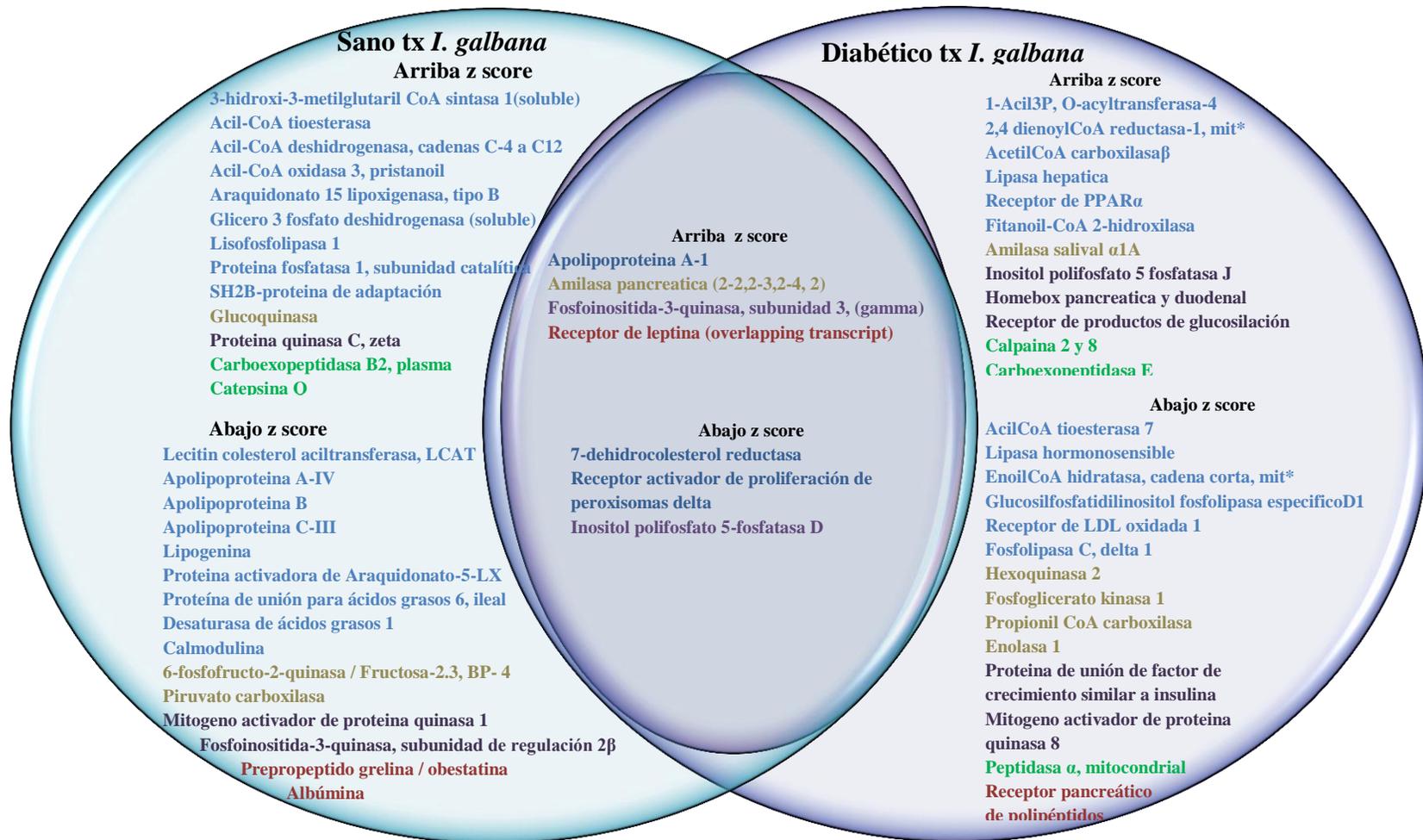


Figura 26. Gráfica de Venn con analogía de genes relacionados con metabolismo de macronutrientes entre el grupo sano tratado con *Isochrysis galbana* y grupo diabético tratado con *I. galbana*. Lípidos, leyenda color azul. Carbohidratos, leyenda color café. Proteínas, leyenda color verde. Insulina, leyenda color morado. Factores de regulación oroxigénica, leyenda color tinto. *mit, mitocondrial

Los genes sobreexpresados relacionados con metabolismo de lípidos del grupo sano tratado con *Isochrysis galbana* muestran un incremento en la obtención de energía a partir de la movilización de ácidos grasos para ingresar a beta oxidación y formación de cuerpos cetónicos. Con respecto a la regulación de insulina se observó un incremento en los genes implicados en la fosforilización de receptores de insulina y la alteración en la sensibilidad a ésta. Por último la glucoquinasa activada en gluconeogénesis se vio sobreexpresada (Tabla XII). En este mismo grupo de estudio se vieron reprimidos genes que intervienen en biosíntesis de ácidos grasos y colesterol además de las lipoproteínas encargadas del transporte lípidos y el complejo enzimático cuya función se relaciona con la esterificación de colesterol oxidado. Así mismo se vieron suprimidos genes relacionados con la regulación de glucólisis, el ciclo oroxigénico y factores que participan en la mejora de la sensibilidad a la insulina (Tabla XII).

El grupo diabético tratado con *I. galbana* muestra una tendencia similar a la del grupo sano tratado con microalga. No obstante, fue diferente la cantidad y el tipo de la mayoría de los genes expresados en comparación al grupo sano tratado con microalga. El grupo diabético tratado con microalga muestra un incremento de los genes con relación a la formación de triglicéridos por incremento de ácido graso palmítico, así como genes para la expresión enzimas relacionadas con la hidrólisis de polisacáridos, vía de activación y sensibilidad a la insulina así como el receptor de leptina relacionado con la saciedad (Tabla XIII).

Tabla XII . Genes de relevancia en el grupo sano tratado con *Isochrysis galbana*

	<i>Gen</i>	<i>Vía metabólica</i>		
	Lípidos	3-Hidroxi-3metilglutaril CoA sintasa 1 AcylCoA tioesterasa 7 AcylCoA deshidrogenasa C-4 to C-12 AcylCoA oxidasa 3, pristanoyl Apolipoproteína A-I	Metabolismo de colesterol Metabolismo de cuerpos cetónicos Regula niveles intracelulares de ácidos grasos libres y CoA Biosíntesis de palmitato Beta oxidación Beta oxidación Transporte reverso de colesterol, maduración de HDL	
	Mayor 2 z- score	Insulina	SHB2-Proteína 2, APS Proteína quinasa C Fosfoinositol 1,3 kinasa, P13K Calmodulina Transportador de ácidos grasos, FATP	Sustrato para la proteína quinasa B/akt Estimula toma de glucosa por insulina Fosforilización de tirosina Disminución sensibilidad a la insulina Activado por fosforilización de receptor de insulina, insulinemia Activa kinasas y fosfatasas en vía insulínica Trasporte de membrana de ácidos grasos
		Carbohidratos	Glucocinasa	Glucolisis/Gluconeogénesis
		Oroxigénico	Receptor de leptina	Saciedad / sensibilidad a la insulina
		Menor 2 z score	Lípidos	7-dehidrocolesterol reductasa Proteína de regulación de unión a esteroides (SREBT-1) Receptor de ácidos grasos, FABP, ileal Apolipoproteína A-IV Apolipoproteína B Apolipoproteína C III Lecitin colesterol aciltransferasa, LCAT
Carbohidratos	Fructosa2,6, bifosfato quinasa Piruvato carboxilasa		Glucolisis/Vía fructosa Glucolisis	
Oroxigénico	Preprogrelina		Regulación de apetito, induce lipogénesis	
Insulina	Receptor activador de proliferación de peroxisomas delta (PPAR γ)		Regula expresión de FABP, regulación de lipogénesis, lipotoxicidad, insulina	

Por último, se observa una disminución en la formación de ácidos grasos poliinsaturados, el gen del receptor encargado de la captación de las lipoproteínas de baja densidad oxidadas para posteriormente se oxidadas y eliminadas, además en factores implicados en la sensibilidad a la insulina y en el primer paso en la oxidación de monosacáridos.

Tabla XIII . Genes de relevancia grupo diabético tratado con *Isochrysis galbana*

		<i>Gen</i>	<i>Vía metabólica</i>
Mayor 2 z- score	Lípidos	1-acilglicerol, 3 fosfato O-aciltransferasa	Biosíntesis de triglicéridos
		2,4, dienoylCoA reductasa 1	Regulación lipídica
		Apolipoproteína A-1	Trasporte reverso de colesterol
	Carbohidrato	Lipasa hepática	Hidrólisis de lipoproteínas
		Acetil CoA carboxilasa beta	Metabolismo de lípidos/ Acido Palmítico
		Amilasa salival Amilasa pancreática	Hidrólisis almidón Hidrólisis almidón
Insulina	Receptor activador de proliferación de peroxisomas alfa (PPAR α)	Sensibilidad insulina	
	Fosfoinositida quinasa 3, Pi3K	Sensibilidad insulina	
Oroxigénico	Receptor de leptina	Saciedad / sensibilidad a la insulina	
Menor 2 z- score	Lípidos	Lipasa hormono sensible	Hidrólisis triglicéridos
		EnoylCoA hidratasa	Biosíntesis de lípidos, elongación
		Receptor de LDL oxidado 1, OLR1	Trasporte de lípidos, eliminación LDL
	Carbohidrato	Propionil CoA carboxilasa beta	Biosíntesis de lípidos
		Glucoquiinasa Fosfoglicerato quinasa 1	Glucólisis/Gluconeogénesis Glucólisis
		Insulina	Receptor de péptido de insulina parecido a factor de crecimiento 1 Receptor activador de proliferación de peroxisomas delta (PPAR γ)
	Hexoquinasa	Glucolisis, metabolismo fructosa, galactosa, manosa	

7.2.11.1. Expresión de genes relacionados con metabolismo

En este estudio se seleccionaron preprogrelina y apolipoproteína A-IV debido al efecto directo e indirecto que éstos ejercen sobre el metabolismo. Dichos transcritos mostraron una disminución en su expresión en las ratas sanas alimentadas con microalga a diferencia del grupo control (Fig. 27).

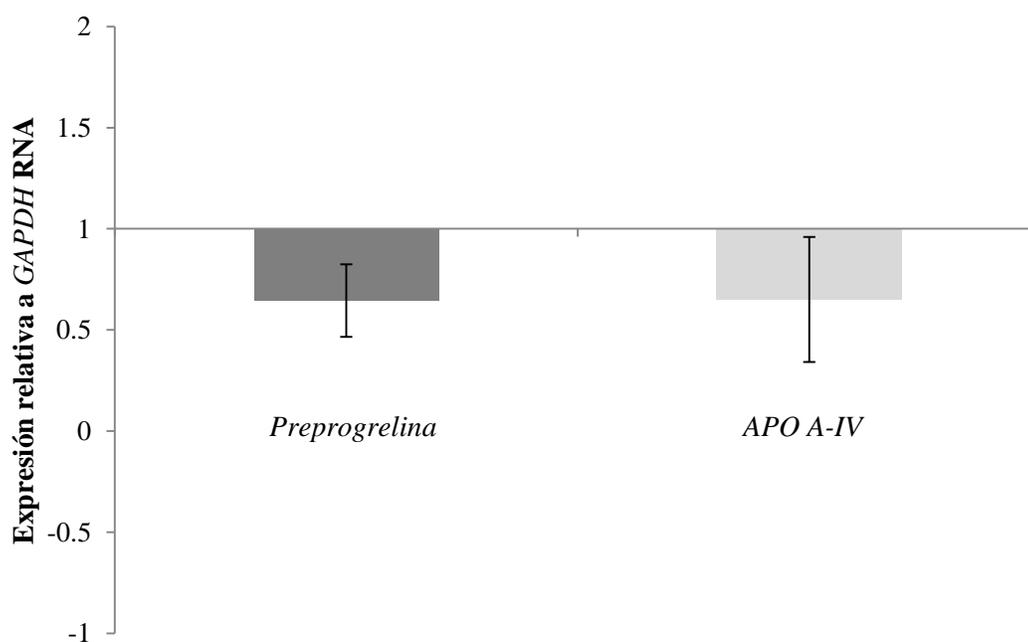


Figura 27. Expresión de los genes *Preprogrelina* y *APOA-IV* determinados por PCR tiempo real en ratas sanas tratadas con la microalga *Isochrysis galbana* al término de 18 semanas. Las barras representan la media \pm DS de la expresión relativa al control.

8. DISCUSIÓN

Las microalgas han sido utilizadas en acuicultura como alimento para moluscos y bivalvos. Sin embargo, se ha incrementado el interés comercial para su uso en humanos, basado en el potencial valor biológico y terapéutico de las moléculas de sus componentes celulares (Raja et al., 2008). Se han realizado estudios con *I. galbana* y *N. oculata* como ingredientes de alimentos tales como bísquets y espagueti (Gouveia et al., 2008; Guil-Guerrero et al., 2004), no obstante pocas investigaciones han utilizado estos microorganismos en un sistema biológico. Es debido a lo anterior que se realizó la prueba de DL₅₀, en la que no se observaron efectos tóxicos agudos. Esto coincide con los reportes de ausencia de efectos adversos en organismos a los que se les administró *N. oculata* (Markovits et al., 1992) y en ratas albinas tratadas con *I. galbana* (Herrero et al., 1993)

Por otra parte, el bajo peso corporal de los grupos diabéticos y sanos tratados con *I. galbana* o *N. oculata* comparado con aquellos que no recibieron tratamiento de microalga sugiere un efecto de los polisacáridos que las conforman, los cuales están representados en un 45-97% del contenido de carbohidratos. Estos polímeros están conformados por diferentes monómeros (glucosa, galactosa, xilosa, fucosa y arabinosa), cuyos enlaces beta glucosídicos podría permitirles actuar como fibra dietética en el aparato gastrointestinal (Brown et al., 1997; Zeng et al., 2004). La fibra dietética tiene un efecto de saciedad, además de disminuir el apetito y reducir la ingesta hasta un 10%, lo cual afecta la composición corporal del consumidor. Por lo tanto, los polisacáridos de las microalgas podrían generar coloides en el intestino que reducen el tránsito intestinal y la absorción de ciertos nutrientes, particularmente de carbohidratos y lípidos lo que ayudaría a la reducción de la ingesta calórica de los animales (Howarth et al., 2009; Niewold et al., 2012).

Con respecto a los niveles de glucosa, no se encontraron diferencias significativas en los grupos tratados con microalgas, sin embargo se observó que tres de los animales que consumieron *I. galbana* disminuyeron sus valores por debajo de 140mg/dL, e incluso uno de ellos presento hipoglucemia, por lo que se consideró que existe tendencia de este

tratamiento para disminuir la hiperglucemia a través de la acción que ejercen los polisacáridos que componen la pared celular de *I. galbana* y la ausencia de efecto con *N. oculata* (Guil-Guerrero et al., 2004; Zeng et al., 2004).

Dichas características pudieron haber influido de igual forma en la absorción de triglicéridos y colesterol, en especial en la disminución en la absorción de dichos nutrimentos a nivel intestinal (Howarth, et al., 2009; Niewold, et al., 2012). Sin embargo los resultados de HDL y LDL de los animales diabéticos y sanos tratados con cualquiera de las dos microalgas, fueron contrastantes a estudios previos donde se reporta la inclusión de los ácidos grasos poliinsaturados EPA y DHA ayuda a la disminución de LDL e incrementa HDL (Komprda, 2011). Asimismo, Conquen y Holub (1996) mencionan que el ácido graso docosahexaenoico de las microalgas incrementa los niveles de DHA séricos en sujetos sanos vegetarianos, además de que el alto consumo del ácido graso eicosapentaenoico microalgal incrementaba los niveles de HDL y disminuía LDL. Van Beelen et al., (2009) sugieren que los ácidos grasos omega 3 tienen un efecto similar al aceite de pescado, con mecanismos de protección en enfermedades cardiacas, aterosclerosis, cáncer y diabetes al disminuir los valores de LDL.

La elevación de la LDL y el descenso de la HDL observado en el presente estudio podría deberse a los ácidos grasos palmítico y palmitoleico. Éstos están presentes en *I. galbana* y *N. oculata* en igual o superior cantidad que el ácido graso docosahexaenoico y eicosapentaenoico (Reboloso-Fuentes et al., 2001; Sukenik and Wahnnon, 1991; Tago and Teshima, 2002). El ácido palmítico es un ácido graso saturado que puede incrementar LDL; estudios en voluntarios mostraron que incrementaba los valores de dicha lipoproteína y colesterol. Por otra parte, el ácido palmitoleico, un derivado del ácido palmítico, es partícipe de la síntesis endógena de triglicéridos, además ha sido reportado como un lípido que puede comportarse como un ácido graso saturado e incrementar los niveles séricos de LDL (Denke and Grundy, 1992; Nestel et al., 1992; Zock et al., 1994).

Con respecto a los niveles de compuestos nitrogenados, al no encontrarse cambios en dichos parámetros, en especial aquellos que fueron tratados con microalga, podemos sugerir que el consumo de *I. galbana* y *N. oculata* no genera un impacto negativo en la función renal debido a que el incremento de creatinina, ácido úrico y urea ha sido reportado como dañino en la filtración glomerular de personas con hiperglucemia, asimismo incrementando el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Jerums et al., 2010).

Por otra parte, además de las complicaciones clínicas como hiperglucemia y dislipidemia, se ha asociado a la gastroparesia como un efecto secundario presente en individuos con diabetes mellitus (Olausson et al., 2008). Los sujetos con gastroparesia pueden experimentar dolor abdominal, náuseas, vómito, meteorismo secundario a la disfunción gástrica, retraso en el vaciamiento gástrico así como alteración en la biota intestinal (El-Salhy, 2002; Izbéri et al., 2008; Smith and Ferris, 2003; Zhao et al., 2006). Por lo tanto, la infiltración linfocítica y plasmática, así como los diferentes grados de modificación e inflamación epitelial exhibida en los grupos diabéticos, confirma que diabetes mellitus *per se* modifica la arquitectura gastrointestinal (Olausson, et al., 2008).

Otros estudios indican que la hiperglucemia afecta la inmunidad celular, con una alteración en la actividad de las células natural killer y monocitos, leucocitos polimorfonucleares, lo cual induce a la inflamación, susceptibilidad a patógenos bacterianos y diversos síntomas gastrointestinales como la alteración en la función del estómago, rigidez en la pared intestinal, y tensión (Booth et al., 2001; Izbéri et al., 2008; Liao et al., 2006). En contraste a los otros grupos con diabetes, el grupo diabético con *I. galbana* mostró características de un grado de inflamación crónica leve, la cual se caracteriza por un moderado infiltrado linfoplasmocitario, un variable infiltrado neutrofílico (solo en un animal), sin cambios severos en epitelio, daño localizado en un segmento y sin ulceraciones (Bouma and Strober, 2003; Józefczuk and Wózniewicz, 2005; Wu, et al., 2003). Además, los animales en el grupo sano con *I. galbana* mostraron características histológicas similares al grupo control, lo cual podría indicar que el uso de esta microalga en sujetos sanos no genera efectos gastrointestinales negativos. Por otra parte, los animales tratados con *N. oculata* ya sea

sanos o enfermos presentaron características de daño gastrointestinal crónico severo el cual se manifiesta en la mayor parte de los casos con lisis celular y necrosis (Winkler et al., 2007).

Las diferencias en los hallazgos gastrointestinales entre el consumo de *I. galbana* y *N. oculata*, pueden ser resultado de la estructura celular de cada microalga. La pared celular de *N. oculata* es más rígida y gruesa que la pared de *I. galbana* (Guil-Guerrero et al., 2004), lo cual pudo haber ocasionado dificultad en su digestión, afectando al epitelio, el recuento de BAL, absorción de nutrientes y modificando la composición de las heces (diarrea). Lesiones como las realizadas por *N. oculata*, donde hay un daño en mucosa intestinal y un incremento en la respuesta inmune, han sido reportadas como un factor importante de permeabilidad intestinal, lo cual es un riesgo en la colonización de patógenos tales como *Salmonella* (Van-Vliet et al., 2010, Winkler et al., 2007). Por su parte, Aceituno and Panés (2005) describieron que el consumo de carragenina de algunas microalgas rojas (especialmente *Euchema spinosum*) por animales de laboratorio, tienen el mismo efecto observado en esta investigación con respecto a la alteración en biota intestinal, incrementando los microorganismos Gram negativos además de una inusual respuesta inmunológica, toxicidad en epitelio e inflamación severa; incluso síntomas graves como diarrea con sangre y moco.

La superficie celular de *I. galbana* comparada con la de *N. oculata*, puede proveer una ventaja al generar una mayor disposición y absorción de los componentes nutrimentales de la microalga lo que permitiría sus actividades funcionales en el tracto gastrointestinal. La funcionalidad, o efecto prebiótico, de los polisacáridos de *I. galbana* ayudaría al incremento del crecimiento o actividades de bacterias benéficas tal como *Lactococcus lactis*, además de disminuir el crecimiento y actividad de enterobacterias y patógenos (Monteagudo-Mera et al., 2012). *Lactococcus lactis* es un microorganismo encontrado comúnmente en la naturaleza, usualmente en plantas y en intestino de animales además es una de la bacteria ácido lácticas más estudiadas debido a su producción de enzimas, antígenos y características probióticas (Bahey-El-Din et al., 2010; Bolotin et al., 2011;

Miyoshi et al., 2003). Bernbom et al., (2006) reportó que la nisina producida por esa bacteria afecta a la microbiota de ratas, incrementando el recuento de bifidobacterias; mientras que Kang et al., (2010) y Pérez-Guerra et al., (2007) describieron a *L. lactis* como metabólicamente activo en el tracto gastrointestinal, con la capacidad de expresar y secretar citocinas, incrementar altura de vellosidades intestinales, estimulando el crecimiento del animal y reduciendo recuentos de coliformes en lechones.

Por su parte, *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus brevis* son bacterias ácido lácticas con actividad probiótica que han sido reportadas como parte de plantas e intestino de animales y humanos, especialmente de heces de infantes (Mackie et al., 1999; Park et al., 2005). *L. fermentum* es conocido por incrementar la actividad inmunológica y tener potencial hipocolesterolémico (Pereira et al., 2003; Zheng et al., 2011), mientras que *L. brevis* ha sido estudiado como un probable agente contra *Helicobacter pylori* debido a su actividad enzimática arginina deaminasa que afecta la biosíntesis de poliaminas presentes en pacientes con células gástricas regulares y neoplásicas, así como en pacientes positivos a la presencia de *H. pylori* (Linsalata et al., 2004). Sin embargo, a pesar de la presencia de dichas BAL en los animales que consumieron *N. oculata*, su bajo recuento pudo disminuir la competencia ante patógenos en los sitios de unión y así evitar su colonización (Soccol et al., 2010).

El tipo y proporción de enterobacterias reportadas en los grupos de estudio tratados con *I. galbana* fue similar a reportes previos donde consideran a *E. coli*, *Enterobacter*, y *Klebsiella* como géneros predominantes en tracto gastrointestinal, mientras que *Providencia*, *Hafnia*, *Morganiella*, *Citrobacter*, *Edwarsiella* y *Yersinia* como aquellos con menor proporción (Mackie et al., 1999; Thompson-Chagoyan et al., 2004). La distribución del grupo *Enterobacteriaceae*, la ausencia de patógenos y el incremento de BAL en los grupos tratados con *I. galbana* sugiere que los polisacáridos de esta microalga son fermentados por las bacterias ácido lácticas, las cuales son capaces de producir ácidos grasos de cadena corta, modificando pH, afectando positivamente mucosa intestinal, mejorar función de sistema inmune innato al incrementar barrera física, resistencia a

enfermedades e potenciar el crecimiento o actividad de bacterias benéficas intestinales (Kuda et al., 2009; Rodríguez-Cabezas et al., 2010).

La actividad benéfica de polisacáridos microalgales se ha observado en otros estudios, ejemplo de ello es el polímero de *Chlorella* sp., denominado *immurella*, que posee capacidad de aumentar fagocitos en el intestino, además se ha observado que el consumo de los compuestos activos de esta microalga promueven la re-epitelización de mucosa, la reparación de la muscularis propia y la disminución de macrófagos, granulocitos y fibroblastos en ratas con anastomosis colónica (Branger et al., 2003; Salman et al., 2007). Kerem et al., (2008) evaluaron el efecto de extracto crudo de *Chlorella* sp. en ratas en proceso de adaptación de síndrome de intestino corto, reportando un incremento en el crecimiento de vellosidades intestinales, profundidad de criptas, proliferación de mucosa y elevación de niveles de citrulina. Mientras tanto, la disminución de las BAL, decremento de la mucosa gástrica y permeabilidad intestinal, como parte de una inflamación crónica en las ratas diabéticas tratadas con *N. oculata*, incrementa el riesgo de colonización de patógenos tal como *Salmonella* (van-Vliet et al., 2010)

Para el segundo bioensayo se utilizó *Isochrysis galbana* debido a su tendencia a disminuir parámetros clínicos e incrementar BAL, a diferencia de la *Nannochloropsis oculata* que mostró efectos nocivos en los animales. En esta fase se utilizó la técnica de floculación con hidróxido de sodio para cosechar *I. galbana*, con el fin de mejorar el rendimiento en la concentración de ésta en cultivos de alta escala. Dicha forma de concentración ha sido reportada como una técnica eficiente con un 80-90% de recuperación de biomasa de microalgas de agua salada y a diferencia de otros floculantes, sus residuos no son tóxicos para animales o de alto costo (Guevara et al., 2011, Harith et al., 2010, Harith et al., 2009).

La comparación en concentración de nutrimentos entre la muestra centrifugada de *I. galbana* utilizada en el primer bioensayo y la muestra floculada del segundo bioensayo revelan en esta última, una disminución el porcentaje de carbohidratos y tipo y

concentración de lípidos, así como un aumento en proteínas, fibra y cenizas. Lo anterior podría ser resultado de la acción de la técnica de cosecha sobre el pH del cultivo, induciendo un posible cambio en la composición de la biomasa, clarificación celular, lisis y liberación de nutrientes al medio además de una precipitación y adición de cristales de calcio y fosfatos (Molina-Grima et al., 2003; Sirin et al., 2012; Sukenik et al., 1985). A pesar de dichos cambios, los porcentajes de nutrimentos en la muestra floculada son similares a otros estudios donde se reporta un promedio de proteínas de 6-25%, carbohidratos de 5-23%, lípidos de 7-23% y la presencia de ácido docosahexaenoico como principal ácido graso poliinsaturado omega 3 (Brown et al., 1997; Abalde et al., 1995).

Por otra parte, al igual que en primer bioensayo, el peso corporal del grupo control fue superior al resto y aquellos que consumieron *I. galbana* tuvieron un peso menor, incluso la diferencia fue mayor en el peso final entre los grupos tratados con microalga contra los controles del primer ensayo. Los niveles de glucosa del grupo sano con tratamiento con *I. galbana* fue menor al grupo control y el grupo diabético con microalga mantuvo sus niveles en promedio debajo de los 400 mg/dl, a diferencia del grupo diabético sin tratamiento cuya elevación de valores de glucosa aumentó la mortalidad en menor tiempo de vida de los sujetos de estudio.

De igual manera, los resultados anteriores se pueden derivar al contenido de polisacáridos y estructura celular de *I. galbana*, ya que ésta no presenta una pared celular rígida, sino que posee escamas circulares y al igual que otras especies, produce carbohidratos de almacenamiento y extracelulares (Eldridge et al., 2012; Pérez et al., 2009), incluso se ha reportado que las microalgas de la especie *Prymnesiophyceae*, poseen crisolaminaria como polisacárido de reserva además de polímeros extracelulares tipo celulosa. La crisolaminaria, es un polisacárido soluble en agua (β 1-3, 1-6) localizado en vacuolas y que está formado predominantemente por glucosa y cantidades considerables de galactosa, manosa, fructosa y fucosa, así mismo se le ha considerado junto a la celulosa como uno de los polisacáridos con mayor producción en la tierra. Por su parte, el revestimiento celular de *I. galbana* es una matriz de un material denso de probable naturaleza de polisacárido

insoluble (Domozych, 2011; Granum et Myklestad, 2002; Sánchez et al., 2012). Dichos polímeros, podrían haber estado en mayor biodisponibilidad en este último bioensayo debido al uso de hidróxido de sodio y ácido clorhídrico durante la cosecha de la microalga, ya que estos ácidos son utilizados como pre-tratamientos para hidrólisis enzimática de cadenas de polisacáridos en alimentos, pues son capaces de generar una hidrólisis parcial de polisacáridos, en especial del tipo insoluble, generado una mayor accesibilidad de los enlaces glucosídicos de los polisacáridos de *I. galbana* al eliminar enlaces éster pero sin permitir la fragmentación del polímero (Camacho-Rubio et al., 1989; González-Rentería et al., 2011).

La disponibilidad y tipo de enlace en los polisacáridos de *I. galbana* floculada le permitiría actuar como fibra dietética y ejercer una mayor actividad benéfica a nivel gastrointestinal disminuyendo la ingesta calórica a través de la reducción en la absorción de nutrientes, incrementado saciedad temprana y generando homeostasis energética por medio de la secreción de péptidos intestinales como el péptido 1 parecido al glucagón (GLP-1), péptido YY (PYY) y grelina, que se vería reflejado en la mayor pérdida de peso corporal en los sujetos sanos y una mayor tendencia a reducir la glucosa sérica del grupo diabético en comparación al primer bioensayo (Burton-Freeman, 2000, Delzenne et Cani, 2001). Asimismo se ha observado que los carbohidratos de algas podrían modular la respuesta glicémica (Goñi et al, 2012).

El control de la hiperglucemia y el peso en el paciente diabético es un factor importante para prevenir o retrasar los efectos secundarios a nivel gástrico, ya que se ha observado que la alteración en los niveles de glucosa puede causar un desequilibrio en la biota intestinal, con una disminución y alteración en tipo de bacterias benéficas así como un aumento de *Escherichia coli* y *Enterobacteriaceae*, lo cual repercute en la integridad intestinal (Atkinson et Chervonsky, 2012; Burcelin et al., 2012; Delzenne et Canni, 2001). Sin embargo se ha reportado que la ingesta de polisacáridos fermentables como inulina, celulosa, fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos y beta glucanos repercute de forma positiva en la microbiota intestinal incrementando el recuento de bacterias benéficas como *Lactobacillus*

y *Bifidobacterium* en heces, incluso glucanos β , 1-3 de algas cafés han mostrado tener actividad de fibra dietética e influir en la microbiota de ratas (Sarhini et al., 2011; Tannock et al., 2004). Cabe mencionar que la ingesta de *Isochrysis galbana* en el grupo diabético incremento el número de BAL y disminuyó el recuento de enterobacterias, siendo éstas parte de la biota intestinal normal (Thompson-Chagoyan et al., 2004).

Debido a lo anterior, los carbohidratos presentes en *I. galbana* podrían haber llevado a cabo una actividad prebiótica al ser fermentados, incrementar el número de bacterias ácido lácticas en el grupo diabético que consumió la microalga e incluso favorecer el crecimiento de la especie de mayor proporción, *L. plantarum* para los grupos sanos y *L. lactis* para el grupo diabético con tratamiento, mientras que *L. fermentum* y *L. brevis* estuvieron en menor porcentaje. Las cuatro BAL integran la comunidad intestinal normal, aunque *L. plantarum* y *L. lactis* son bacterias predominantes (Bolotin et al., 2001; Walter, 2008). Cabe mencionar que la ecología bacteriana varía en base a factores como: la integridad del epitelio intestinal, sistema inmune, sistema entérico y vascular, así como el consumo de prebióticos, probióticos o antibióticos. En sujetos sanos es mayor la estancia intestinal de *L. plantarum* que *L. lactis*, mientras que en diabetes mellitus dicha relación podría verse modificada, ya que en enfermedades metabólicas se alteran los factores antes mencionados, y con ello la composición de la microbiota, *phylum* y número (Burcelin et al., 2011; Daniel et al., 2012).

Las bacterias ácido lácticas difieren en el mecanismo de acción para llevar a cabo sus actividades, y por ende en sus efectos clínicos. *Lactobacillus plantarum* es capaz de competir contra bacterias patógenas en los sitios de unión de receptores de manosa (mannose-receptor binding sites) en la superficie del epitelio intestinal, participar en el proceso inmunológico, además de presentar habilidad de fermentar una variedad de carbohidratos, como monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos (Marco et al., 2006; Saulnier et al., 2007), mientras que *L. lactis* produce metabolitos antimicrobianos que disminuyen recuentos de coliformes y proteínas con acción en sistema inmune (Bolotin et al., 2001; Socol et al., 2010). Por su parte, *L. fermentum* es un lactobacilo con actividad

hipocolesterolemia y antimicrobiana contra *E. coli* y *S. aureus*; y finalmente *L. brevis* es una bacteria láctica con actividad potencial contra *H. pylori*. (Lesbros-Pantoflickova et al., 2007; Zeng et al., 2011).

Por otra parte el uso de microalgas marinas como *I. galbana* en patologías es relativamente nuevo. Por ello, el análisis histopatológico brindó un primer acercamiento para conocer si el consumo de *I. galbana* floculada pudiera generar lesiones en órganos como intestino, hígado y riñón, especialmente en sujetos con diabetes mellitus cuyos factores de riesgo de daño a dichos tejidos es superior.

En este estudio los datos histopatológicos no muestran efectos negativos en los órganos analizados, por lo que el consumo de la microalga no presenta un riesgo desde el punto de vista histológico. En cambio, el grupo diabético sin tratamiento presentó hiperplasia leucocitaria intestinal y aplanamiento de vellosidades. Las alteraciones encontradas en el grupo diabético sin tratamiento serían derivadas de la hiperglucemia crónica no controlada que afectan el sistema nervioso entérico originando un desequilibrio en la motilidad y la respuesta inflamatoria intestinal lo que modifica la arquitectura gastrointestinal (Isbery et al., 2008; Olausson, et al., 2008).

De igual forma, la hiperglucemia es capaz de alterar el metabolismo lipídico. El poco control de los niveles de glucosa puede ocasionar hipertrigliceridemia, aumento de VLDL, disminución de HDL y conversión de LDL a moléculas más pequeñas y densas (Goldberg, 2001). No obstante, el manejo dietético de la dislipidemia aunado al consumo de fibra dietética y ácidos grasos poliinsaturados reduce el riesgo de enfermedad cardiovascular.

La fibra dietética es la parte comestible de las plantas o carbohidratos asociados a éstas, que al ser ingeridos son resistentes a la digestión y absorción intestinal pero con una fermentación completa o parcial. Su ingesta incrementa la viscosidad del bolo alimenticio, enlentece el tránsito intestinal y altera la difusión e interacción de nutrientes con la mucosa, disminuyendo así la absorción de nutrimentos como son los lípidos. Además existen otras

fuentes de fibra dietética como diversos beta glucanos y polisacáridos de algas (Brennan, 2005; Redgwell and Fischer, 2005).

Las microalgas poseen monosacáridos y polímeros compuestos en su mayoría de glucosa, ramnosa, xilosa y manosa. No obstante los carbohidratos presentes en las microalgas varían según la especie. Algunas microalgas poseen glucógeno como polisacárido de reserva, otras una pared celular rígida compuesta por polímeros parecidos a la celulosa, mientras que otras no poseen pared celular, lo que permite que sus polisacáridos sean más fáciles de utilizar, tal es el caso de *Isochrysis galbana* (Eldridch et al., 2012; Markou et al., 2012). Lo anterior pudo permitir su acción como fibra dietética y así mostrar una tendencia a disminuir triglicéridos y colesterol en aquellos grupos de estudios que la consumieron.

Por otra parte, los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 especialmente aquellos de origen marino como el ácidos eicosapentaenoico y docosahexaenoico, regulan los niveles de triglicéridos, colesterol, incrementan los valores de HDL y disminuyen LDL en modelos animales y ensayos clínicos con sujetos con dislipidemia (Lombardo and Chicco, 2006).

Isochrysis galbana posee ácidos grasos poliinsaturados como el ácido docosahexaenoico además de contener ácidos grasos monoinsaturados (ácido graso oleico) (Liu et Lin, 2001). No obstante que ha sido reportado que el ácido graso DHA y ácido graso oleico tienen actividad hipolipemiente, el consumo de *I. galbana* mostró una tendencia a disminuir la lipoproteína HDL e incrementar la LDL, especialmente en los sujetos sanos que consumieron microalga, aunque dicho efecto en menor proporción al primer bioensayo.

Lo anterior puede estar relacionado a la presencia de ácidos grasos saturados esteárico y palmítico en *I. galbana*, los cuales participan en lipogénesis y el incremento de la lipoproteína de baja densidad (Sawada et al., 2012)

Se ha relacionado el consumo de ácidos grasos con la respuesta inflamatoria en el paciente diabético. La alteración en la secreción de insulina en diabetes mellitus conlleva a una inflamación subcrónica derivada de una serie de mecanismos que incrementan citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa e interleucina 6 (O'Connor et al.,

2007). Sin embargo, el consumo de DHA ha mostrado disminuir la producción de dichas citocinas y por ende su concentración sanguínea, tal es el caso del grupo diabético que consumió microalga (Calder., 2006)

Por su parte, el grupo sano tratado con *I. galbana* mostró tendencia a incrementar, sin ser estadísticamente diferente, los niveles de TNF α e IL 6. Dicha elevación podría ser ocasionada por una probable reacción alérgica que pudo iniciar un proceso inflamatorio subcrónico ante el consumo de microalga. Incluso lo anterior podría verse relacionado con otros parámetros como la presencia de filtración mononuclear en segmentos intestinales en algunos sujetos, con disminución de BAL, un incremento de enterobacterias, el consumo de lípidos de la microalga y el aumento de citocinas inflamatorias (Isbery et al., 2008; Olausson, et al., 2008).

Con respecto a los niveles de leptina y resultados de microarreglo, se observó que los animales sanos tratados con *I. galbana* mostraron una mayor tendencia en el incremento de ésta así como una sobreexpresión de genes relacionados con el catabolismo de ácidos grasos y una disminución de aquellos involucrados con lipogénesis, transporte de lípidos y vías metabólicas glucogénicas, mientras que dichos resultados en los animales diabéticos tratados con microalga estuvieron presentes en menor proporción.

Dichos efectos pudieron derivarse de consumo elevado de lípidos de *Isochrysis galbana*. Esta microalga contiene beta glucanos que no se absorben y una menor cantidad de carbohidratos para su oxidación, a diferencia de la cantidad y variedad de ácidos grasos (ácido docosahexaenoico, oleico, palmítico, mirístico, esteárico, palmitoleico, entre otros) que *I. galbana* posee y que pueden afectar a nivel metabólico (Jump, 2008; Liu et Lin, 2001).

Durante el periodo postprandial, domina la acción de la insulina ya sea permitiendo la acción de los transportadores de membrana específicos para glucosa dependientes de insulina (GLUTs), para su oxidación y generación de energía, transaminando aminoácidos para la formación de proteínas y activando la enzima lipoproteína lipasa permitiendo el

almacenamiento de lípidos de la dieta e inhibiendo lipólisis y beta oxidación, además de regular la secreción de TNF α , IL6, leptina, adiponectina y resistina por parte del tejido adiposo (Jaworski et al., 2007). Por el contrario, durante un periodo de hipoglucemia se activan las vías catabólicas por acción del glucagón promoviendo el uso de los ácidos grasos por los tejidos y la formación de glucosa a partir de la gluconeogénesis (Jaworski et al., 2007; Soodini, 2004).

Por lo tanto, la alteración en la secreción o acción de la insulina tendrá como resultado un desequilibrio en el metabolismo de nutrientes. Entre los factores de riesgo para la aparición de una resistencia a la insulina, en especial a nivel hepático, se encuentra la ingesta elevada de ácidos grasos con probable aparición de esteatosis hepática no alcohólica. Los principales ácidos grasos implicados son el palmítico, oleico y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), los cuales se encuentran en *I. galbana*.

Dichos macronutrientes son capaces de producir esteatosis, favorecer lipoapoptosis del hepatocito mediada por la quinasa N-terminal tipo Jun (*JNK*) y provocar resistencia a la insulina al modificar la composición y fluidez de las membranas, y en consecuencia alterar la actividad de los receptores de ésta. Además dicho cuadro es capaz de modificar la expresión de genes del metabolismo de glucosa a nivel hepático, promover una secreción elevada de TNF α , IL6 y leptina así como suprimir los receptores del gen de prepropeptidogrelina. Cabe mencionar que los últimos se encuentran relacionados, ya que de manera regular la preprogreлина es un péptido que se secciona para dar lugar a grelina, cuya función es oroxigénica y promover la secreción de insulina que a su vez estimula la secreción de leptina por el tejido adiposo y así ésta generar la sensación de saciedad. No obstante en diabetes mellitus y sujetos sanos con alta ingesta de lípidos se ha observado una alteración en dicha relación al encontrar una disminución en la secreción de grelina y un incremento de la leptina (leptinemia) como respuesta a una resistencia a la insulina (Araya et al., 2004; Clarke, 2001; Liu et Lin, 2001; Pusch et al., 2008). Es debido a lo anterior que probablemente no se haya encontrado expresión del gen preprogreлина en los animales diabéticos, cuya patogenia cursa de forma regular con disminución del transcrito; en

cambio al comparar el grupo control y sano que ingirió la microalga se logra observar una alteración en dicha expresión génica por la cantidad y tipo de ácidos grasos.

De igual forma las dosis de elevadas de ácidos grasos genera estrés al retículo endoplasmático incrementando la proteólisis de ciertas apolipoproteínas (Apo-B, Apo-C, Apo-E), mientras que una probable alteración de insulina a nivel hepático se relaciona con un incremento de la lipasa hepática y la alteración en la maduración de la lipoproteína HDL por el acoplamiento de la apolipoproteína A-IV para el correcto funcionamiento de la LCAT. Lo anterior resultaría en un incremento de la lipoproteína de baja densidad y un descenso de la lipoproteína de alta densidad por el deficiente transporte endógeno de lípidos, transporte reverso del colesterol y oxidación hepática de lipoproteínas (García-Rios, et al., 2012; Ota et al., 2008) (Fig.28)

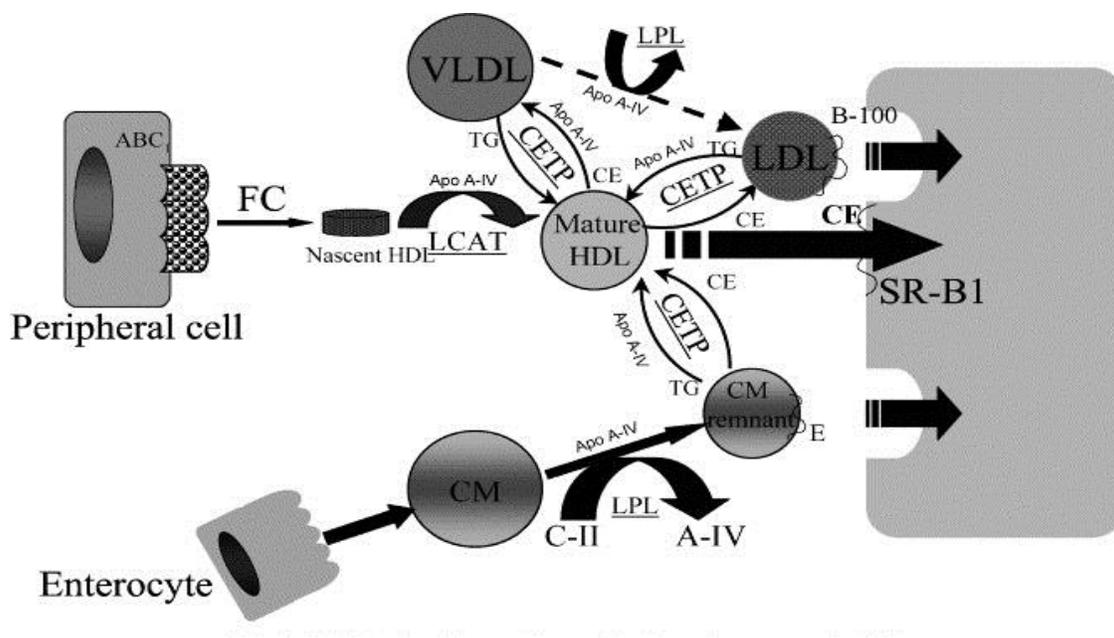


Figura 28. Metabolismo lipídico regulado por la apolipoproteína A-IV. La activación de la LCAT por la apo A-I y apo A-IV promueve la maduración de HDL. La interacción de dicha HDL con SR-B1 conyeva a la esterificación de colesterol por las células hepáticas. La apo A-IV estimula la actividad de la Lipoprotein lipasa que hidroliza la VLDL y quilomicrones (CM) a LDL y quilomicrones remanentes con un correcto intercambio de triglicéridos (Stan et al., 2003)

Finalmente, el incremento de ácidos grasos antes mencionado es citotóxico, lo que conyeva a su incorporación en lípidos complejos para oxidarlos en mitocondrias, peroxisomas (β -oxidación) y en el retículo endoplasmático (ω -oxidación) a nivel hepático. Lo anterior incrementa la expresión de enzimas relacionadas con dicho metabolismo e inhibiendo la acción del malonil-CoA y el PPAR γ , además de incrementar la expresión de enzimas relacionadas con gluconeogénesis tales como Acetyl coA hidrolasa, FAS, calmodulina y hexoquinasa, mientras que los genes para expresión de enzimas glucolíticas (Fosfofructoquinasa 2,6 (PFK2, 6) y Fosfofructoquinasa 1,6 (PFK 1,6)) se encontrarían suprimidas (Mannaerts et al., 2000; Jump, 2008; Reddy and Hashimoto, 2001).

9. CONCLUSIONES

Las microalgas son organismos capaces de generar compuestos bioactivos con posibles aplicaciones en el área de la salud como nutraceuticos o parte de alimentos funcionales. Es así, que el valor funcional de las microalgas es de interés en la industria de alimentos.

En este estudio se observó que la microalga *I. galbana* muestra tendencia a disminuir peso corporal, glucosa y triglicéridos, además de incrementar el recuento de bacterias lácticas en aquellos sujetos que la consumieron. No obstante se debe tener reservas de su inocuidad, ya que su ingesta se vio relacionada con la alteración en la regulación de lípidos a nivel hepático, en especial en sujetos sanos, quienes mostraron una mayor cantidad de expresiones génicas relacionadas con el metabolismo de insulina y ácidos grasos que puede dar como resultado una resistencia a la insulina y esteatosis hepática.

El consumo de *N. oculata* no generó efectos benéficos, ya que no controló los niveles de glucosa y lípidos en sangre. A nivel gastrointestinal causó daño severo con necrosis en vellosidades intestinales, cuyas consecuencias clínicas fueron presencia de diarrea con moco, patógenos intestinales y pérdida de peso.

Es conveniente realizar más estudios para profundizar y elucidar el mecanismo de acción de dichas microalgas en un organismo vivo, ya sea como inmunomoduladores, nutrigenómicos o ingredientes de un alimento funcional en la terapia nutricional de enfermedades crónicas degenerativas y sujetos sanos.

10. LITERATURA CITADA

Abalde, J., A. Cid, P. Fidalgo, E. Torres, C. Herrero, 1995. Composición bioquímica. En: Microalgas: cultivo y aplicaciones. Edit. Abalde J., Cid A., Fidalgo J.P. Torres E., Herrero C. Editorial Universidad de la Coruña, España. Pag: 93-124.

Aceituno, M., J. Panés. 2005. Patogenia e inmunoterapia de las enfermedades inflamatoria intestinal: lecciones de los modelos animales. Gastroenterol Hepatol. 28(9): 576-590

Araya, J., R. Rodrigo, L.A. Videla, L. Thielemann, M. Orellana, P. Pettinelli, 2004. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid d-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Clin Sci (Lond). 106: 635-643.

Arenas-Márquez, H., D. Arenas-Montoya. 2007. Inmunonutrición. En: Nutrición enteral y parenteral. Edit. Arenas-Márquez H., Anaya-Prado R. MacGraw-Hill, México. Pag: 174-184.

Arterburn, L., E. Hall, H. Oken. 2006. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. Am J Clin Nutr. 83:1467–1476.

Atkinson, M.A., A. Chervonsky 2012. Does the gut microbiota have a role in type 1 diabetes? Early evidence from humans and animal models of the disease. Diabetología. 55:2868–2877.

Avagyan, A.B. 2010. New Design of Biopharmaceuticals through the use of microalgae addressed to global geopolitical and economic changes. Are you ready for new development in biopharma? Pharmacology & Pharmacy. 1, 33-38.

Bahey-El-Din, M., C.G. Gahan, B.T. Griffin. 2010. *Lactococcus lactis* as a cell factory for delivery of therapeutic proteins. Curr Gene Ther. 10(1): 34-45

Beattie, A., E.L. Hirst, E. Percival. 1961. Studies on the metabolism of *Chrysochyceae*. Biochem J. 79:531-537.

Bernbom, N., T.R. Licht, C.H. Brogren, B. Jelle, A.H. Johansen, I. Badiola, F.K. Vogensen, B. Norrung 2006. Effects of *Lactococcus lactis* on composition of intestinal microbiota: role of nisin. *Appl Environ Microbiol.* 72(1): 239-244

Bligh, G.E., J.W. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Bioch Phy.* 37(3):911-917.

Branger, B., J.L. Caduda, M. Delobel, H. Ouoba, P. Yameogo, D. Ouedraogo, D. Guerin A. Valea, C. Zombre, P. Ancel, personnels des CREN. 2003. Spirulina as food supplement in case of infant malnutrition in Burkina-Faso. *Archiv Pédiatr.* 10: 424-431.

Bolotin, A., P. Wincker, S. Mauger, O. Jaillon, K. Malarne, J. Weissenbach, S.D. Ehrlich, A. Sorokin. 2001. The complete genome sequence of the Lactic Acid Bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* IL1403. *Genome Res.* 11: 731-753.

Booth, G., T.J. Stalker, A. Lefer, R. Scalia. 2001. Elevated ambient glucose induces acute inflammatory events in the microvasculature: effects of insulin. *Am J Physiol Endoc M.* 280: 848-856.

Bouma, G., W. Strober. 2003. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 3: 521-533.

Brennan, C.S. 2005. Dietary fibre, glycaemic reponse, and diabetes. *Mol Nutr Food Res.* 49: 560-570

Brown, G., S. Gordon. 2001. Immune recognition. A new receptor for β -glucans. *Nature.* 513: 36-40.

Brown, M. R., S.W. Jeffrey, J.K. Volkman, G.A. Dunstan. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture.* 151: 315- 331.

Burcelin, R., M. Serino, C. Chabo, V. Blasco-Baque, J. Amar. 2011. Gut microbiota and diabetes: from pathogenesis to therapeutic perspective. *Acta Diabetol.* 48: 257–273.

- Burton-Freeman, B. 2000. Dietary fiber and energy regulation. *J Nutr.* 130: 272–275.
- Calder, P.C. 2006. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 75:197-202.
- Camacho-Rubio F., P. González-Tello, E. Jurado-Alameda, A. Robles-Medina. 1989. Influencia de la relación NaOH/Sustrato y del tiempo de pretratamiento sobre la hidrólisis enzimática de madera de álamo. *AFINIDAD.* 419: 35-40.
- Clarke, S.D. 2001. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. I. molecular mechanism for polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 281:865-869.
- Companioni-Gásquez M. 2000. Ácido Araquidónico y Radicales libres: su relación con el proceso inflamatorio. *Rev Cub Invest Biomed.* 14 (1). http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol14_1_95/ibi02195.htm
- Conquer, J., B. Holub. 1996. Supplementation with an algae source of docosahexaenoic acid increases (n-3) fatty acid status and alters selected risk factors for heart disease in vegetarian subjects. *J Nutr.* 126: 3032–3039.
- Conquer J.A., B.J. Holub. 1997. Dietary docosahexaenoic acid as a source of eicosapentaenoic acid in vegetarians and omnivores. *Lipids.* 32:341-345
- Cumming, J.H, G.T. Macfarlane, H.N. Englyst. 2001. Prebiotic digestion and fermentation. *Am J Clin Nutr.* 73: 415–420.
- Daniel, C., S. Poret, V. Dennina, D. Boutillier, B. Pot. 2012. Bioluminescent *Lactobacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* to a study spatial and temporal persistence in living mice. *Appl Environ Microbiol.* doi:10.1128/AEM.03221-12
- Delzenne, N.M., P.D. Cani. 2001. Interaction between obesity and the gut microbiota: relevance in nutrition. *Ann Reviews.* 31:15–31.

Denke, M.A., S.M. Grundy. 1992. Comparison of effects of lauric acid and palmitic acid on plasma lipids and lipoproteins. *Am J Clin Nutr.* 56: 895–898.

Domínguez-Vergara, A.M., L. Vázquez -Moreno, H. Ramos-Clamont, G. Montfort. 2009. Revisión del papel de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones gastrointestinales. *ALAN.* 59(4): 358-368.

Domozych, D. 2011. Cell Structure. En: *Algal Cell Wall*. Edit. Domozych D. Editorial Skidmore College, Saratoga Springe, New York City, USA. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000315.pub3

Doughman, S., S. Krupanidhi, C. Sanjeevi. 2007. Omega-3 Fatty Acids for Nutrition and Medicine: Considering Microalgae Oil as a Vegetarian Source of EPA and DHA. *Curr Diab Rev.* 3: 198–206.

Dvir, I., A.H. Stark, R. Cayoth, Z. Madar, S.M. Arad. 2009. Hypocholesterolemic effects of nutraceuticals produced from the red microalga *Porphyridium* sp in rats. *Nutrients.* 1: 156-167.

Eldridge, R.J., D.R.A. Hill, B.R. Gladman. 2012. A comparative study of the coagulation behavior of marine microalgae. *J Appl Phycol.* DOI 10.1007/s10811-012-9830-4

El-Salhy, M. 2002. The possible role of gut neuroendocrine system in diabetes gastroenteropathy. *Histol Histopathol.* 17(4): 1153-1161.

Fukuhura, S., H. Suzuki, T. Msaoka, M. Arakawa. 2004. Enhanced ghrelin secretion in rats with cysteamine-induced duodenal ulcers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 289: G138-G145.

García-Rios, A., P. Pérez-Martínez, J. Delgado-Lista, J. López-Miranda, F. Pérez-Jiménez. 2012. Nutrigenetics of the lipoprotein metabolism. *Mol Nutr Food Res.* 56:171-183.

Gervaise, N., M.A. Garrigue, G. Lasfargues, P. Lecomte. 2000. Triglycerides, apo-C3 and Lp B:C3 and cardiovascular risk in Type II Diabetes. *Diabetología*. 43:703-708.

Goldberg, I.J. 2001. Clinical Review 124. Diabetic dyslipidemia: causes and consequences. *J Clin Endocr Metabol*. 86(3): 965-971.

González-Rentería, S.M., N.O. Soto-Cruz, O.M. Rutiaga-Quiñones, H. Medrano-Roldán, J.G. Rutiaga-Quiñones, J. López-Miranda. 2011. Optimización del proceso de hidrólisis enzimática de una mezcla de pajas de frijol de cuatro variedades. *Rev Mex Ing Quim*. 10(1):17-28

Goñi, I., L. Valdivieso, M. Gudiel-Urbano. 2002. Capacity of edible seaweeds to modify *in vitro* starch digestibility of wheat bread. *Food*. 46(1): 18-20

Gouveia, L., C. Coutinho, E. Mendonca, A.P. Batista, I. Sousa, N. Bandarra, A. Raymundo. 2008. Functional biscuits with PUFA-w3 from *I. galbana*. *J Sci Food Agric*. 88(5): 891-896.

Granum, E., S.M. Mykkestad. 2002. A simple combined method for determination of β -1,3 glucans and cell wall polysaccharides in diatoms. *Hydrobiologia*. 477:155-161.

Guevara M., L. Bastardo, R. Cortez, B. Arredondo-Vega, L. Romero, P. Gómez. 2011. Pastas de *Rhodomonas salina* (Cryptophyta) como alimento para *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Rev Biol Trop*. 59(4):1503-1515.

Guil-Guerrero, J.L., R. Navarro-Juárez, J.C. López-Martínez, P. Campra-Madrid, Ma.M. Reboloso-Fuentes. 2004. Functional properties of the biomass of three microalgal species. *J Food Eng*. 65: 511-517.

Guzmán-Juárez, N., E. Madrigal-Bujaidar. 2003. Revisión de las características clínicas, metabólicas y genéticas de la Diabetes Mellitus. *Bioquímica*. 28(2):14-23.

Hamedani, A., T. Akhavan, R. Abou-Samra, G. Harvey-Anderson. 2009. Reduced energy intake at breakfast is not compensated for at lunch if a high-insoluble fiber cereal replaces a low-fiber cereal. *Am J Clin Nutr.* 89:1343-1349.

Harith, Z.T., F.M. Yusoff, M. Shariff, A.B. Ariff. 2010. Effect of different separation techniques and storage temperatures on the viability of marine microalgae, *Chaetoceros calcitrans*, during storage. *Biotech.* 9(3):387-391.

Harith, Z.T., F.M. Yusoff, M. Shariff, A.B. Ariff. 2009. Effect of different flocculants on the flocculation performance of microalgae *Chaetoceros calcitrans*, cells. *Afr J Biotechnol.* 8(21): 5971-5978.

Herrero, C., J. Abalde, J. Fabregas. 1993. Nutritional properties of four marine microalgae for albino rats. *J Appl Phycol.* 5: 573–580.

Howarth, N., E. Saltzman, S. Roberts. 2009. Dietary fiber and weight regulation. *Nutr Rev.* 59: 129–139.

Izbéri, F., T. Wittman, A. Rosztóczy, N. Linke, N. Bódi, E. Ferete, M. Bagyánszri. 2008. Immediate insulin treatment prevents gut motility alterations and loss of nitrergic neurons in the ileum and colon of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes Res Clin Pr.* 80: 192-198.

Jaworski, K., E. Sarkadi-Nagy, R.E. Duncan, M. Ahmadian, H.S. Sul. 2007. Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 293:G1-G4.

Jenkins, D., C. Kendall, V. Vuksan, E. Vidgen, S. Tina, L. Parker, D. Faulkner, C. Mehling, M. Garsetti, G. Testolin, S. Cunnane, M. Ryan, P. Corey. 2002. Soluble fiber intake at a dose approved by the US Food and Drug Administration for a claim of health benefits: serum lipid risk factors for cardiovascular disease assessed in a randomized controlled crossover trial. *Am J Clin Nutr.* 75:834–9.

- Jerums, G., E.Premaratne, S. Panagiotopoulos, R. Mclassac. 2010. The clinical significance of hyperfiltration in diabetes. *Diabetologia*. 53: 2093-2104
- Józefczuk, J., B. Wózniewicz. 2005. Clear cell colitis in children: pathology and clinical manifestation. *Ann Diagn Ped*. 9(3-4):71–75.
- Jump, D.B. 2008. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Curr Opin Lipidol*. 19(3):242–247.
- Jun-Ichi, H., O. Ichigaku, T. Koyoshi, K. Masayoshi, K. Tohru, K. Michimasa. 2003. Effective cell harvesting of the halotolerant microalga *Dunaliella tertiolecta* with pH control. *J Biosc Bioeng*. 95(4): 4124–15.
- Kang, P., D. Toms, Y. Ying, Q. Cheung, J. Gong, K. De-Lange, J. Li. 2010. Epidermal growth factor-expressing *Lactococcus lactis* enhances intestinal development of early-weaned pigs. *J Nutr*. 140: 806-811. doi:10.3945/jn.109.114173.
- Kerem, M., B. Salman, H. Pasaoglu, A. Bedirli, M. Alper, H. Katircioglu, T. Atici, E.F. Percin, E. Ofluoglu. 2008. Effects of microalgae chlorella species crude extracts on intestinal adaptation in experimental short bowel syndrome. *World J Gastroenterol*. 14(28): 4512-4517.
- Kew, S., M. Mesa, S. Tricon, R. Buckley, A. Minihane, A. Parveen. 2004. Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on immune cell composition and function in healthy humans. *Am J Clin Nutr*. 79:674–81.
- Komprda, T. 2012. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids as inflammation-modulating and lipid homeostasis influencing nutraceuticals: *A review*. *JFF*. 4:25-38.
- Kuda, T., T. Enomoto, T. Yano. 2009. Effects of two storage β -1,3-glucans laminarian from *Eiceniabicyclis* and paramylon from *Euglena gracili*, on ceca environment and plasma lipid levels in rats. *JFF*. 1:339-404.

Lesbros-Pantoflickova, D., I. Corthésy-Theulaz, A.L. Blum. 2007. *Helicobacter pylori* and probiotics. J Nutr. 137:812-818.

Linsalata, M., F. Russo, P. Berloco, M.L. Caruso, G.D. Matteo, M.G. Cifone, C.D. Simone, E. Ierardie, A. Di Leo. 2004. The influence of *Lactobacillus brevis* on ornithine decarboxylase activity and polyamine profiles in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. Helicobacter. 9(2): 165-172.

Liu, C.Ch., L.Y. Lii, L.Y. So. 2007. Does Garlic have a role as an antidiabetic agent? Mol Nutr Food Res. 51: 1353-1364.

Liu, C.P., L.P. Lin. 2001. Ultrastructural study and lipid formation of *IsochrYSIS* sp. CCMP1324. Bot Bull Acad Sin. 42: 207-214.

Lombardo, Y.B., A.G. Chicco. 2006. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. JNB. 17(1):1-13.

McKenney J., D. Sica. 2007. Prescription omega-3 fatty acids for the treatment of hypertriglyceridemia. Am J Health-Syst Pharm. 64(6):595-605

Mackie, R.I., A. Sghir, H.R. Gaskins. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. Am J Clin Nutr. 69(suppl): 1035-1045.

Mannaerts, G.P. P.P. Van-Veldhoven, M. Casteels, 2000. Peroxisomal lipid degradation via beta- and alpha-oxidation in mammals. Cell Biochem Biophys. 32:73-87.

Marco, M. L., R.S. Bonders, W.M. de Vos, M. Kleerebezem. 2007. Temporal expression of *Lactobacillus pl.antarum* genes in the gastrointestinal tracts of mice. Appl Environ Microbiol. 73: 124-132

Maritim, A.C., R.A. Sanders, J.B. Watkins. 2003. Diabetes, Oxidative Stress and Antioxidants: a Review. J Biochem Molecular Toxic. 17(1):24-38.

Markou, G., I. Angelidaki, D. Geogakakis. 2012. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Appl Microbiol Biotechnol.* 96: 631-645.

Markovits, A., R. Conejeros, L. López, M. Lutz. 1992. *Nannochloropsis* sp. as a potential dietary supplement. Chemical, nutritional and short term toxicological evaluation in rats. *Nutr Res.* 12: 1273–84.

Miyoshi, A., T. Rochat, J.J. Gratadoux, Y. Le Loir, S. Costa-Oliveria, P. Langella, V. Azeved. 2003. Oxidative stress in *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res.* 2(4): 348-359.

Molina-Grima, E., E.H. Belarbi, F.G. Acién-Fernández, A. Robles-Medina, Y. Chisti. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process, options and economics. *Biotechnol Adv.* 20(7-8): 491-515.

Monteagudo-Mera, A., L. Rodríguez-Aparicio, Rúa, J., H. Martínez-Blanco, N. Navasa, M.R. García-Armensto, M.A. Ferrero. 2012. In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strain of dairy and human origin. *JFF.* 4:531-541.

Mori, T., V. Burke, I. Puddey, G. Watts, N. David, J. O’Neal, D. James. 2000. Purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids have differential effects on serum lipids and lipoproteins, LDL particle size, glucose, and insulin in mildly hyperlipidemic men. *Am J Clin Nutr.* 71:1085–1094.

Nakaji, S., K.Sugawara, D. Saito, Y. Yoshioka, D. MacAuley, T. Bradley, G. Kernohan, D. Baxter. 2002. Trends in dietary fiber intake. *Eur J Nutr.* 41: 222–227.

Nestel, P.J., M. Noakes, B. Belling, R. Mc-Arthur, P. Clifton, E. Janus, M. Abbey. 1992. Plasma lipoprotein lipid and Lp[a] changes with substitution of elaidic acid for oleic acid in the diet. *J Lipid Res.* 33: 1029–1036.

Nicolosi, R., S.J. Bel, B. Bistran, I. Greenberg, R. Armour-Forse, G.L. Blackburn. 1999. Plasma lipid changes after supplementation with β -glucan fiber from yeast. *Am J Clin Nutr.* 70:208-212.

Niewold, T.A., M. Shroyen, M.M. Geens, R.S.B. Verhelst, M.C. Courtin. 2012. Dietary inclusion of arabinoxyan oligosaccharides (AXOS) down regulates mucosal responses to a bacterial challenge in a piglet model. *JFF.* 4:626:636.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO 1999, www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio

O'Connor, J.C., C.L. Sherry, C.B. Guest, G.G. Freund. 2007. Type 2 diabetes impairs insulin receptor substrate-2-mediated phosphatidylinositol 3-kinase activity in primary macrophages to induce a state of cytokine resistance to IL-4 in association with overexpression of suppressor of cytokine signaling-3. *J Immunol.* 178: 6886-6893.

Olausson, E.A., M. Alpsten, A. Larsson, H. Mattsson, H. Andersson, S. Attvall. 2008. Small particle size of a solid meal increases gastric emptying and late postprandial glycaemic response in diabetic subject with gastroparesis. *Diabetes Res Clin Pr.* 8: 231-237. Doi:10.1016/j.diabres.2007.12.006

Ota, T., C. Gayet, H.N. Ginsberg. 2008. Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *J Clin Invest.* 118:316-332.

Painter, T.J. 1983. Structural evolution of glycans in algae. *Pure Appl Chem.* 55(4):677-694.

Park, J.H., Y. Lee, E. Moon, S.H. Seok, M.W. Baek, H.Y. Lee, D.J. Kim, C.H. Kim, J.H. Park, 2005. Safety assessment of *Lactobacillus fermentum* PL9005, a potential probiotic lactic acid bacterium, in mice. *J Microbiol Biotechnol.* 15(3): 603-608.

- Peña, A. 2007. Intestinal flora, probiotics, prebiotics, synbiotics and novel foods. *Rev Esp Enferm Dig.* 99(11): 653-658
- Pereira, D.I.A., A.L. McCartney, G.R. Gibson. 2003. An in vitro study of the prebiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. *Appl Environ Microb.* 69(8): 4743-4752.
- Pérez, P., E. Fernández, R. Beiras. 2009. Toxicity of benalkonium chloride on monoalgal cultures and natural assemblages of marine phytoplankton. *Water air Soil Pollut.* 201:319-330.
- Pérez-Guerra, N., P. Fajardo-Bernárdeza, J. Méndez, L. Pastrana-Castro. 2007. Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Anim Feed Sci Tech.* 134(1-2): 89-107.
- Pusl, T., N. Wild, T. Vennegeerts, R. Wimmer, B. Goke, S. Brand. 2008. Free fatty acids sensitize hepatocytes to bile acid-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 371:441-445.
- Raja, R., S. Hemaiswarya, N.A. Kumar, S. Sridhar, R. Rengasamy. 2008. A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Crit Rev Microbiol.* 34: 77-88.
- Reboloso-Fuentes, Ma.M., A. Navarro-Pérez, F. García-Camacho, J.J. Ramos-Miras, J. Guil-Guerrero. 2001. Biomass Nutrient Profiles of the microalga *Nannochloropsis*. *J Agr Food Chem.* 49: 2966-2972.
- Reddy, J.K., T. Hashimoto. 2001. Peroxisomal beta-oxidación and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr.* 21: 193-230.
- Redgwell, R.J., M. Fischer. 2005. Dietary fiber as a versatile food component. An industrial perspective. *Mol Nutr Food Res.* 49:421-535.

- Rengipat, S., T. Rueangrukikit, S. Piyatiratitivorakul. 2008. Evaluation of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile seabass *Lates calcarifer*. *Aquacul Res.* 39: 134-143.
- Rodriguez-Cabezas, M.E., D. Camuesco, B. Arribas, N. Garrido-Mesa, M. Comalada, E. Bailóna, M. Cueto-Sola, P. Utrilla, E. Guerra Hernández, C. Pérez-Roca, J. Gálvez, A. Zarzuelo. 2010. The combination of fructooligosaccharides and resistant starch shows prebiotic additive effects in rats. *Clin Nutr.* 29(6): 832-839.
- Salman, B., M. Kerem, A. Bediril, H. Katircioglu, E. Ofluoglu, O. Akin, I. Onbasilar, S. Ozsoy, R. Haziroglu. 2007. Effects of *Chlorella* sp. microalgae on colonic anastomosis in rats with protein-energy malnutrition. *Colorectal Disease.* 10: 469-478.
- Sánchez, E., M. Vargas, M. Mora, J.M. Ortega, A. Serrano, E. Freer, A. Sittenfeld. 2004. Descripción ultraestructural de *Euglena pailasensis* (Euglenozoa) del Volcán Rincón de la Vieja, Guanacaste, Costa Rica. *Rev Biol Trop.* 52(1):31-40.
- Saravan, G., L. Pari. 2007. Effect of a Herbal Drug, Cogent db on Plasma and Tissue Glycoproteins in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *J Med Plant Res.* 1: 83–91.
- Sarbini, S.R., S. Kolida, T. Naeye, A. Einerhand, Y. Brison, M. Remaud-Simeon, P. Monsan, G.R. Gibson, R.A. Rastall. 2011. *In Vitro* fermentation of linear and α -1,2,-branched dextrans by the human fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol.* 77(15):5307. DOI:10.1128/aem.02568-10.
- Saulnier, D.,M.,A., D. Molenaar, W.M. de-Vos, G.R. Gibson, S. Kolida. 2007. Identification of prebiotic fructooligosaccharide metabolism in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 through microarrays. *Appl Environ Microbiol.* 73(6): 1753-1765.
- Sánchez, A., R. Maceiras, A. Cancela, A. Pérez. 2012. Culture aspectos of *Isochrysis galbana* for biodiesel production. *Appl Energy.* doi:10.1016/j.apenergy.2012.03.027

Sawada, K., K. Kawabata, T. Yamashita, K. Kawasaki, N. Yamamoto, H. Ashida. 2012. Ameliorative effects of polyunsaturated fatty acids against palmitic acid-induced insulin resistance in L6 skeletal muscle cells. *Lipids Health Disease*. 11 (36):2-9.

Shen, L., K.J. Perason, Y. Xiong, C.M. Lo, P. Tso. 2008. Characterization of apolipoprotein A-IV in brain areas involved in energy homeostasis. *Physiol Behavior*. 95:151-157.

Sierra, S., F. Lara-Villoslada, M. Olivares, J. Jiménez, J. Boza, J., Xaux. 2004. La expresión de IL-10 interviene en la regulación de la respuesta inflamatoria por los ácidos grasos omega 3. *Nutr Hosp*. 19(6):376-382.

Sirin, S., R. Trobajo, C. Ibañez, J. Salvadó. 2012. Harvesting the microalgae *Phaedactylum tricorutum* with polyaluminum chloride, aluminium sulphate, hitosan and alkalinity-induced flocculation. *J Appl Phycol*. 24:1067-1080.

Smith, D.S., C.D. Ferris. 2003. Current concepts in diabetic gastroparesis. *Drugs*. 63(13): 1339-1358.

Soccol, C.R., L. Porto de Souza-Vandenberghe, M. Rigon-Spier, A. Bianchi-Pedroni Medeiros, C. Tiemi-Yamaguishi, J. De Dea-Lindner. 2010. The potential of the probiotics: A review. *Food Technol Biotechnol*. 48(4): 413–434.

Soodini, G.R. 2004. Adiponectina and leptina in relation to insulin sensitivity. *Metab Syndr Relat Disord*. 2: 114-123.

Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran, A. Isambert. 2006. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng*. 101: 87–96.

Stan, S., E. Delvin, M. Lambert, E. Seidman, E. Levy. 2003. Apo A-IV: an update on regulation and physiologic function. *Bioch Biophys Acta*. 1631:177-187.

Stanley, J.G., J. Jones. 1976. Feeding algae to fish. *Aquaculture*. 7: 219-223.

Sukenik A., W. Schröder, J. Lauer, G. Shelef, C.J. Soeder. 1985. Coprecipitation of microalgal biomass with calcium y phosphate ions. *Water Res.* 19(1):127-129.

Sukenink, A., R. Wahnon. 1991. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*. 97(1): 61-72.

Szkudelski, T. 2001. The mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol Res.* 50: 537–546.

Tago, A., S.I. Teshima. 2002. Preparation of [13C] eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis oculata*. *Fisheries Sci.* 68: 452–454.

Tannock, G.W., K. Munro, R. Bibiloni, M.A. Simon, P. Hargreaves, P. Gopa, H. Harmsen, G. Welling. 2004. Impact of consumption of oligosaccharide-containing biscuits on the fecal microbiota of humans. *Appl Environ Microbiol.* 70(4): 2129–2136.

Tejada-Tabayas, L.M., B.E. Griamldo-Moreno, O. Maldonado-Rodríguez. 2006. Percepciones de enfermos diabéticos y familiares acerca del apoyo familiar y el padecimiento. *RESPYN.* 7(1):G241-250.

Thompson-Chagoyán, O.C., J. Maldonado-Lozano, A.G. Hernández. 2004. La microbiota intestinal en el niño y la influencia de la dieta sobre su composición. *Alim Nutr Salud.* 11(2):37-48.

Van-Beelen, V.A., B. Spenkelink, H. Mooibroek, L. Sijtsma, D. Bosch, I.M. Rietjens, G.M. Alink. 2009. An n-3 PUFA- rich microalgal oil diet protects to a similar extent as a fish oil-rich diet against AOM-induced colonic aberrant crypt foci in F344 rats. *Food Chem Toxicol*, 47(2):316-320.

Van-Vliet, M., H.J.M. Harmsen, E.S.J.M. de Bont, W.J.E. Tissing. 2010. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. *PloS Pathog.* 6(5), doi: e1000879. doi:10.1371/journal.ppat 1000879

- Walter, J. 2008. Ecological role of Lactobacilli in the gastrointestinal tract: implication for fundamental and biomedical research. *Appl Environ Microbiol.* 74(16):4985-4996.
- Wikfors, G.H., M. Ohno. 2001. Impact of algal research in aquaculture. *J Phycol.* 37: 968-974.
- Winkler, P., D. Ghadimi, J. Shrezenmeir, J.P. Kraehenbuhl. 2007. Molecular and cellular basis of microflora-host interactions. *J Nutr.* 137: 756-772.
- Wolever T., R. Hegele, P. Connely, T. Ransom, J. Story. 2009. Long-term effect of soluble-fiber foods on postprandial fat metabolism in dyslipidemic subjects with apo *E3* and apogenotypes. *Am J Clin Nutr.* 66:584-90.
- Wu, T., K. Abu-Elmagd, G. Bond, M.A. Nalesnik, P. Randhawa, A.J. Demetris. 2003. A schema for histologic grading of small intestine allograft acute rejection. *Transplantation.* 75(8): 1241-1248.
- Wu X, D. Chen. 2006. Effects of sulfated polysaccharides on tumour biology. *West Indian Med.* 55(4): 270-273.
- Xue-hong Z., Z. Ai-Rong, K. Zu-Feng. 2004. Aldoses composition of polysaccharides in colloids produced by *Chlorella* sp. and *Isochrysis galbana*. *J Xiamen University (Nat Science).* 43(2):228-231.
- Zeng, X.Q., D.D. Pan, P.D. Zhou. 2011. Functional characteristic of *Lactobacillus fermentum* F1. *Curr Microbiol.* 62: 27-31
- Zeng, X.H., A.R. Zheng, Z.F. Chen. 2004. Aldoses Composition of Polysaccharides in Colloids Produced by *Chlorella* sp. and *Isochrysis galbana*. *J Xiamen Univer (Natural Science).* doi: CNKI:SUN:XDZK.0.2004-02-022
- Zhao, J., J.B. Frokjaer, A.M. Drewes, N. Ejksjaer, 2006. Upper gastrointestinal sensory-motor dysfunction in diabetes mellitus. *World J Gastroenterol.* 12(18): 2846-2857

Zock, P.L, J.H. de-Vries, M.B. Katan. 1994. Impact of myristic acid versus palmitic acid on serum lipid and lipoprotein levels in healthy women and men. *Arterioscl Throm Vasc.* 14: 567–575.