



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**EFFECTO NEUROPROTECTOR DE EXTRACTOS OBTENIDOS DE  
ALGAS.**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias**

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

P r e s e n t a

**Cindy Dávalos Quintana**

La Paz, Baja California Sur, enero de 2025.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 8:00 horas del día 08 del Mes de enero del 2025, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

### "Efecto neuroprotector de extractos obtenidos de algas"

Presentada por la alumna:

#### Cindy Dávalos Quintana

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

#### LA COMISIÓN REVISORA



Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz  
Co-Directora de Tesis



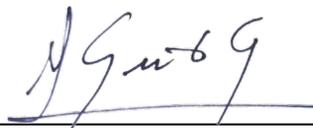
Dr. Celso Miguel da Maia Alves  
Co-Director de Tesis



Dra. Elena Palacios Mechetnov  
Co-Tutora de Tesis



Dra. Joana Rita Martins da Silva  
Co-Tutora de Tesis



Dra. Alejandra Nieto Garibay,  
Directora de Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos.



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



La Paz, Baja California Sur, a 08 de enero de 2025.

Los miembros del comité de tesis de la estudiante Cindy Dávalos Quintana del Programa de Maestría en Uso Manejo y Preservación de Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:  
iThenticate
- Filtros utilizados:  
Excluir citas  
Excluir bibliografía  
Excluir coincidencias inferiores a 12 palabras
- Porcentajes de similitud:  
5%  
Se muestra captura de pantalla

**Informe antiplagio Dávalos Quintana**

INFORME DE ORIGINALIDAD		
<b>5%</b>		
INDICE DE SIMILITUD		
FUENTES PRIMARIAS		
1	<a href="http://cibno.repositorioinstitucional.mx">cibno.repositorioinstitucional.mx</a> <small>Internet</small>	666 palabras — 3%
2	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> <small>Internet</small>	54 palabras — < 1%
3	<a href="http://www.pjm.microbiology.pl">www.pjm.microbiology.pl</a> <small>Internet</small>	54 palabras — < 1%
4	<a href="http://patents.google.com">patents.google.com</a> <small>Internet</small>	48 palabras — < 1%
5	Janaina Sánchez García. "Desarrollo y caracterización de nuevas harinas de lenteja y quinoa fermentadas con <i>Pleurotus ostreatus</i> ", Universitat Politècnica de Valencia, 2023 <small>Crossref Posted Content</small>	32 palabras — < 1%
6	<a href="http://repositorio.xoc.uam.mx">repositorio.xoc.uam.mx</a> <small>Internet</small>	27 palabras — < 1%
7	<a href="http://academicjournals.org">academicjournals.org</a> <small>Internet</small>	23 palabras — < 1%
8	<a href="http://nanopdf.com">nanopdf.com</a> <small>Internet</small>	22 palabras — < 1%
9	<a href="http://core.ac.uk">core.ac.uk</a> <small>Internet</small>	

**Directores, Co-directores**

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz

Dr. Celso Miguel da Maia Alves

**Estudiante**

B.M. Cindy Dávalos Quintana

**Personal técnico de asesoría en el análisis**

M.C. Ana María Talamantes Cota

## **Conformación de Comités**

### **Comité Tutorial**

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Directora de Tesis

Dr. Celso Miguel da Maia Alves  
Instituto Politécnico de Leiria  
Co-Director de Tesis

Dra. Elena Palacios Mechetnov  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Tutora de Tesis

Dra. Joana Rita Martins da Silva  
Instituto Politécnico de Leiria  
Co-Tutora de Tesis

### **Comité Revisor de Tesis**

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz  
Dr. Celso Miguel da Maia Alves  
Dra. Elena Palacios Mechetnov  
Dra. Joana Rita Martins da Silva

### **Jurado de Examen**

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz  
Dr. Celso Miguel da Maia Alves  
Dra. Elena Palacios Mechetnov

### **Suplente**

Dra. Joana Rita Martins da Silva

## Resumen

La neurodegeneración es la pérdida progresiva de estructura y función neuronal, causada por factores como el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la muerte celular. Las algas producen compuestos bioactivos como ácidos grasos, pigmentos fotosintéticos y fenoles, destacando su potencial antioxidante, que pueden contrarrestar los efectos provocados por la neurodegeneración. El objetivo de este estudio es evaluar el efecto neuroprotector de extractos obtenidos de algas en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y inducida a la neurotoxicidad con 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Se obtuvieron extractos con los solventes cloroformo:metanol, diclorometano:metanol y acetona y se determinó la actividad antioxidante de las muestras algales mediante tres métodos: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), poder de reducción antioxidante del ion férrico (FRAP) y la actividad eliminadora de radicales del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Se evaluó la citotoxicidad de los extractos en células SH-SY5Y y se eligieron las dos concentraciones máximas no citotóxicas. Las células SH-SY5Y se indujeron a la neurodegeneración con 6-OHDA (100  $\mu$ M) y se evaluó la neuroprotección de los extractos no citotóxicos mediante pruebas de viabilidad. Se llevaron a cabo estudios *in vitro* para conocer el mecanismo de protección de los extractos: cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ERO), cuantificación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), cambios en el potencial de membrana mitocondrial (PMM) y la muerte celular por actividad de la caspasa-3. Se eligieron los extractos que mostraron actividad neuroprotectora y se llevó a cabo la detección química de sus componentes mediante resonancia magnética nuclear de protón ( $^1H$  RMN) y cromatografía de gases (GC-MS). Los extractos de *Dunaliella tertiolecta* y *Ulva lactuca* protegieron a las células SH-SY5Y disminuyendo la generación de ERO, la disfunción mitocondrial y la actividad de la caspasa-3. Los espectros de los extractos de *U. lactuca* y *D. tertiolecta* muestran principalmente lípidos, aminoácidos y ácidos orgánicos, con mayor abundancia de moléculas lipofílicas. Este estudio destaca el potencial neuroprotector de los extractos orgánicos de *D. tertiolecta* y *U. lactuca* como fuentes de compuestos con efectos terapéuticos prometedores para enfermedades neurodegenerativas y sugieren la necesidad de más estudios sobre sus mecanismos y aplicaciones clínicas.

**Palabras clave:** Neuroprotección, 6-OHDA, línea celular SH-SY5Y, estrés oxidativo, apoptosis, disfunción mitocondrial, algas marinas.

ORCID: 0009-0008-4950-1558

Vo.Bo. Co-Directores de Tesis

---

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz

---

Dr. Celso Miguel da Maia Alves

## Summary

Neurodegeneration is the progressive loss of neuronal structure and function, caused by factors such as oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and cell death. Algae produce bioactive compounds such as fatty acids, photosynthetic pigments, and phenols, highlighting their antioxidant potential, which can counteract the effects caused by neurodegeneration. This study aims to evaluate the neuroprotective effect of algae extracts on the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line induced to neurotoxicity with 6-hydroxydopamine (6-OHDA). Extracts were obtained using chloroform:methanol, dichloromethane:methanol, and acetone as solvents, and the antioxidant activity of the algal samples was determined through three methods: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ferric reducing antioxidant power (FRAP), and superoxide anion radical scavenging activity ( $O_2^{\cdot-}$ ). The cytotoxicity of the extracts was evaluated in SH-SY5Y cells, and the two maximum non-cytotoxic concentrations were selected. SH-SY5Y cells were induced into neurodegeneration with 6-OHDA (100  $\mu$ M), and the neuroprotection of the non-cytotoxic extracts was assessed using viability assays. *In vitro* studies were performed to elucidate the protective mechanism of the extracts: quantification of reactive oxygen species (ERO), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), changes in mitochondrial membrane potential (PMM), and cell death via caspase-3 activity. Extracts with neuroprotective activity were selected, and their chemical composition was analyzed using proton nuclear magnetic resonance ( $^1H$  NMR) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Extracts from *Dunaliella tertiolecta* and *Ulva lactuca* protected SH-SY5Y cells by reducing ERO generation, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activity. The spectra of *U. lactuca* and *D. tertiolecta* extracts primarily showed lipids, amino acids and organic acids, with a higher abundance of lipophilic molecules. This study highlights the neuroprotective potential of organic extracts from *D. tertiolecta* and *U. lactuca* as promising sources of therapeutic compounds for neurodegenerative diseases and suggests the need for further studies on their mechanisms and clinical applications.

**Keywords:** Neuroprotection, 6-OHDA, SH-SY5Y cell line, oxidative stress, apoptosis, mitochondrial dysfunction, marine algae.

ORCID: 0009-0008-4950-1558

Vo.Bo. Co-Directores de Tesis



---

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz



---

Dr. Celso Miguel da Maia Alves

**Dedicatoria**

*A mis padres, Verónica y Uriel quienes me han apoyado siempre de manera total e incondicional. Su amor y apoyo fue la base para la culminación de esta etapa en mi vida.*

*A mi hermana Mariel, contigo todo, sin ti nada.*

## **Agradecimientos**

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) y a la Dirección de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, por el apoyo otorgado durante mi formación académica, por permitirme realizar mis estudios, hacer uso de las instalaciones y recursos para la elaboración de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca otorgada (No. 828968).

Al Instituto Politécnico de Leiria (IPL) y a la Unidade Regional de investigação do Centro de Ciências do Mar e do Ambiente (MARE - Politécnico de Leiria) por permitirme realizar mi estancia de investigación, así como facilitarme los recursos materiales y biológicos necesarios para el desarrollo de esta tesis y por permitirme utilizar sus instalaciones.

A mis Co-directores, la Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz y al Dr. Celso Miguel da Maia Alves, y a mis Co-tutoras, la Dra. Joana Rita Martins da Silva y la Dra. Elena Palacios Mechetnov, por su apoyo, guía, enseñanzas y paciencia durante todo el proceso de este proyecto de tesis.

A la Colección de Dinoflagelados Marinos (CODIMAR) y a la Colección de Microalgas del CIBNOR por proporcionarme el material biológico utilizado en este trabajo. Encargados: Dra. Lourdes Morquecho Escamilla y técnico Q.F.B Marte Virgen, respectivamente.

Al Laboratorio de Alimento vivo: Técnicos Julián Garzón y Gabriel González. Por también brindarme el material biológico utilizado en este trabajo.

Al Laboratorio de Metabolismo de Lípidos: a la Dra. Elena Palacios Mechetnov y a la Técnico María Olivia Arjona López. Por ayudarme a lo largo de mi Maestría.

A la M.C. Delia I. Rojas por ser mi amiga en CIBNOR, por siempre escucharme y darme consejo durante todo el proceso de mi estudio de maestría.

Al grupo de trabajo de los productos naturales marinos liderado por Prof. Rui Pedrosa en Portugal, en especial al Dr. Celso Alves, a la Dra. Joana Silva, a la Dra. Alice Martins, a la M.C. Patricia Susano y a la Dra. Marta Neves, por ayudarme siempre que lo necesité en el laboratorio y por fuera, agradezco y valoro su tiempo, apoyo y enseñanzas.

A mis amigos en Portugal, Édina Blasi, Alice Martins y Roberto Martins muito obrigada pela vossa amizade e apoio, sem vocês a minha experiência em Peniche não teria sido a mesma, beijos!

A mi amiga M.C. Laura Cota, por tu incondicional apoyo amistad, por todas las risas, por tu consuelo en los momentos difíciles, por ser tu y por nunca dejarme sola. Sin ti nada sería igual.

A mis amigos, en especial Pollo, Josh, Dante, Nat, Draco, Angy, Edu y todos a quienes considero amigos, su amistad y compañía es un abrazo al corazón, gracias infinitas por cada risa, aventura y anécdota.

A mi familia lejos de México que en el transcurso de estos años me ha brindado asilo, apoyo y amor, en especial a mi tía Gaby, a mis primos Karemil, Arturo, Isaac, a mi abuelo Genaro Dávalos y su maravillosa familia, así como a mi tía Naoko y mis primos, gracias por su cariño y apoyo.

A mi familia, en especial a mis padres Verónica Quintana y Uriel Dávalos, y a mi hermana Mariel Dávalos por siempre estar para mí, por aguantar mi estrés y mi caos, por quererme y apoyarme siempre. Gracias por su fe en mi y en mis capacidades, por su amor y sacrificio, por acompañarme en cada paso y no soltarme. No existen las palabras para expresar mi amor y gratitud por ustedes.

Y a mis niñas Dona y Athena, mis compañeras de desvelos y de trabajo en casa. Su amor y compañía es invaluable.

Me siento eternamente agradecida con todos y cada una de las personas involucradas en el desarrollo de esta etapa de mi vida. A todos los llevo por siempre en el corazón, sin ustedes nada de esto habría sido posible. Comparto este logro con todos.

**¡MUCHAS GRACIAS!**

## Contenido

Resumen .....	i
Summary .....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido.....	vi
Lista de figuras .....	viii
Lista de tablas .....	xi
Abreviaturas .....	xii
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Neurodegeneración.....	1
1.2 Principales factores involucrados en la neurodegeneración .....	2
1.2.1 Estrés oxidativo .....	2
1.2.2 Disfunción mitocondrial .....	4
1.2.3 Apoptosis.....	4
1.3 Algas marinas: fuentes de compuestos bioactivos como potenciales neuroprotectores .....	6
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>9</b>
2.1 Efecto neuroprotector en modelos celulares .....	9
2.1.1 La 6-hidroxidopamina (6-OHDA) como agente de neurodegeneración .....	10
2.2 Las algas como fuente de compuestos bioactivos .....	13
2.3 Las algas como potenciales neuroprotectores en líneas celulares.....	14
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>17</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>18</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
5.1 Objetivo general .....	19
5.2 Objetivos particulares .....	19
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
6.1 Material biológico y condiciones de cultivo.....	20
6.1.1 Microalgas .....	20
6.1.2 Macroalgas .....	21
6.2 Extracción de compuestos bioactivos para evaluación neuroprotectora .....	21
6.2.1 Extracción con cloroformo:metanol (CFMO:MeOH) .....	21
6.2.2 Extracción con diclorometano:metanol (DCMO:MeOH) .....	22
6.2.3 Extracción acetona .....	22
6.3 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos de algas marinas .....	23
6.3.1 Actividad eliminadora de radicales 2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).....	23
6.3.2 Actividad eliminadora de radicales del anión superóxido ( $O_2^-$ ) .....	25
6.3.3 Poder antioxidante reductor férrico (FRAP) .....	26
6.4 Análisis <i>in vitro</i> en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y .....	27
6.4.1 Condiciones de cultivo y mantenimiento de células SH-SY5Y .....	27
6.4.2 Viabilidad celular de las células SH-SY5Y con los extractos algales .....	27

6.4.3 Evaluación del potencial neuroprotector de los extractos algales en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y .....	29
6.4.3.1 Viabilidad celular de las células SH-SY5Y con exposición a la 6-hidroxidopamina y a los extractos algales.....	28
6.4.4 Mecanismos de neuroprotección .....	30
6.4.4.1 Estrés oxidativo.....	29
6.4.4.1.1 Determinación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO).....	29
6.4.4.1.2 Cuantificación del peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	30
6.4.4.2 Disfunción mitocondrial.....	31
6.4.4.2.1 Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM).....	31
6.4.4.3 Apoptosis.....	33
6.4.4.3.1 Caspasa 3.....	33
6.5 Caracterización química de los extractos neuroprotectores.....	35
6.5.1 Detección química mediante Resonancia Magnética Nuclear de protón ( <sup>1</sup> H RMN) ....	36
6.5.2 Cuantificación de ácidos grasos por Cromatografía de Gases-Espectrofotometría de Masas (GC-MS) .....	37
6.6 Análisis estadístico .....	38
<b>7. RESULTADOS</b> .....	40
7.1 Actividad antioxidante de los extractos de algas .....	40
7.2 Viabilidad celular de las células SH-SY5Y expuestas a los extractos de algas.....	41
7.3 Actividad neuroprotectora en células SH-SY5Y.....	47
7.4 Mecanismos de neuroprotección .....	50
7.5 Perfil químico de los extractos .....	55
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	59
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	68
<b>10. LITERATURA CITADA</b> .....	70
<b>11. ANEXOS</b> .....	88
Anexo A. Descripción de las microalgas utilizadas.....	88
Anexo B. Descripción de las macroalgas utilizadas.....	90
Anexo C. Actividad antioxidante de los extractos de microalgas y macroalgas. ....	91
Anexo D. Viabilidad de células SH-SY5Y tras su exposición a distintas concentraciones. ....	92

## Lista de figuras

- Figura 1.** Mecanismos asociados con la neurodegeneración que están implicados en la progresión y patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas. El estrés oxidativo incluye la disminución de la actividad de enzimas antioxidantes ( $\downarrow$ ), el aumento de especies reactivas de oxígeno (ERO,  $\uparrow$ ), daño en el ADN, oxidación de proteínas y peroxidación lipídica. La disfunción mitocondrial se caracteriza por daños en la membrana mitocondrial externa, por ejemplo, daños en el potencial de membrana mitocondrial (PMM) y la liberación de factores mitocondriales. Finalmente, la apoptosis incluye la activación de caspasas y la expresión de factores pro-apoptóticos, todo lo cual contribuye a la neurodegeneración (Tomado de Mohd y Sirajudeen, 2020). .....2
- Figura 2.** Apoptosis: vías extrínseca e intrínseca. La vía extrínseca se activa por la unión de ligandos al receptor de muerte en la superficie celular, lo que desencadena la activación de la pro-caspasas-8, que a su vez activan caspasas efectoras (como la caspasas-3), responsables de ejecutar la apoptosis. La vía intrínseca o mitocondrial, es activada por estímulos de estrés que inducen la liberación de citocromo C desde la mitocondria. Este evento, mediado por la formación del apoptosoma, promueve la activación de la caspasa-9, que también activa caspasas efectoras. Ambas vías convergen en la activación de estas caspasas, culminando en la apoptosis celular. (Tomado de Bhosale *et al.*, 2020). .....6
- Figura 3.** Microalgas **a)** *Dunaliella tertiolecta*, **b)** *Chlorella capsulata*, **c)** *Rhodorus marinus*, **d)** *Porphyridium cruentum*, **e)** *Isochrysis galbana*, **f)** *Chaetoceros calcitrans* y **g)** *Alexandrium margalefii* y macroalgas **h)** *Sargassum horridum*, **i)** *Spyridia sp.* y **j)** *Ulva lactuca*. Escala de la barra de a-g: 5  $\mu\text{m}$  y escala de la barra de h-j: 5 cm.....8
- Figura 4.** Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (DMSZ no. 209). (Tomado de Leibniz Institute DSMZ, s.f.).....10
- Figura 5.** Estructura química de la **a)** 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y **b)** dopamina.....11
- Figura 6.** Mecanismos de acción de la 6-OHDA (Tomado de Wal *et al.*, 2022). Especies reactivas de oxígeno (ERO), 6-hidroxidopamina (6-OHDA), transportadores de dopamina (DAT). .....12
- Figura 7.** Actividad antioxidante por actividad eliminadora del radical DPPH de los extractos de **a)** microalgas y **b)** macroalgas, a una concentración de 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . *Dunaliella tertiolecta* (T), *Chlorella capsulata* (N), *Rhodorus marinus* (M), *Porphyridium cruentum* (C), *Isochrysis galbana* (G), *Chaetoceros calcitrans* (K), *Alexandrium margalefii* (L), *Ulva lactuca* (U), *Sargassum horridum* (H), *Spyridia sp.* (S). Los sufijos en las abreviaciones de los letreros en el eje x señalan el solvente orgánico utilizado para obtener el extracto: cloroformo:metanol (CFMO:MeOH, F), diclorometano:metanol (DCMO:MeOH, D) y acetona (A). Los resultados se expresan como % de reducción del DPPH en relación al control. Los valores en cada columna representan el promedio  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y el control (ANOVA,  $p < 0.05$ ). .....40
- Figura 8.** Actividad antioxidante por actividad eliminadora del anión superóxido de los extractos de **a)** microalgas y **b)** macroalgas, a una concentración de 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . *Dunaliella tertiolecta* (T), *Chlorella capsulata* (N), *Rhodorus marinus* (M), *Porphyridium cruentum* (C), *Isochrysis galbana* (G), *Chaetoceros calcitrans* (K), *Alexandrium margalefii* (L), *Ulva lactuca* (U), *Sargassum horridum* (H), *Spyridia sp.* (S). Los sufijos en las abreviaciones de los letreros en el eje x señalan el solvente

orgánico utilizado para obtener el extracto: cloroformo:metanol (CFMO:MeOH, F), diclorometano:metanol (DCMO:MeOH, D) y acetona (A). Los resultados se expresan como% de reducción del NBT en relación al control. Los valores en cada columna representan el promedio  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y el control (ANOVA,  $p < 0.05$ ). .....41

**Figura 9.** Actividad antioxidante por el método de FRAP de los extractos de **a)** microalgas y **b)** macroalgas, a una concentración de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ . *Dunaliella tertiolecta* (T), *Chlorella capsulata* (N), *Rhodorus marinus* (M), *Porphyridium cruentum* (C), *Isochrysis galbana* (G), *Chaetoceros calcitrans* (K), *Alexandrium margalefii* (L), *Ulva lactuca* (U), *Sargassum horridum* (H), *Spyridia sp.* (S). Los sufijos en las abreviaciones de los letreros en el eje x señalan el solvente orgánico utilizado para obtener el extracto: cloroformo:metanol (CFMO:MeOH, F), diclorometano:metanol (DCMO:MeOH, D) y acetona (A). Los resultados se expresan como  $\mu\text{M FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$  de extracto. Los valores en cada columna representan el promedio  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y el control (ANOVA,  $p < 0.05$ ). .....42

**Figura 10.** Viabilidad celular de las células SH-SY5Y expuestas a los extractos de **a)** microalgas y **b)** macroalgas, a una concentración de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Vehículo (VH), *Dunaliella tertiolecta* (T), *Chlorella capsulata* (N), *Rhodorus marinus* (M), *Porphyridium cruentum* (C), *Isochrysis galbana* (G), *Chaetoceros calcitrans* (K), *Alexandrium margalefii* (L), *Ulva lactuca* (U), *Sargassum horridum* (H), *Spyridia sp.* (S). Los sufijos en las abreviaciones de los letreros en el eje x señalan el solvente orgánico utilizado para obtener el extracto: cloroformo:metanol (CFMO:MeOH, F), diclorometano:metanol (DCMO:MeOH, D) y acetona (A). Los valores en cada columna representan el promedio  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes por triplicado. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y el vehículo (ANOVA,  $p < 0.05$ ). .....43

**Figura 11.** Viabilidad celular de células SH-SY5Y expuesta a distintas concentraciones de los extractos de las microalgas **a)** *Dunaliella tertiolecta* (T) **b)** *Chlorella capsulata* (N), **c)** *Rhodorus marinus* (M), **d)** *Porphyridium cruentum* (C), **e)** *Isochrysis galbana* (G), **f)** *Chaetoceros calcitrans* (K), **g)** *Alexandrium margalefii* (L), y de las macroalgas **h)** *Ulva lactuca* (U), **i)** *Sargassum horridum* (H) y **j)** *Spyridia sp.* (S). Los sufijos en las abreviaciones de los letreros en el eje x señalan el solvente orgánico utilizado para obtener el extracto: cloroformo:metanol (CFMO:MeOH, F), diclorometano:metanol (DCMO:MeOH, D) y acetona (A). VH: vehículo. Los valores en cada columna representan el promedio  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y el vehículo (ANOVA,  $p < 0.05$ ). .....46

**Figura 12.** Actividad neuroprotectora de los extractos de **a)** microalgas en cloroformo:metanol (CFMO:MeOH), **b)** macroalgas en cloroformo:metanol (CFMO:MeOH), **c)** macroalgas en diclorometano:metanol (DCMO:MeOH), **d)** macroalgas en acetona (A) y **e)** macroalgas en acetona (A), en células SH-SY5Y incubadas con 6-OHDA ( $100 \mu\text{M}$ , 24 h). VH: vehículo, *Dunaliella tertiolecta* (T), *Chlorella capsulata* (N), *Rhodorus marinus* (M), *Porphyridium cruentum* (C), *Isochrysis galbana* (G), *Chaetoceros calcitrans* (K), *Alexandrium margalefii* (L), *Ulva lactuca* (U), *Sargassum horridum* (H), *Spyridia sp.* (S). Los valores en cada columna representan el promedio  $\pm$  el error

- estándar de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y el vehículo (ANOVA,  $p < 0.05$ ). .....50
- Figura 13.** Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en células SH-SY5Y después de incubarse con 6-hidroxidopamina (100  $\mu\text{M}$ , 6 h) en la ausencia y presencia de los extractos de *Dunaliella tertiolecta* (TF, 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y de *Ulva lactuca* (UD, 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Los sufijos en las abreviaciones de los letreros en el eje x señalan el solvente orgánico utilizado para obtener el extracto: cloroformo:metanol (CFMO:MeOH, F) y diclorometano:metanol (DCMO:MeOH, D). VH: vehículo, Vit. E: vitamina E (25  $\mu\text{M}$ ), peróxido de hidrógeno: ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 100  $\mu\text{M}$ ), 6-OHDA: 6-hidroxidopamina. Los valores en cada columna representan el promedio  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y el vehículo (ANOVA,  $p < 0.05$ ). .....52
- Figura 14.** Niveles de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) producidos por las células SH-SY5Y después de incubarse con 6-hidroxidopamina (100  $\mu\text{M}$ , 6 h) en la ausencia y presencia de los extractos de *Dunaliella tertiolecta* (TF, 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y de *Ulva lactuca* (UD, 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Los sufijos en las abreviaciones de los letreros en el eje x señalan el solvente orgánico utilizado para obtener el extracto: cloroformo:metanol (CFMO:MeOH, F) y diclorometano:metanol (DCMO:MeOH, D). VH: vehículo, Vit. E: vitamina E (25  $\mu\text{M}$ ), 6-OHDA: 6-hidroxidopamina. Los valores en cada columna representan el promedio  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y el vehículo (ANOVA,  $p < 0.05$ ). .....53
- Figura 15.** Potencial de membrana mitocondrial (PMM) en células SH-SY5Y después de incubarse con 6-hidroxidopamina (100  $\mu\text{M}$ , 6 h) en la ausencia y presencia de los extractos de *Dunaliella tertiolecta* (TF, 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y de *Ulva lactuca* (UD, 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Los sufijos en las abreviaciones de los letreros en el eje x señalan el solvente orgánico utilizado para obtener el extracto: cloroformo:metanol (CFMO:MeOH, F) y diclorometano:metanol (DCMO:MeOH, D). VH: vehículo, Vit. E: vitamina E (25  $\mu\text{M}$ ), 6-OHDA: 6-hidroxidopamina. Los valores en cada columna representan el promedio  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y el vehículo (ANOVA,  $p < 0.05$ ). .....54
- Figura 16.** Actividad de caspasa-3 en células SH-SY5Y después de incubarse con 6-hidroxidopamina (100  $\mu\text{M}$ , 6 h) en la ausencia y presencia de los extractos de *Dunaliella tertiolecta* (TF, 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y de *Ulva lactuca* (UD, 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Los sufijos en las abreviaciones de los letreros en el eje x señalan el solvente orgánico utilizado para obtener el extracto: cloroformo:metanol (CFMO:MeOH, F) y diclorometano:metanol (DCMO:MeOH, D). VH: vehículo, Vit. E: vitamina E (25  $\mu\text{M}$ ), 6-OHDA: 6-hidroxidopamina. Los valores en cada columna representan el promedio  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y el vehículo (ANOVA,  $p < 0.05$ ). .....55
- Figura 17.** Espectros de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$  RMN) en metanol deuterado (MeOD) de los extractos de *Dunaliella tertiolecta* (TF) (CR2, imagen superior) y *Ulva lactuca* (UD) (CR1, imagen inferior). Los espectros muestran las señales correspondientes a las diferentes regiones químicas presentes en los extractos de estas algas, obtenidas a 25 °C. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón (ppm) .....55

**Lista de tablas**

<b>Tabla 1.</b> Abreviatura de especies y extractos. ....	24
<b>Tabla 2.</b> Composición total de ácidos grasos de <i>Dunaliella tertiolecta</i> y <i>Ulva lactuca</i> . Los datos muestran la media $\pm$ desviación estándar. ....	56

## Abreviaturas

<b>µg</b>	microgramo
<b>µL</b>	microlitro
<b>µm</b>	micrometro
<b>µM</b>	micromolar
<b>µmol</b>	micromoles
<b><sup>1</sup>H RMN</b>	resonancia magnética nuclear de protón
<b>6-OHDA</b>	6-hidroxidopamina
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>AG</b>	ácidos grasos
<b>AGP</b>	ácidos grasos poliinsaturados
<b>AGS</b>	ácidos grasos saturados
<b>ALA</b>	ácido alfa-linolénico
<b>AMI</b>	ácidos grasos monoinsaturados
<b>ANOVA</b>	análisis de varianza
<b>Apaf-1</b>	factor activador de la proteasa apoptótica
<b>ARA</b>	ácido araquidónico
<b>ATP</b>	trifosfato de adenosina
<b>°C</b>	centígrado
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	calcio
<b>CAT</b>	catalasa
<b>CM-H<sub>2</sub>DCFDA</b>	diacetato de 5(6)-carboxi-20,70-diclorofluoresceína
<b>Caspasa</b>	cisteína-aspartato proteasas
<b>cel</b>	célula
<b>CFMO:MeOH</b>	cloroformo:metanol
<b>cm</b>	centimetro
<b>CO<sub>2</sub></b>	dióxido de carbono
<b>DAT</b>	transportadores de dopamina
<b>DCF</b>	carboxi-diclorofluoresceína
<b>DCMO:MeOH</b>	diclorometano:metanol
<b>DD</b>	dominio de muerte
<b>DHA</b>	ácido docosahexaenoico
<b>DMEM:F12</b>	Medio Eagle modificado de Dulbecco y mezcla de nutrientes F-12 de Ham
<b>DMSO</b>	dimetil sulfóxido
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
<b>EA</b>	enfermedad de Alzheimer
<b>EC<sub>50</sub></b>	concentración efectiva media
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetraacético
<b>EN</b>	enfermedades neurodegenerativas
<b>EO</b>	estrés oxidativo
<b>EP</b>	enfermedad de Parkinson
<b>EPA</b>	ácido eicosapentaenoico

<b>ERO</b>	especies reactivas de oxígeno
<b>FAME</b>	ésteres metílicos de ácidos grasos
<b>FBS</b>	suero fetal bovino
<b>Fe</b>	hierro
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	ion ferroso
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	ion férrico
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	cloruro de hierro (III)
<b>FeSO<sub>4</sub></b>	sulfato ferroso
<b>FIA</b>	factor inductor de apoptosis
<b>FID</b>	detector de ionización de llama
<b>FRAP</b>	poder antioxidante reductor férrico
<b>g</b>	gramo
<b>g</b>	gravidades
<b>GC-MS</b>	cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
<b>GPx</b>	glutación peroxidasa
<b>h</b>	hora
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peróxido de hidrógeno
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	ácido sulfúrico
<b>HCl</b>	ácido clorhídrico
<b>HPLC</b>	cromatografía líquida de alto rendimiento
<b>HRP</b>	peroxidasa de rábano picante
<b>IC<sub>50</sub></b>	concentración inhibitoria máxima media
<b>L</b>	litro
<b>m</b>	metro
<b>M</b>	molar
<b>mg</b>	miligramo
<b>min</b>	minutos
<b>mL</b>	mililitro
<b>mm</b>	milímetro
<b>mM</b>	milimolar
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro
<b>NAD(P)H</b>	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NADH</b>	nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NBT</b>	cloruro de nitroazul de tetrazolio
<b>nm</b>	nanómetros
<b>O<sub>2</sub></b>	oxígeno molecular
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	radical superóxido
<b>OH<sup>-</sup></b>	radical hidroxilo
<b>OMS</b>	organización mundial de la salud
<b>PARP-1</b>	poli(ADP-ribosa) polimerasa-1
<b>PBS</b>	buffer de fosfato salino
<b>pH</b>	potencial de hidrógeno
<b>PMM</b>	potencial de membrana mitocondrial

<b>PMS</b>	metosulfato de N-metilfenazina
<b>ppm</b>	partes por millón
<b>RL</b>	radicales libres
<b>s</b>	segundos
<b>SOD</b>	superóxido dismutasa
<b>SDA</b>	ácido estearidónico
<b>SH-SY5Y</b>	línea celular de neuroblastoma humano
<b>SNC</b>	sistema nervioso central
<b>SNc</b>	sustancia <i>nigra pars compacta</i>
<b>TNF</b>	factor de necrosis tumoral
<b>TPTZ</b>	2,4,6-tri(2-piridil)-s triazina
<b>u.a.f.</b>	unidades arbitrarias de fluorescencia
<b>UPS</b>	unidades prácticas de salinidad
<b>v</b>	volumen
<b>δ</b>	desplazamiento químico
<b>ΔΨ<sub>m</sub></b>	potencial de membrana mitocondrial
<b>λ</b>	longitud de onda

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Neurodegeneración

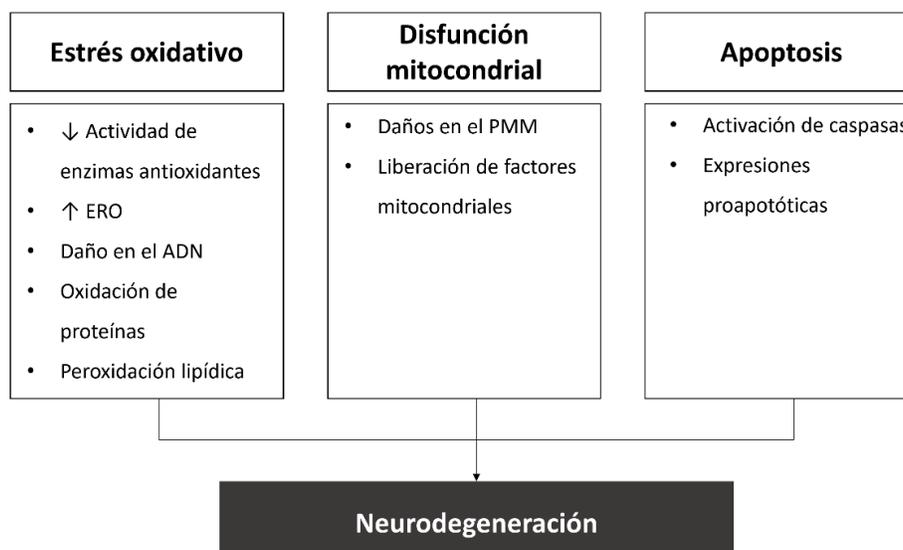
La neurodegeneración es la disfunción progresiva y la pérdida gradual de la estructura y función neuronal que resulta en la muerte de las neuronas. Este proceso está estrechamente asociado con un grupo de trastornos conocidos como enfermedades neurodegenerativas (EN), las cuales afectan al sistema nervioso central (SNC) y generan déficits en funciones cerebrales específicas como la memoria, el movimiento y la cognición (Gao y Hong, 2008; Yildiz-Unal *et al.*, 2015; Dugger y Dickson, 2017).

Un ejemplo es la enfermedad de Parkinson (EP) la cual es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, afectando al 2-3% de los adultos mayores a nivel mundial y a entre 300 y 500 mil personas en México (Hernández *et al.*, 2001; INAPAM, 2019; Leigh, 2020; Qiao *et al.*, 2023). Se caracteriza por la muerte progresiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta (SNc) y la presencia de cuerpos de Lewy, depósitos anormales de alfa-sinucleína (Mhyre *et al.*, 2012; Poewe *et al.*, 2017; Marín-López *et al.*, 2022).

En condiciones normales, las neuronas dopaminérgicas producen dopamina (DA), un neurotransmisor clave en la coordinación del movimiento muscular (Alexander *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2018). No obstante, cuando los niveles de dopamina caen por debajo del 80%, la estimulación de los receptores dopaminérgicos se interrumpe, desencadenando los síntomas característicos de la enfermedad (bradicinesia, rigidez, temblores en reposo, deterioro cognitivo, entre otros) (Nishit *et al.*, 2021; Golbe *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2023).

Aunque las causas exactas de las EN no están completamente dilucidadas, se reconoce que su desarrollo es multifactorial, involucrando estrés oxidativo (EO), disfunción mitocondrial y apoptosis, mecanismos clave que contribuyen con la degeneración y muerte neuronal (Fig. 1) (Mohd y Sirajundeen, 2020; Nishit *et al.*, 2021). En la EP, se ha documentado que el EO y la

disfunción mitocondrial están implicados directamente en la muerte de las células por apoptosis, exacerbando la progresión de la enfermedad (Levy *et al.*, 2009; Hwang, 2013).



**Figura 1.** Mecanismos asociados con la neurodegeneración que están implicados en la progresión y patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas. El estrés oxidativo incluye la disminución de la actividad de enzimas antioxidantes (↓), el aumento de especies reactivas de oxígeno (ERO, ↑), daño en el ADN, oxidación de proteínas y peroxidación lipídica. La disfunción mitocondrial se caracteriza por daños en la membrana mitocondrial externa, por ejemplo, daños en el potencial de membrana mitocondrial (PMM) y la liberación de factores mitocondriales. Finalmente, la apoptosis incluye la activación de caspasas y la expresión de factores pro-apoptóticos, todo lo cual contribuye a la neurodegeneración (Tomado de Mohd y Sirajudeen, 2020).

## 1.2 Principales factores involucrados en la neurodegeneración

### 1.2.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo (EO) es un estado de desequilibrio en el sistema de óxido-reducción celular, se caracteriza por la producción excesiva de radicales libres (RL) y especies reactivas de oxígeno (ERO) y la insuficiencia en las defensas antioxidantes celulares, lo que resulta en daños en la estructura y función de lípidos y proteínas, en el sistema de reparación del ADN, entre otros (Gandhi y Abramov, 2012; Aramouni *et al.*, 2023).

El EO representa uno de los principales mecanismos patogénicos en las EN (Silva *et al.*, 2018), debido a la acumulación de ERO, particularmente en el cerebro, un órgano altamente vulnerable debido a la riqueza en lípidos particularmente fosfolípidos y ácidos grasos poliinsaturados (AGP) y a su actividad metabólica elevada (Drechsel y Patel, 2008; Juárez-Olguín *et al.*, 2016; Niedzielska *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2021b). El cerebro en comparación con otros órganos consume una alta tasa de oxígeno ( $O_2$ ) para llevar a cabo todas sus funciones metabólicas, lo que favorece la aparición de las ERO, como el radical superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $OH^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Dorado-Martínez *et al.*, 2003; Turrens, 2003; Blesa *et al.*, 2015; Ogunro *et al.*, 2022).

Para contrarrestar los efectos del EO, las células cuentan con un sistema antioxidante compuesto por antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Davies, 2000; Chelikani *et al.*, 2004; Bolton *et al.*, 2009). Los antioxidantes interactúan con los RL neutralizándolos para retrasar o inhibir los procesos de oxidación al disminuir la concentración de oxidantes, uniéndose a iones metálicos que catalizan la producción de ERO, evitando el inicio de reacciones en cadena productoras de RL, entre otros (Dorado-Martínez *et al.*, 2003). Los antioxidantes enzimáticos neutralizan las ERO y previenen el daño celular al catalizar reacciones químicas específicas, por ejemplo, la superóxido dismutasa (SOD) (convierte el superóxido en peróxido de hidrogeno y oxígeno), la catalasa (CAT) (descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno), la glutatión peroxidasa (GPx) (reduce el peróxido de hidrógeno) y la glutatión reductasa (regenera el glutatión reducido a partir de glutatión oxidado) (Chelikani *et al.*, 2004; Dumont *et al.*, 2009; Gradinaru *et al.*, 2012; Aoyama y Nakaki, 2013).

Por su parte, los antioxidantes no enzimáticos actúan eliminando los RL debido a que reaccionan directamente con ellos donando o aceptando electrones, ejemplos de estas moléculas son el glutatión (tripéptido que participa en la eliminación de peróxidos y la regeneración de otros antioxidantes), vitaminas (vitamina C y E; elimina radicales libres en el medio acuoso y protege las membranas celulares al prevenir la peroxidación lipídica, respectivamente), carotenoides ( $\beta$ -

caroteno, neutralizan el oxígeno singlete y otros radicales), flavonoides, polifenoles, entre otros (Davies, 2000; Irato y Santovito, 2021).

### **1.2.2 Disfunción mitocondrial**

La mitocondria es un organelo clave en la célula, donde se llevan a cabo procesos esenciales como la respiración celular y la fosforilación oxidativa, además de regular la concentración de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en el citosol (Matuz-Mares *et al.*, 2022; Rosenstock *et al.*, 2022). Una captación excesiva de  $\text{Ca}^{2+}$ , junto a la sobreproducción de ERO, puede provocar el colapso del potencial de membrana mitocondrial (PMM) y la apertura de los poros de transición de la permeabilidad mitocondrial (Fig. 2) (Ullah *et al.*, 2014). Esto conlleva la inflamación de la matriz mitocondrial, el desacoplamiento mitocondrial y la ruptura de la membrana externa, liberando factores mitocondriales como el citocromo C y el factor inductor de apoptosis (FIA) hacia el citosol (Fig. 2) (Okouchi *et al.*, 2007; Wang y Youle, 2009).

La disfunción mitocondrial en las neuronas difiere de otras células del cuerpo por su alta dependencia energética, vulnerabilidad al estrés oxidativo y la necesidad de transporte mitocondrial a lo largo de axones y dendritas (Drechsel y Patel, 2008; Strobe *et al.*, 2022). Estas características hacen que las neuronas sean especialmente sensibles a alteraciones mitocondriales, comprometiendo la transmisión sináptica y la homeostasis iónica (Alshial *et al.*, 2023). En enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, esta disfunción desempeña un papel central al agravar el daño oxidativo, la acumulación de proteínas tóxicas y la muerte neuronal progresiva, con consecuencias irreversibles dada la limitada capacidad de regeneración de las neuronas (Strobe *et al.*, 2022; Mohamen y Mohd, 2024).

### **1.2.3 Apoptosis**

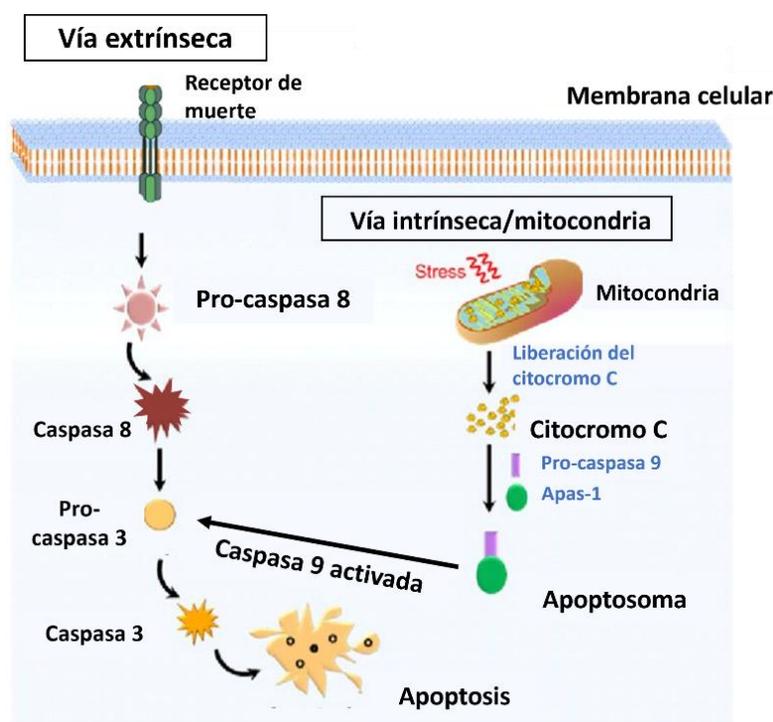
La apoptosis es un proceso programado de muerte celular que ocurre de forma natural y es fundamental para el desarrollo y mantenimiento de tejidos en organismos multicelulares (Okouchi *et al.*, 2007; Yilmaz y Dilek, 2022; Sanghai y Tranmer, 2023). Este proceso implica

cambios morfológicos y bioquímicos, como la fragmentación del ADN, la escisión de proteínas específicas y el aumento de la permeabilidad mitocondrial (Ziegler y Groscurth, 2004; Yilmaz y Dilek, 2022). Esta forma programada de muerte celular en la EN ocurre en respuesta al daño crónico, estrés oxidativo y alteraciones mitocondriales (Sanghai y Tranmer, 2023; Silva *et al.*, 2023).

La apoptosis puede desencadenarse por señales extrínsecas e intrínsecas (Fig. 2). La vía extrínseca implica la activación de receptores de muerte tras la unión del ligando, iniciando una cascada de interacciones proteína-proteína (Okouchi *et al.*, 2007; Yilmaz y Dilek, 2022). Los receptores de muerte son proteínas transmembranales que pertenecen a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), se localizan en la membrana plasmática y se caracterizan por poseer un dominio intracelular conocido como dominio de muerte (DD) (O'Brien y Kirby, 2009; Yilmaz y Dilek, 2022). Por otro lado, la vía intrínseca implica la liberación de factores proapoptóticos del espacio intermembranal mitocondrial al citosol, lo que puede desencadenar apoptosis dependiente o independiente de caspasas, enzimas esenciales en los procesos de apoptosis y se encuentran en la célula como precursores inactivos (procaspasas), que necesitan ser activados mediante escisión proteolítica (Okouchi *et al.*, 2007; Tong *et al.*, 2023). Existen más de 12 caspasas clasificadas en tres grupos: las iniciadoras (caspasas-2, -8, -9, -10), las ejecutoras (caspasas-3, -6, -7) y las procesadoras (caspasas-1, -4, -5, -12, -13, -14). Las caspasas ejecutoras son responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren en las células apoptóticas, activándose a través de las caspasas iniciadoras (Denault y Salvesen, 2001).

En las EN, las caspasas desempeñan un papel central en la apoptosis, siendo las caspasas-3, -8 y -9 las más relevantes (Denault y Salvesen, 2001; Dailah, 2022; Wójcik *et al.*, 2024). La caspasa-9 se activa en la vía intrínseca (mitocondrial), mientras que la caspasa-8 lo hace en la vía extrínseca, y ambas convergen en la activación de la caspasa-3, responsable de ejecutar la apoptosis mediante la fragmentación de ADN y la degradación de proteínas esenciales (Sanghai y Tranmer, 2023; Wójcik *et al.*, 2024). La sobreactivación de estas caspasas contribuye a la pérdida neuronal

progresiva, característica de estas enfermedades (Wójcik *et al.*, 2024). Por ello, la inhibición de caspasas ha sido explorada como una estrategia terapéutica, buscando prevenir la muerte neuronal y proteger las conexiones sinápticas (Dailah, 2022).



**Figura 2.** Apoptosis: vías extrínseca e intrínseca. La vía extrínseca se activa por la unión de ligandos al receptor de muerte en la superficie celular, lo que desencadena la activación de la pro-caspasas-8, que a su vez activan caspasas efectoras (como la caspasas-3), responsables de ejecutar la apoptosis. La vía intrínseca o mitocondrial, es activada por estímulos de estrés que inducen la liberación de citocromo C desde la mitocondria. Este evento, mediado por la formación del apoptosoma, promueve la activación de la caspasa-9, que también activa caspasas efectoras. Ambas vías convergen en la activación de estas caspasas, culminando en la apoptosis celular. (Tomado de Bhosale *et al.*, 2020).

### 1.3 Algas marinas: fuentes de compuestos bioactivos como potenciales neuroprotectores

Las algas marinas presentan capacidad metabólica de bioacumulación de compuestos de alto valor agregado, como ácidos grasos poliinsaturados, pigmentos fotosintéticos, ficobiliproteínas y

polisacáridos, las convierte en una plataforma biotecnológica prometedora para aplicaciones en biocombustibles, suplementos alimenticios y compuestos farmacológicos, destacando su importancia como fuente de bioactivos neuroprotectores (Silva *et al.*, 2018; Khan *et al.*, 2018; Lizzul *et al.*, 2018; Thoré *et al.*, 2023; Maznah *et al.*, 2024).

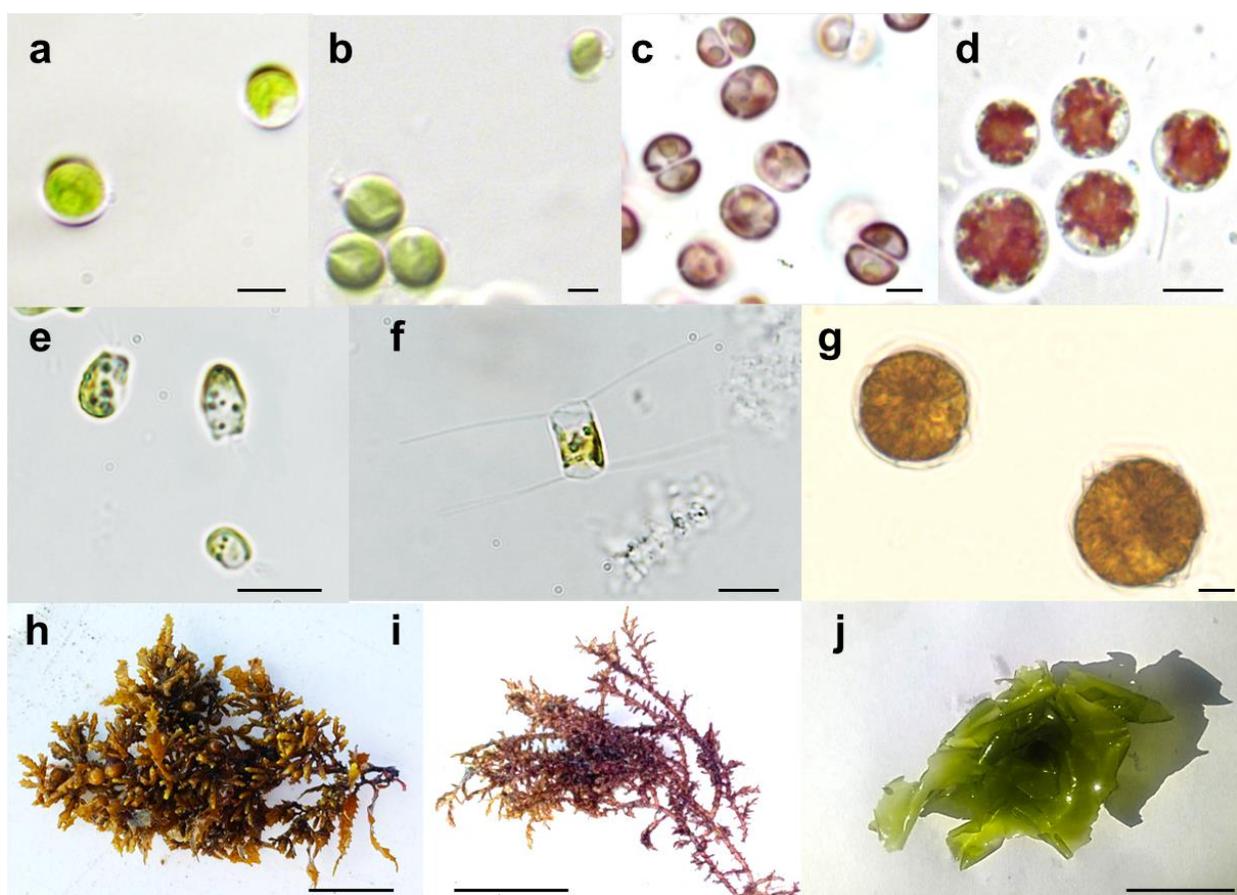
Las algas son organismos principalmente fotoautótrofos que incluyen miembros procariotas y eucariotas, conforman un grupo polifilético complejo, es decir, que no comparten un ancestro en común y comprenden organismos de distintos linajes evolutivos (Gilmour, 2023). Estas pueden clasificarse de manera general de acuerdo a su complejidad estructural, en microalgas (organismos unicelulares) y macroalgas (organismos pluricelulares) (Ronga *et al.*, 2019).

Las microalgas son un grupo diverso de microorganismos fotosintéticos autótrofos (2-200  $\mu\text{m}$ ), obtienen su energía principalmente de la luz solar, aunque algunas especies pueden crecer utilizando materia orgánica como fuente de energía o de carbono (heterótrofos) y algunas otras especies son capaces de alternar su fuente de energía según las condiciones (mixótrofos) (Chinnasamy *et al.*, 2010; Rodríguez-Zúñiga *et al.*, 2023). Estas desempeñan un papel clave en los ecosistemas al ser de los principales productores primarios y la base de las redes tróficas (Hurd *et al.*, 2009). Su diversidad se refleja en las aproximadamente 72,500 especies documentadas, las cuales habitan en una amplia variedad de ambientes, desde marino y dulceacuícolas hasta terrestres y extremos como la nieve (Guiry, 2012; Singh y Saxena, 2015).

Las macroalgas son organismos multicelulares fotosintéticos, varían en tamaño desde unos pocos centímetros hasta varios metros. Se distribuyen mayormente en ambientes acuáticos marinos, particularmente en aguas templadas y frías donde forman grandes praderas submarinas o bosques, que son esenciales para los ecosistemas acuáticos (Hurd *et al.*, 2014). Se estima que existen cerca de 30,000 especies, clasificadas en tres divisiones principales: algas verdes (Chlorophyceae), algas pardas (Phaeophyceae) y algas rojas (Rhodophyceae) (Yousef *et al.*, 2024). Estos grupos se distinguen principalmente por la presencia de pigmentos fotosintéticos

específicos que les confieren su color característico y les permiten captar distintas longitudes de onda de la luz solar (Hurd *et al.*, 2014).

Para el presente trabajo se tomaron como modelo de estudio a las microalgas *Dunaliella tertiolecta*, *Chlorella capsulata*, *Rhodorus marinus*, *Porphyridium cruentum*, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans* y *Alexandrium margalefii*, y a las macroalgas *Ulva lactuca*, *Sargassum horridum* y *Spyridia sp* (Fig. 3, Anexo A y B).



**Figura 3.** Microalgas **a)** *Dunaliella tertiolecta*, **b)** *Chlorella capsulata*, **c)** *Rhodorus marinus*, **d)** *Porphyridium cruentum*, **e)** *Isochrysis galbana*., **f)** *Chaetoceros calcitrans* y **g)** *Alexandrium margalefii* y macroalgas **h)** *Sargassum horridum*, **i)** *Spyridia sp* y **j)** *Ulva lactuca*. Escala de la barra de a-g: 5 µm y escala de la barra de h-j: 5 cm.

## 2. ANTECEDENTES

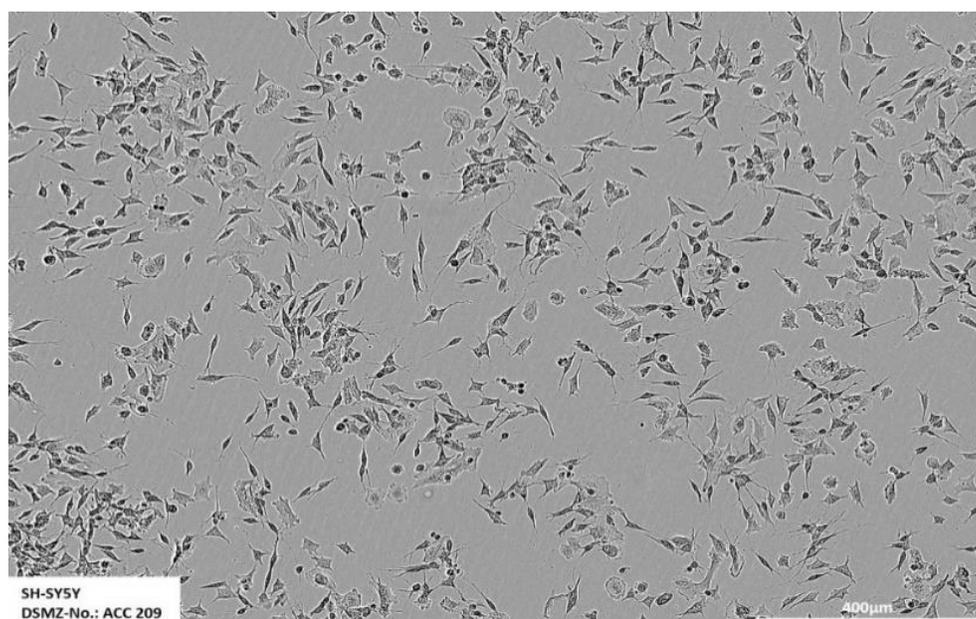
Las enfermedades neurodegenerativas (EN) constituyen un grupo heterogéneo de trastornos progresivos y crónicos que afectan a millones de personas en todo el mundo (Erkkinen *et al.*, 2018). Dado que la etiología de la mayoría de estas enfermedades sigue siendo en gran medida desconocida, los tratamientos actuales se centran principalmente en el manejo paliativo de los síntomas. Ante esta limitación, se ha propuesto el uso de compuestos biológicos como potenciales terapéuticos capaces de desacelerar la progresión de la enfermedad. Esta estrategia busca aprovechar el amplio espectro de actividades biológicas y farmacológicas de diversas fuentes naturales para el desarrollo de fármacos con propiedades neuroprotectoras. Dichos compuestos podrían mitigar el estrés oxidativo, restaurar la función mitocondrial y prevenir la muerte celular por apoptosis, procesos clave en la neurodegeneración asociada a estas enfermedades (Angeloni y Vauzour, 2019; Andrade *et al.*, 2023).

### 2.1 Efecto neuroprotector en modelos celulares

Un modelo de estudio es un sistema que se utiliza para la investigación y comprensión de los efectos de determinado compuesto en diversas áreas de interés como la biología o la medicina (Son, 2022). Estos modelos nos permiten replicar, controlar y manipular aspectos específicos para realizar experimentos y obtener datos aplicables en la realidad (Mukherjee, 2023).

En estudios de neurodegeneración, los modelos de estudio más comunes son los modelos animales; por ejemplo, ratones (Cohen *et al.*, 2003; Landers *et al.*, 2014), pez cebra (Xi *et al.*, 2011), y más recientemente las líneas celulares (Silva *et al.*, 2018; 2023). Las líneas celulares son poblaciones celulares que han derivado de una célula única o de tejidos humanos, animales o vegetales, y son cruciales en la investigación de laboratorio por su capacidad de crecer indefinidamente (Sogos *et al.*, 2021; Mukherjee, 2023). Esto permite la obtención de resultados rápidos, rentables y reproducibles, por lo que se son ampliamente utilizados para predecir la actividad *in vitro* de compuestos bioactivos como neuroprotectores (Novosadov *et al.*, 2019; Slanzi *et al.*, 2020; Mukherjee, 2023).

Para estudiar la función y diferenciación neuronal, y evaluar el efecto neuroprotector de compuestos bioactivos de interés, una de las más utilizadas es la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Fig. 4) (de Medeiros *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2019 - 2023). Las células SH-SY5Y son células con gran similitud a las neuronas dopaminérgicas (células que se ven afectadas principalmente en la EP), por lo que su uso se ha popularizado como modelo para estudiar especialmente a esta enfermedad (Koçancı, 2024).



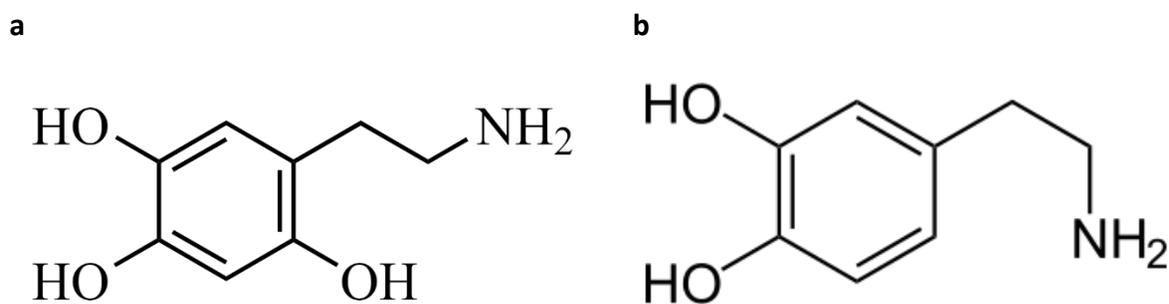
**Figura 4.** Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (DSMZ no. 209). (Tomado de Leibniz Institute DSMZ, s.f.).

### 2.1.1 La 6-hidroxidopamina (6-OHDA) como agente de neurodegeneración

La 6-hidroxidopamina (6-OHDA) es un compuesto neurotóxico sintético análogo de la dopamina (Fig. 5), fue aislada por primera vez en 1959 por Shinjiro Senoh, un bioquímico japonés (Senoh y Witkop, 1959a, b; Senoh *et al.*, 1959), y sus efectos biológicos se demostraron por primera vez en la década de 1960 por Senoh y el químico orgánico alemán Bernhard Witkop, cuando se demostró que induce depleción de la noradrenalina en el sistema nervioso autónomo y destruía terminaciones nerviosas simpáticas (Porter *et al.*, 1963, 1965; Stone *et al.*, 1963).

Diversos estudios han demostrado que las células SH-SY5Y expuestas a 6-OHDA son herramientas valiosas para el estudio de enfermedades neurodegenerativas, principalmente como la EP (Magalingam *et al.*, 2022). Así, la 6-OHDA es utilizada para inducir un daño neurológico en un modelo *in vivo* e *in vitro*, replicando algunos procesos celulares que están relacionados con la neurodegeneración como el estrés oxidativo (EO), lo que explica el potencial de los antioxidantes frente a la toxicidad de la 6-OHDA (Tiffany-Castiglioni *et al.*, 1982; Decker *et al.*, 1993; Lotharius *et al.*, 1999; Takakura *et al.*, 2023).

La 6-OHDA afecta principalmente a las neuronas gracias a que es compuesto altamente oxidable, que, al ser análogo de la dopamina, tiene alta especificidad y puede ser capturado por el transportador de dopamina y así adentrarse a la célula (Blum *et al.*, 2001; Fahn, 2003). Una vez dentro, la 6-OHDA se acumula y se autooxida, promoviendo la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y daños en la mitocondria, interviniendo con la producción de trifosfato de adenosina (ATP) (Blum *et al.*, 2001).

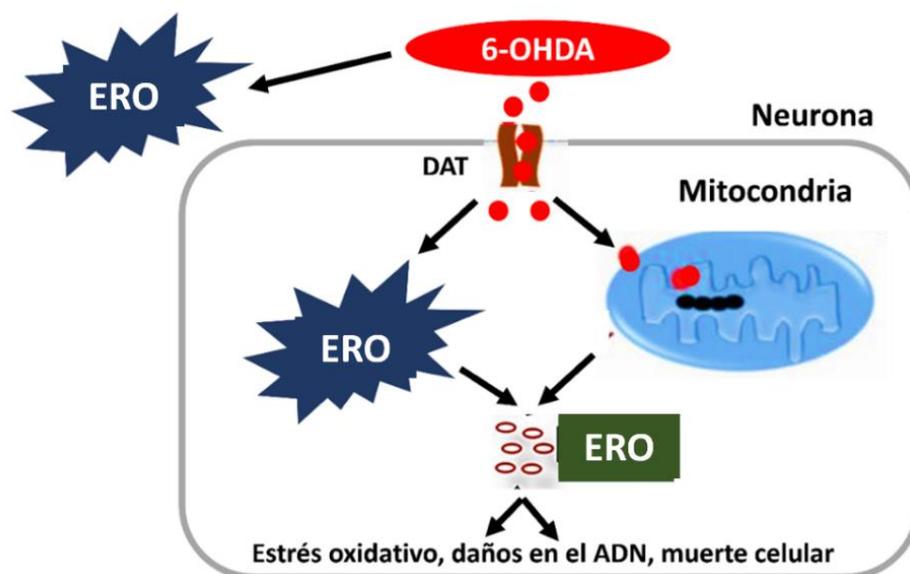


**Figura 5.** Estructura química de la **a)** 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y **b)** dopamina.

La toxicidad de la 6-OHDA se atribuye a varios mecanismos interrelacionados (Fig. 6). Primero, la 6-OHDA es altamente susceptible a la autooxidación tanto intra como extracelularmente, proceso que genera ERO como el superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Hernandez-Baltazar *et al.*, 2017). Estas moléculas contribuyen al EO, lo que provoca daño en lípidos de membranas, proteínas estructurales y funcionales, y el ADN nuclear y mitocondrial (Hernandez-Baltazar *et al.*, 2017). Adicionalmente, la 6-OHDA puede ser metabolizada por la enzima monoaminoxidasa

(MAO), que produce  $H_2O_2$  como subproducto (Blum *et al.*, 2001). Este compuesto, en presencia de metales de transición como el hierro, participa en la reacción de Fenton, generando radicales hidroxilos altamente reactivos que amplifican el daño oxidativo (Blum *et al.*, 2001; Rynkowska *et al.*, 2020).

Otro mecanismo clave es su capacidad para inhibir directamente el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que no solo reduce la producción de ATP, sino que también incrementa la generación de ERO a nivel mitocondrial, intensificando la disfunción energética neuronal (Kich *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2018). Además, la 6-OHDA tiene alta afinidad por los transportadores de dopamina (DAT), lo que facilita su acumulación en las neuronas dopaminérgicas. Una vez dentro de estas células, la 6-OHDA se oxida, generando ERO directamente en el citoplasma, lo que desencadena estrés oxidativo severo y activa las vías de apoptosis. Este último proceso incluye la liberación de citocromo c desde las mitocondrias, la activación de caspasas y la consecuente muerte celular programada (Kich *et al.*, 2016; Hernandez-Baltazar *et al.*, 2017).



**Figura 6.** Mecanismos de acción de la 6-OHDA (Tomado de Wal *et al.*, 2022). Especies reactivas de oxígeno (ERO), 6-hidroxidopamina (6-OHDA), transportadores de dopamina (DAT).

## 2.2 Las algas como fuente de compuestos bioactivos

Las algas son fuentes de una variedad de compuestos bioactivos con diversas propiedades terapéuticas (Mero y Conti, 2023; Mishra *et al.*, 2023). Estos compuestos comprenden una rica diversidad de moléculas tales como ácidos grasos, pigmentos fotosintéticos, terpenos, polisacáridos, entre otros que exhiben propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antimicrobianas, antivirales, antidiabéticos y antiapoptóticas (Angeloni *et al.*, 2019; Bueno *et al.*, 2020; Gallego *et al.*, 2022a., 2022b; Silva *et al.*, 2018; 2023; Ghaliaoui *et al.*, 2024; Tyagi y Sarma, 2024).

Unas de las principales moléculas producidas por las algas son los ácidos grasos y los pigmentos fotosintéticos, los cuales, llegan a constituir entre el 15 y el 25% de su biomasa seca, incluidos los ácidos grasos saturados e insaturados, destacando principalmente los poliinsaturados como el ácido eicosapentaenoico (EPA), el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido araquidónico (ARA), y, los pigmentos como clorofilas, carotenoides, ficobiliproteínas y fucoxantina (Bule *et al.*, 2018; Mansour *et al.*, 1999; Aravind y Inbakandan, 2022; Majhi *et al.*, 2022; Ahamefule *et al.*, 2023).

La composición de estos ácidos grasos es diferente entre las diferentes especies y filos a los que pertenecen, por ejemplo, las algas verdes (Chlorophyta) se caracterizan por acumular ácido alfa-linolénico (ALA) y ácido estearidónico (SDA), mientras que, las algas pardas (Ochrophyta) acumula predominantemente ácido EPA, ARA y SDA, y las algas rojas (Rhodophyta) principalmente EPA (Jónasdóttir, 2019; Susanto *et al.*, 2019; dos Santos *et al.*, 2021).

Por su parte, los dinoflagelados (Dinophyta) poseen una gran variedad de ácidos grasos de cadena larga altamente insaturados como el EPA y DHA, además de una gran variedad de pigmentos fotosintéticos como la clorofila *a*, clorofila *c* ( $c_1 + c_2$ ), peridinina, diadinoxantina y  $\beta$ -caroteno (Hallegraeff *et al.*, 1991; Mansour *et al.*, 1999; Usup *et al.*, 2008).

En cuanto a los pigmentos fotosintéticos, diversos estudios se han centrado en estudiar la

composición y propiedades de diferentes carotenoides como el  $\beta$ -caroteno, la astaxantina, la luteína, la fucoxantina y la zeaxantina, extraídos de microalgas como *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella vulgaris*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium cruentum* y *Dunaliella tertiolecta* (Guedes *et al.*, 2011; Raposo *et al.*, 2015; Talero *et al.*, 2015; Gong y Bassi, 2016).

Además, se ha encontrado que los compuestos bioactivos de macroalgas, como *Ulva lactuca*, así como *Sargassum sp* contienen compuestos bioactivos con actividades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antibacterianas y antivirales, como se demuestra en diversos estudios (Ouahabi *et al.*, 2024; Safitri *et al.*, 2024).

Entre otros compuestos que han demostrado actividad antioxidante en algas se encuentran los polifenoles y florotaninos (Balboa *et al.*, 2013). Ambos son predominantes en algas pardas, como *Padina australis*, y se ha documentado una fuerte correlación entre la actividad antioxidante y el contenido fenólico, así como los grupos hidroxilos presentes en estos compuestos. Esta relación se atribuye a su capacidad para actuar como eliminadores eficaces de radicales libres y quelantes de iones metálicos (Balboa *et al.*, 2013; Hermund *et al.*, 2018).

### **2.3 Las algas como potenciales neuroprotectores en líneas celulares**

Se ha estudiado el efecto de posibles compuestos neuroprotectores en ensayos *in vitro* con la finalidad de predecir su comportamiento. Souza *et al.* (2018), reportaron que el kappa-carragenano aislado del alga roja *Hypnea musciformis* mostró una actividad neuroprotectora contra la neurotoxicidad inducida por 6-OHDA en células SH-SY5Y mediante la modulación del potencial transmembrana de las mitocondrias y la reducción de la actividad de la caspasa 3.

Bueno *et al.* (2020), estudiaron la composición de carotenoides de la microalga *D. salina*, la cual es capaz de acumular cantidades relativamente altas de  $\beta$ -caroteno y otros carotenoides de interés cuando se cultiva en condiciones específicas. En este estudio probaron la inhibición de la

actividad de la acetilcolinesterasa de todos los extractos mediante una metodología de fluorescencia *in vitro*, del que desarrollaron un modelo que indica un efecto positivo de la luteína y el 15-cis- $\beta$ -caroteno en la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, una enzima importante en enfermedad neurodegenerativas como el Alzheimer.

Gallego *et al.* (2022b) evaluaron la actividad antiinflamatoria, antioxidante y neuroprotectora de extractos enriquecidos con carotenoides extraídos de cuatro microalgas: *Haematococcus pluvialis*, *Nannochloropsis oceanica*, *Tisochrysis lutea* y *Porphyridium cruentum*, a través de una batería de ensayos neuroprotectores *in vitro*. Los resultados indicaron que los extractos de microalgas ejercieron un moderado y selectivo potencial inhibidor de la colinesterasa, así como altas capacidades antioxidantes y antiinflamatorias, destacando los extractos de *N. oceanica* y *T. lutea*.

En un estudio complementario, Gallego *et al.* (2022a) analizaron un extracto de otra microalga, *D. salina* enriquecido con carotenoides mediante extracción supercrítica de fluidos. Este extracto mostró actividades antioxidantes, antiinflamatorias y anticolinérgicas cuando se evaluó en un modelo celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, lo que refuerza su potencial neuroprotector.

Por otro lado, investigaciones sobre macroalgas realizadas por Silva *et al.* (2018) han explorado el potencial neuroprotector de extractos obtenidos de diversas algas pardas de la costa portuguesa; *Sargassum muticum*, *Saccorhiza polyschides*, *Padina pavonica*, *Codium tormentosum* y *Ulva compressa*. Dicho estudio reportó que los extractos obtenidos con metanol y con diclorometano protegieron a las células de neuroblastoma SH-SY5Y del daño producido por la 6-OHDA, mediante la reducción de  $H_2O_2$ , la protección del potencial de membrana mitocondrial y la reducción de la actividad de la caspasa-3.

Así mismo, otros estudios realizados por Silva *et al.* (2019; 2023) han explorado el potencial neuroprotector de compuestos bioactivos aislados de diversas algas pardas, como el eleganolone,

eleganonal, bibiolone, fucoesterol de *Bifurcata bifurcata* y el monoterpenoide lactone de *Codium tomentosum*. En estos estudios, se evaluaron los efectos de estos compuestos en células SH-SY5Y expuestas a neurotoxicidad inducida por 6-OHDA. Los resultados destacaron su capacidad para disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), estabilizar el potencial de membrana mitocondrial y reducir la actividad de caspasa 3, entre otros mecanismos relacionados con vías de señalización neuroprotectoras. Estas evidencias subrayan el potencial de macroalgas y microalgas como fuentes prometedoras de compuestos neuroprotectores para aplicaciones biotecnológicas y terapéuticas.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas representan un desafío global debido al desgaste progresivo del sistema nervioso central y la pérdida progresiva de funciones cognitivas y motoras. Estas patologías afectan a millones de personas en todo el mundo, y tienen un impacto socioeconómico significativo. Tan solo en México, la enfermedad de Parkinson, tiene una prevalencia de 50 casos nuevos por cada 100 mil habitantes al año, afectando principalmente a hombres de 45 a 60 años. Los tratamientos farmacológicos tradicionales, aunque efectivos inicialmente, pierden eficacia con el tiempo y generan múltiples efectos secundarios, como trastornos del control de impulsos y somnolencia.

En este contexto, dada la falta de opciones terapéuticas, la mayoría de los estudios clínicos se centran en mejorar la eficacia de los medicamentos actuales. Por lo tanto, la búsqueda de nuevas alternativas que sean agentes terapéuticos de enfermedades como el Parkinson es de gran importancia. De este modo, los compuestos bioactivos presentes en las algas, han emergido como una alternativa prometedora. Gracias a sus propiedades antioxidantes, estos compuestos pueden neutralizar radicales libres y reducir el estrés oxidativo, uno de los principales factores que contribuyen a la neurodegeneración, protegiendo así a las neuronas de la muerte celular.

Además, las algas ofrecen ventajas adicionales al ser una fuente sostenible de compuestos bioactivos. Su cultivo tiene un bajo impacto ambiental y contribuye a la mitigación de problemas asociados a la sobreexplotación de recursos. Por tanto, la investigación de las algas marinas como fuente de compuestos neuroprotectores no solo responde a la necesidad de soluciones efectivas contra estas enfermedades, sino que también promueve un enfoque sustentable y económicamente viable, destacando su potencial para contribuir al desarrollo de alternativas terapéuticas accesibles y seguras.

#### **4. HIPÓTESIS**

Dado que las algas marinas contienen una amplia variedad de compuestos bioactivos con actividad antioxidante, incluyendo ácidos grasos poliinsaturados, pigmentos fotosintéticos, polifenoles, aminoácidos y vitaminas, se plantea que los extractos solubles en los solventes cloroformo:metanol, diclorometano:metanol y acetona obtenidos de microalgas y macroalgas seleccionadas ejercerán un efecto neuroprotector en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, mediante la mitigación del estrés oxidativo, la preservación de la función mitocondrial y la reducción de la apoptosis inducida por la exposición al neurotóxico 6-hidroxidopamina.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto neuroprotector *in vitro* de extractos obtenidos de diversas microalgas y macroalgas marinas contra la neurotoxicidad inducida por el tratamiento con 6-hidroxidopamina en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

### 5.2 Objetivos particulares

- Caracterizar y valorar la actividad antioxidante de los extractos solubles en cloroformo:metanol, diclorometano:metanol y acetona obtenidos de diversas microalgas y macroalgas.
- Evaluar la actividad neuroprotectora *in vitro* en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y mediante estudios de viabilidad celular, de los extractos solubles en cloroformo:metanol, diclorometano:metanol y acetona obtenidos de diversas microalgas y macroalgas, frente a la neurodegeneración inducida por 6-hidroxidopamina.
- Describir los efectos de los extractos solubles en cloroformo:metanol, diclorometano:metanol y acetona de diversas microalgas y macroalgas sobre las vías de señalización intracelular relacionadas con la neurotoxicidad inducida por la 6-hidroxidopamina, mediante estudios del estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y apoptosis.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Material biológico y condiciones de cultivo

#### 6.1.1 Microalgas

Las microalgas se obtuvieron de la colección de microalgas del CIBNOR (Lora-Vilchis, 2022) que a su vez, provenían de otras colecciones: La microalgas *Dunaliella tertiolecta* (CIB 67) del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) (1990), *Chlorella capsulata* (CIB 51) de la Colección de Algas de la Universidad de Texas en Austin (UTEX) LB 2074 (1990), *Rhodospirillum rubrum* (CIB 78) de UTEX LB 2760 (2013), *Porphyridium cruentum* (CIB 77) de UTEX 161 (1990), *Isochrysis galbana* (CIB 70) de UTEX LB 2307 (1990) y *Chaetoceros calcitrans* (CIB 38) de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (2015). Todas las microalgas se cultivaron en el medio de cultivo F/2 (Guillard y Ryther, 1962), a excepción de *C. calcitrans* que se cultivó con medio de cultivo F/2 y con 30 mg L<sup>-1</sup> de silicatos. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura 25 ± 1 °C, en ciclos de luz oscuridad de 12:12 h, aireación continua y en una intensidad luminosa de 149.5 μmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y pH 7.7 a 8.

Además, se trabajó con el dinoflagelado *Alexandrium margalefii* (AMCQ-1) de Bahía Concepción, B.C.S (2000) de la Colección de Dinoflagelados Marinos (CODIMAR) (Morquecho y Reyes-Salinas, 2022). Se cultivó en el medio GSe de Blackburn *et al.* (2001) modificado. Se mantuvo el cultivo a una temperatura de 22 ± 1 °C, con un ciclo de luz oscuridad de 12:12 h y una salinidad de 30 UPS. Se escalaron hasta matraces de 2 L y se cosecharon en la fase exponencial tardía, 3 semanas (1 × 10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup>).

Las células en los cultivos de ambas cepas se sedimentaron a 4 °C por 24 h y se eliminó el sobrenadante. Se centrifugaron (357 × g, 10 min, 4 °C) para retirar el sobrenadante restante. El pellet obtenido de cada cepa se liofilizó (Labconco FreeZone 18 L) y conservó en seco hasta su uso.

### 6.1.2 Macroalgas

La macroalga *Sargassum horridum* se recolectó en playa El Sausozo, Baja California Sur, México (24.312060, -110.640309) y las macroalgas *Ulva lactuca* y *Spyridia sp.* en la playa del Malecón de La Paz, Baja California Sur, México (24.168383, -110.310654) en septiembre de 2023. Las muestras se tomaron del sustrato rocoso en la zona intermareal mediante snorkel, posteriormente, fueron limpiadas con agua corriente para eliminar epifitos, detritos y material incrustado. Las algas limpias se colocaron en una bolsa de plástico. Las macroalgas se identificaron con ayuda de la Dra. Karla León Cisneros de la Universidad Autónoma de Baja California Sur. Las muestras se liofilizaron (Labconco FreeZone 18 L) y almacenaron hasta su uso.

## 6.2 Extracción de compuestos bioactivos para evaluación neuroprotectora

### 6.2.1 Extracción con cloroformo:metanol (CFMO:MeOH)

Se realizó una extracción utilizando una mezcla de cloroformo:metanol (CFMO:MeOH, Honeywell Riedel-de Haen GmbH, Seelze, Germany) en una relación 2:1. Para ello, se colocaron 50 mg de biomasa liofilizada de microalga y 500 mg de biomasa liofilizada macroalgas, colocándolas en tubos de vidrio con tapón de rosca protegidos de la luz. A cada uno se les añadió 15 mL de la mezcla de solventes. Las muestras se agitaron durante 10 s en un mezclador vórtex (Scientific Industries/Vortex) para homogenizar el contenido liofilizado con la mezcla de solventes. Para acceder al contenido intracelular, las muestras de microalgas se sonicaron (VWR, modelo 97043-964) por 15 min en baño de hielo con una amplitud de 10%, mientras que las de macroalgas se sometieron a disrupción celular con un agitador magnético durante 1 h. La solución resultante se filtró y la fase orgánica recolectada se evaporó a temperatura ambiente. Los extractos concentrados se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) para obtener una solución stock con una concentración de 100 mg mL<sup>-1</sup>. Los extractos obtenidos con CFMO:MeOH se identificaron con la letra "F" a lo largo del documento (Tabla 1).

### 6.2.2 Extracción con diclorometano:metanol (DCMO:MeOH)

Se realizó una extracción utilizando una mezcla de diclorometano:metanol (DCMO:MeOH, VWR-BDH Chemicals, Rosny-sous-Bois, France) en una proporción 1:1, aplicada exclusivamente a las muestras de macroalgas. Se pesaron 500 mg de biomasa liofilizada en tubos de vidrio con tapón de rosca y protegidos de la luz. A cada tubo se añadieron 15 mL de la mezcla de solventes. Las muestras se agitaron en un mezclador vórtex durante 10 s para homogenizar el contenido liofilizado con la mezcla de solventes y, posteriormente, se sometieron a disrupción celular con un agitador magnético durante 1 h para acceder al contenido intracelular. La solución resultante se filtró y la fase orgánica recolectada se evaporó a temperatura ambiente. Los extractos concentrados se disolvieron en DMSO para obtener una solución stock con una concentración de 100 mg mL<sup>-1</sup>. Los extractos obtenidos con DCMO:MeOH se identificaron con la letra “D” a lo largo del documento (Tabla 1).

### 6.2.3 Extracción acetona

Se llevó a cabo una extracción con acetona grado de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Honeywell Riedel-de Haën, Seelze, Alemania) de acuerdo con la metodología descrita en Arredondo-Vega y Voltolina (2017), con el objetivo de extraer los pigmentos fotosintéticos.

Se colocaron para las microalgas 100 mg y para las macroalgas 1 g de biomasa liofilizada en tubos de vidrio con tapón de rosca y protegidos de la luz, y se les agregó 6 y 15 mL de acetona, respectivamente. Posteriormente se agitaron en un mezclador vortex (Scientific Industries/Vortex) durante 10 s. Las microalgas se sonicaron (VWR, modelo 97043-964) por tres ciclos consecutivos durante 15 min en baño de hielo con una amplitud de 10%, y se reposaron a 4 °C; para permitir la extracción total de los pigmentos.

En el caso de las macroalgas se agitaron en un vortex con perlas de vidrio de diferentes tamaños para provocar la lisis celular en baño de hielo por 5 ciclos de 10 s. A las 24 h se repitió el proceso de agitar y sonicar, según correspondía. Posteriormente, los tubos con las muestras se

centrifugaron a  $2200 \times g$ , por 10 min, a  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ , y el sobrenadante se colocó en un tubo de vidrio protegido por la luz.

A la pastilla celular se le volvió a agregar acetona, repitiéndose los pasos anteriores hasta lograr la extracción total de pigmentos. La solución resultante se filtró y la fase orgánica correspondiente se evaporó a presión reducida en un rotavapor (Laborota 4000-efficient), a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Los extractos concentrados se disolvieron en DMSO para obtener una solución stock con una concentración de  $100 \text{ mg mL}^{-1}$ . Los extractos obtenidos con acetona se identificaron con la letra "A" a lo largo del documento (Tabla 1).

### **6.3 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos de algas marinas**

#### **6.3.1 Actividad eliminadora de radicales 2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)**

El método de eliminación de radicales libres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) se realizó según Brand-Williams *et al.* (1995) adaptado a microescala con ligeras modificaciones por Pinteus *et al.* (2017). Este ensayo mide la capacidad antioxidante de los compuestos para neutralizar los radicales libres presentes en una solución de DPPH, cuya reducción se manifiesta como una disminución en la absorbancia a  $517 \text{ nm}$ , directamente relacionada con la actividad antioxidante (Gulcin y Alwasel, 2023).

El radical DPPH se disolvió en etanol absoluto ( $0.1 \text{ mM}$ ). En una placa de 96 pozos se colocaron  $2 \text{ } \mu\text{L}$  de extracto ( $20 \text{ mg mL}^{-1}$ ) y se añadieron  $198 \text{ } \mu\text{L}$  de la solución de DPPH en cada pozo (concentración final por pozo de  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Como control, se utilizó una mezcla de  $2 \text{ } \mu\text{L}$  de DMSO con  $198 \text{ } \mu\text{L}$  de la solución de DPPH. Para eliminar el efecto de la coloración de los extractos en las lecturas, se incluyó un duplicado de blancos por tratamiento, consistente en  $2 \text{ } \mu\text{L}$  del extracto ( $20 \text{ mg mL}^{-1}$ ) con  $198 \text{ } \mu\text{L}$  de etanol absoluto.

Tabla 1. Abreviatura de especies y extractos.

Microalgas y macroalgas			
Especie	Solvente de extracción	Abreviatura	
Microalgas	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	CFMO:MeOH	TF
		Acetona	TA
	<i>Chlorella capsulata</i>	CFMO:MeOH	NF
		Acetona	NA
	<i>Rhodorus marinus</i>	CFMO:MeOH	MF
		Acetona	MA
	<i>Porphyridium cruentum</i>	CFMO:MeOH	CF
		Acetona	CA
	<i>Isochrysis galbana</i>	CFMO:MeOH	GF
		Acetona	GA
	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	CFMO:MeOH	KF
		Acetona	KA
	<i>Alexandrium margalefii</i>	CFMO:MeOH	LF
		Acetona	LA
Macroalgas	<i>Ulva lactuca</i>	CFMO:MeOH	UF
		DCMO:MeOH	UD
		Acetona	UA
	<i>Sargassum horridum</i>	CFMO:MeOH	HF
		DCMO:MeOH	HD
		Acetona	HA
	<i>Spyridia sp</i>	CFMO:MeOH	SF
		DCMO:MeOH	SD
		Acetona	SA

CFMO:MeOH: cloroformo:metanol (F), DCMO:MeOH: diclorometano:metanol (D), acetona (A).

Tras la adición de la solución de DPPH en los pozos, las placas se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min. La absorbancia se midió a 517 nm utilizando un lector de microplacas multimodo (Synergy H1 BioTek® Instruments) y se compararon los valores contra el control. El ensayo se realizó como tres experimentos independientes durante tres días distintos, y por triplicado en la placa. Las soluciones se prepararon frescas diariamente.

Para el análisis, se calculó la diferencia entre la absorbancia de los tratamientos y la lectura promedio de sus respectivos blancos, y los resultados se expresaron como porcentaje del control, donde el control representa el 100%.

### **6.3.2 Actividad eliminadora de radicales del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )**

La actividad eliminadora del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) se evaluó siguiendo la metodología basada en el uso del sistema PMS-NADH-NBT que está compuesto por metosulfato de N-metilfenazina (PMS), cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT) y nicotinamida-adenina-dinucleótido (NADH) de Nishikimi *et al.* (1972), con modificaciones. Este método se basa en la generación de radicales superóxido mediante la oxidación de NADH en el sistema PMS-NADH, que son detectadas por la reducción del NBT. La disminución de la absorbancia a 560 nm refleja el consumo de  $O_2^{\cdot-}$  en la mezcla de reacción, lo que se interpreta como la actividad antioxidante de los compuestos evaluados.

En una placa de 96 pocillos, se añadieron 2.5  $\mu$ L de extracto ( $20 \text{ mg mL}^{-1}$ ), seguidos de 82.5  $\mu$ L de NBT (0.108 mM), 82.5  $\mu$ L de NADH (0.557 mM) y, por último, 82.5  $\mu$ L de PMS (0.450 mM en buffer Tris-HCl 16 mM, pH 8) para iniciar la reacción. Como control, se utilizó la solución compuesta por NBT, NADH y PMS sin extracto. Para corregir el efecto de la coloración de los extractos en la absorbancia, se incluyó un duplicado de blancos por tratamiento, compuesto por 2.5  $\mu$ L de extracto ( $20 \text{ mg mL}^{-1}$ ), 82.5  $\mu$ L de NBT (0.108 mM), 82.5  $\mu$ L de NADH (0.557 mM) y 82.5  $\mu$ L de buffer Tris-HCl (16 mM, pH 8).

La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 5 min y la absorbancia se midió a 560 nm utilizando un lector de microplacas multimodo (Synergy H1, BioTek® Instruments). Una disminución de la absorbancia de la mezcla de reacción en comparación con el control indica una mayor actividad eliminadora del anión superóxido. El ensayo se realizó en tres experimentos independientes durante tres días distintos, y por triplicado en la placa. Las soluciones se prepararon frescas diariamente.

Se calculó la diferencia entre las absorbancias de los tratamientos y sus respectivos blancos, expresando los resultados como porcentaje en relación con el control, donde el control representa el 100%. Para los extractos que mostraron una actividad antioxidante superior al 50%, el ensayo se repitió con concentraciones adicionales a 100, 30, 10 y 3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para determinar la concentración efectiva media ( $\text{EC}_{50}$ ).

### **6.3.3 Poder antioxidante reductor férrico (FRAP)**

La capacidad antioxidante de los extractos obtenidos se evaluó siguiendo la metodología de Benzie y Strain (1996) con ligeras modificaciones (Silva *et al.* 2019). Este método se basa en la capacidad de los antioxidantes para reducir el ion férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) al estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) mediante la donación de electrones, generando un complejo coloreado con el compuesto 2,4,6-tri(2-piridil)-s triazina (TPTZ).

El reactivo FRAP se preparó mezclando tampón acetato (ácido acético) 300 mM (pH 3.6), TPTZ en HCl 10 mM, y cloruro de hierro (III) ( $\text{FeCl}_3$ ) 20 mM, en una relación 10:1:1 y se incubó a 37 °C hasta su uso. En una placa de 96 pocillos, se añadieron 2  $\mu\text{L}$  de extracto (20  $\text{mg mL}^{-1}$ ) y 198  $\mu\text{L}$  de la solución de FRAP, por pozo. Como control, se utilizó una mezcla de 2  $\mu\text{L}$  de DMSO con 198  $\mu\text{L}$  de la solución de FRAP. Para corregir la interferencia de la coloración de los extractos, se incluyó un duplicado de blancos por tratamiento, consistente en 2  $\mu\text{L}$  del extracto (20  $\text{mg mL}^{-1}$ ) con 198  $\mu\text{L}$  de tampón acetato.

Tras la adición de la solución de FRAP, las placas se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min. Posteriormente, se midió la absorbancia a 593 nm utilizando un lector de microplacas multimodo (Synergy H1, BioTek® Instruments). El ensayo se realizó en tres experimentos independientes durante tres días distintos, y por triplicado en la placa. Las soluciones se prepararon frescas diariamente.

Para el análisis, los resultados se obtuvieron calculando la diferencia entre las absorbancias de los tratamientos y sus respectivos blancos, expresándose como micromoles de FeSO<sub>4</sub> por g de extracto ( $\mu\text{M FeSO}_4 \text{ g de extracto}^{-1}$ ). Para estos cálculos, se realizó una curva estándar con diluciones conocidas (0, 0.4, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 mM FeSO<sub>4</sub>) en cada ensayo.

## **6.4 Análisis *in vitro* en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y**

### **6.4.1 Condiciones de cultivo y mantenimiento de células SH-SY5Y**

Las actividades biológicas de los extractos se evaluaron utilizando un modelo celular *in vitro* de neuroblastoma humano (línea celular SH-SY5Y, número de cepa ACC 209) adquirido previamente del biobanco DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). Las células se cultivaron de acuerdo con las instrucciones del proveedor, en el medio DMEM:F12 (Biowest, Riverside, MO, EE. UU.) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% (v/v) (Biowest, Riverside, MO, EE. UU.) y 1% de antibiótico (1% penicilina/estreptomicina/antimicótico, Sigma, Rehovot, Israel). Las células SH-SY5Y se mantuvieron en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Para el subcultivo, las células se disociaron con tripsina-EDTA (Biowest, Riverside, MO, EE. UU.), se redistribuyeron en una proporción de 1:3 y se cultivaron nuevamente en placas de Petri con un área de crecimiento de 25 cm<sup>2</sup>. El medio de cultivo se reemplazó cada 4 días hasta que las células alcanzaron la confluencia 6 o 7 días después de la siembra inicial.

### **6.4.2 Viabilidad celular de las células SH-SY5Y con los extractos algales**

La viabilidad celular refleja la capacidad de las células para mantener su integridad y

funcionalidad, siendo clave en estudios *in vitro* para evaluar el impacto de diversas sustancias (Aslantürk, 2018). En este estudio, se evaluó la viabilidad de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y al 75 – 85% de la confluencia total en placas de 96 pocillos (la confluencia celular es el porcentaje del área de cultivo cubierta por una capa de células adherentes en crecimiento). Las células fueron tratadas durante 24 h con los extractos obtenidos de las microalgas y macroalgas en concentraciones de 200, 100, 30, 10 y 3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 37 °C. Estas pruebas permitieron determinar y seleccionar las muestras y concentraciones no tóxicas para ensayos posteriores. Las diluciones se prepararon a partir de la solución stock en medio de cultivo sin FBS.

En cada placa se utilizaron células con DMSO en medio de cultivo sin FBS (vehículo) y un control de daño para validar los resultados (muerte celular; mezcla de saponina a 40  $\text{mg mL}^{-1}$ ) en medio de cultivo sin FBS). Tanto las muestras como los controles se colocaron por triplicado en la placa, con un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  por pozo. Este ensayo se realizó en tres experimentos independientes con pasajes celulares distintos, durante tres días distintos. Las soluciones se prepararon frescas diariamente, la concentración final de DMSO por pozo fue de 0.4%.

Los efectos de la exposición a los extractos de microalgas y macroalgas sobre la viabilidad celular de las células SH-SY5Y se evaluaron mediante el ensayo MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro) según Amould *et al.*, 1990, con modificaciones (Silva *et al.*, 2019). Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul/morado (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Transcurridas las 24 h de la incubación con los extractos, las placas se examinaron bajo al microscopio para observar signos de muerte celular en las células y controles.

Posteriormente, las placas se colocaron en hielo para disminuir el metabolismo celular, y con un extractor se retiró cuidadosamente el contenido de los pozos sin desprender las células. Se realizó un lavado con buffer de fosfato salino (PBS, pH 7.4) para limpiar a las células de cualquier

remanente de extractos o medio de cultivo. A continuación, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de una solución de MTT ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) preparada en medio de cultivo sin FBS, se protegieron de la luz con papel aluminio y se incubaron durante 1:30 h a 37 °C. Finalizado el tiempo de incubación, se retiró el MTT de las placas y se realizó un segundo lavado con PBS. Finalmente, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de DMSO puro a cada pozo para disolver las membranas y los cristales de formazán, y la absorbancia se leyó a 570 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje del vehículo.

### **6.4.3 Evaluación del potencial neuroprotector de los extractos algales en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y**

#### **6.4.3.1 Viabilidad celular de las células SH-SY5Y con exposición a la 6-hidroxidopamina y a los extractos algales**

La actividad neuroprotectora de los extractos algales se evaluó en placas de 96 pocillos, analizando su efecto sobre la viabilidad de las células SH-SY5Y en presencia de 6-hidroxidopamina (6-OHDA). El ensayo se realizó cuando las células alcanzaron una confluencia cercana al 100%.

Las células se incubaron con las dos concentraciones máximas previamente determinadas como no tóxicas en ensayos preliminares de viabilidad celular (inciso 6.4.2), en presencia de 6-OHDA ( $100 \mu\text{M}$ ), disuelta en medio de cultivo sin FBS durante 24 h. Por cada tratamiento, se prepararon dos pozos: en uno, las células SH-SY5Y fueron tratadas con el extracto a la concentración correspondiente preparada en medio de cultivo sin FBS (control de cada tratamiento). En el otro, las células se expusieron al extracto con la misma concentración en presencia de 6-OHDA (tratamiento). Adicionalmente, en cada placa se incluyeron: células expuestas únicamente con medio de cultivo de cultivo sin FBS (vehículo), y células tratadas únicamente con 6-OHDA ( $100 \mu\text{M}$ ) (control de daño). Cada control y tratamiento se colocaron por triplicado en cada placa.

El volumen final por pozo fue de 200  $\mu\text{L}$ , con una concentración final de DMSO de 0.4%. Este ensayo se realizó en tres experimentos independientes con pasajes celulares distintos, durante tres días distintos. Debido a la sensibilidad a la luz de la 6-OHDA, todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones de oscuridad, protegiendo las placas con papel aluminio durante la incubación.

Transcurridas las 24 h de incubación de los extractos en presencia/ausencia de la 6-OHDA, se colocaron las placas en el microscopio para observar posibles eventos de muerte celular en las células tratadas y en los controles. La actividad neuroprotectora se determinó mediante un ensayo de viabilidad celular utilizando la metodología de MTT Amould *et al.* (1990), modificado por Silva *et al.* (2019). Para ello, las placas se colocaron en hielo para reducir el metabolismo celular, y el contenido de los pozos fue cuidadosamente retirado con un extractor para evitar el desprendimiento de las células. Posteriormente, se realizó un lavado con PBS (pH 7.4) para eliminar residuos. A continuación, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de una solución de MTT ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) preparada en medio de cultivo sin FBS y las placas fueron nuevamente protegidas de la luz con papel aluminio e incubadas durante 1:30 h a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Finalizada la incubación con MTT, se retiró la solución de los pozos y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de DMSO puro para solubilizar los cristales formados. La absorbancia se leyó a 570 nm en un lector multiplaca multimodo (Synergy H1, BioTek® Instruments), y los resultados se expresaron como porcentaje del control de cada tratamiento (1) y se compararon con el vehículo (100% de viabilidad).

$$Viabilidad_{(\% \text{ del control})} = \frac{Absorbancia \text{ tratamiento}}{Absorbancia \text{ control de cada tratamiento}} \times 100 \quad (1)$$

#### 6.4.4 Mecanismos de neuroprotección

##### 6.4.4.1 Estrés oxidativo

###### 6.4.4.1.1 Determinación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO)

Los niveles de ERO se determinaron utilizando la fluorosonda sensible a la oxidación diacetato de 5(6)-carboxi-20,70-diclorofluoresceína (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) según Ouazia *et al.* (2014) con modificaciones. La CM-H<sub>2</sub>DCFDA es una molécula no fluorescente que gracias a su estructura hidrofóbica puede atravesar la membrana celular. Una vez dentro de la célula, las esterasas intracelulares eliminan los grupos diacetato, lo que convierte la molécula en carboxi-H<sub>2</sub>DCF, que

es una forma ligeramente hidrofílica, pero aún no fluorescente. Esta nueva molécula se oxida en presencia de ERO, convirtiéndose en carboxi-diclorofluoresceína (DCF), una molécula altamente fluorescente. La fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de ERO presentes en la célula, lo que permite cuantificar los niveles de estrés oxidativo.

Para el experimento, las células SH-SY5Y fueron sembradas en placas blancas de 96 pozos y expuestas a 6-OHDA (100  $\mu\text{M}$ ) en presencia/ausencia de los extractos con actividad neuroprotectora durante 6 h (tratamientos). Además, las células se incubaron solo con medio de cultivo sin FBS (vehículo); células con los extractos sin 6-OHDA (control de cada tratamiento); células solamente expuestas a 6-OHDA (control de daño); células expuestas a Vitamina E (25  $\mu\text{M}$ , control positivo); y células expuestas a peróxido de hidrógeno  $\text{H}_2\text{O}_2$  (150  $\mu\text{M}$ , control de estrés oxidativo). Transcurrido el tiempo de incubación, las células se lavaron dos veces con medio de cultivo sin FBS y se incubaron durante 1 h a 37 °C con 100  $\mu\text{L}$  de la sonda CM- $\text{H}_2\text{DCFDA}$  (20  $\mu\text{M}$ ) preparada con medio de cultivo sin FBS.

Concluido el tiempo de incubación, las células se lavaron con PBS y se incubaron nuevamente por 30 min con 100  $\mu\text{L}$  de PBS. El volumen final por pozo fue de 200  $\mu\text{L}$ , con una concentración final de DMSO por pozo de 0.4%. Este ensayo se realizó como tres experimentos independientes con pasajes celulares distintos, durante tres días distintos. Debido a la sensibilidad a la luz de la 6-OHDA, todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones de oscuridad, protegiendo las placas con papel aluminio durante la incubación.

Al finalizar el tiempo de incubación, se midió de la fluorescencia en un lector de multiplacas multimodo (Synergy H1, BioTek® Instruments) ( $\lambda$  excitación: 527 nm;  $\lambda$  emisión: 495 nm). Los resultados se expresaron como porcentaje del control de cada tratamiento (2) y se compararon con el vehículo.

$$\text{Producción de ERO}_{(\% \text{ del control})} = \frac{\text{Absorbancia tratamiento}}{\text{Absorbancia control de cada tratamiento}} \times 100 \quad (2)$$

#### 6.4.4.1.2 Cuantificación del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Se cuantificó el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) con el kit de “Amplex™ Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay”, siguiendo la metodología de Silva *et al.* (2018). El rojo Amplex (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina) es un fluoróforo caracterizado por una fluorescencia basal baja, que reacciona específicamente con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una proporción de 1:1. Esta reacción, catalizada por la peroxidasa de rábano picante (HRP), da lugar a reacciones sucesivas que conducen a la formación de un producto altamente fluorescente, denominado resofurina (Mohanty *et al.*, 1997).

La producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue evaluada en células SH-SY5Y tratadas en presencia/ausencia de los extractos con actividad neuroprotectora durante 1 h previa a la exposición a 6-OHDA (100 μM). Para el experimento, las células SH-SY5Y fueron sembradas en placas blancas de 96 pozos y expuestas a 6-OHDA (100 μM) en presencia/ausencia de los extractos con actividad neuroprotectora (tratamientos). Además, las células se incubaron solo con medio de cultivo sin FBS (vehículo); células con los extractos sin 6-OHDA (control de cada tratamiento); células solamente expuestas a 6-OHDA (control de daño); y células expuestas a Vitamina E (25 μM, control positivo).

La variación de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se monitoreó en tiempo real durante 30 min a temperatura ambiente. El volumen final por pozo fue de 200 μL, con una concentración final de DMSO por pozo de 0.4%. Este ensayo se realizó como tres experimentos independientes con pasajes celulares distintos, durante tres días distintos. Debido a la sensibilidad a la luz de la 6-OHDA, todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones de oscuridad, protegiendo las placas con papel aluminio durante la incubación. La intensidad de la fluorescencia se midió en un lector de multiplacas multimodo (Synergy H1, BioTek® Instruments) (λ excitación: 590 nm; λ emisión: 530 nm). Los resultados se expresaron como porcentaje del control de cada tratamiento (3) y se compararon con el vehículo.

$$\text{Producción de } H_2O_2(\% \text{ del control}) = \frac{\Delta \text{ Absorbancia tratamiento}}{\Delta \text{ Absorbancia control de cada tratamiento}} \times 100 \quad (3)$$

#### 6.4.4.2 Disfunción mitocondrial

##### 6.4.4.2.1 Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM)

El análisis del potencial de membrana mitocondrial (PMM) se realizó utilizando el tinte fluorescente JC-1 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) según Silva *et al.* (2018). El tinte JC-1 es un compuesto lipofílico que puede travesar fácilmente la membrana celular y entrar en las mitocondrias.

Cuando el PMM es alto ( $\Delta\Psi_m$  elevado), JC-1 se acumula dentro de las mitocondrias y forma agregados. Estos agregados emiten fluorescencia en el rango rojo (alrededor de 590 nm). Sin embargo, cuando el PMM disminuye ( $\Delta\Psi_m$  bajo), JC-1 no se acumula en forma de agregados, sino que permanece como monómeros dispersos en la matriz mitocondrial. Estos monómeros emiten fluorescencia en el rango verde (alrededor de 529 nm). La relación de la fluorescencia roja respecto a la fluorescencia verde se utiliza para medir el PMM, de esta forma, un ratio entre agregados/monómeros con  $\Delta\Psi_m$  alto indica una alta fluorescencia roja y una baja fluorescencia verde significando una hiperpolarización. Por el contrario, un  $\Delta\Psi_m$  bajo, indica una despolarización. En ambos casos corresponde a una disfunción mitocondrial que puede desencadenar a una muerte celular por apoptosis.

En este ensayo, las células SH-SY5Y fueron sembradas en placas blancas de 96 pozos y expuestas a 6-OHDA (100  $\mu\text{M}$ ) en presencia/ausencia de los extractos con actividad neuroprotectora durante 6 h (tratamientos). Además, las células se incubaron solo con medio de cultivo sin FBS (vehículo); células con los extractos sin 6-OHDA (control de cada tratamiento); células solamente expuestas a 6-OHDA (control de daño); células expuestas a Vitamina E (25  $\mu\text{M}$ , control positivo); y células expuestas a peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$  (150  $\mu\text{M}$ , control de estrés oxidativo).

Tras la incubación, las placas se colocaron en hielo para disminuir el metabolismo celular, se lavaron con PBS y se incubaron con solución JC-1 (3  $\mu$ M) durante 15 minutos, a 37 °C en la oscuridad. Posteriormente, el colorante JC-1 fue retirado y se añadieron 100  $\mu$ L PBS a cada pozo. El volumen final por pozo fue de 200  $\mu$ L, con una concentración final de DMSO por pozo de 0.4%. Este ensayo se realizó como tres experimentos independientes con pasajes celulares distintos, durante tres días distintos. Debido a la sensibilidad a la luz de la 6-OHDA, todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones de oscuridad, protegiendo las placas con papel aluminio durante la incubación.

La fluorescencia se midió utilizando un lector de multiplacas multimodo (Synergy H1, BioTek® Instruments), a longitudes de onda correspondientes de agregados ( $\lambda$  excitación: 490 nm;  $\lambda$  emisión: 590 nm) y monómeros ( $\lambda$  excitación: 590 nm;  $\lambda$  emisión: 530 nm) simultáneamente durante 30 min. Los resultados se calcularon como la relación entre monómeros y agregados de JC-1, y se expresan en porcentaje de control (4) y se compararon con el vehículo.

$$PMM_{(\% \text{ del control})} = \frac{\text{Radio}_{\frac{\text{monómeros}}{\text{agregados}}} \text{ de JC-1 (tratamiento)}}{\text{Radio}_{\frac{\text{monómeros}}{\text{agregados}}} \text{ de JC-1 (vehículo)}} \times 100 \quad (4)$$

### 6.4.4.3 Apoptosis

#### 6.4.4.3.1 Caspasa 3

La actividad de caspasa-3 se evaluó utilizando el “Caspase-3 Activity Fluorimetric kit” de Sigma, siguiendo la metodología de Silva *et al.* (2018). Este kit mide la actividad enzimática específica de la caspasa-3 mediante un sustrato peptídico específico conjugado a un grupo cromógeno o fluorescente. En presencia de caspasa-3 activa, el sustrato es escindido, liberando el grupo detectable cuya señal será cuantificada mediante espectrofotometría. La intensidad de la señal es directamente proporcional a la actividad de caspasa-3 en la muestra, lo que permite una medición precisa de esta enzima, que es un marcador clave en el proceso de apoptosis.

En este ensayo, la actividad de caspasa-3 se determinó midiendo la fluorescencia liberada por el fluoróforo rodamina 110. En su forma conjugada con aminoácidos, la rodamina 110 presenta fluorescencia basal, pero al ser liberada por acción de la caspasa-3, adquiere una formación altamente fluorescente. La caspasa-3 escinde específicamente el enlace entre la rodamina y los aminoácidos en el sustrato, generando como producto la forma fluorescente de rodamina 110.

Para este análisis, las células SH-SY5Y se cultivaron en placas de 6 pocillos y fueron expuestas a 6-OHDA (100  $\mu$ M) en presencia/ausencia de los extractos con actividad neuroprotectora durante 6 h (tratamientos). Además, las células se incubaron solo con medio de cultivo sin FBS (vehículo); células con los extractos sin 6-OHDA (control de cada tratamiento); células solamente expuestas a 6-OHDA (control de daño); y células expuestas a Vitamina E (25  $\mu$ M, control positivo). El volumen final por pozo fue de 1 mL, con una concentración final de DMSO por pozo de 0.4%.

Transcurrido el tiempo de incubación, el sobrenadante de cada pozo se recolectó en microtubos de 1.5 mL y se centrifugó a 200 x *g* durante 5 min a 4 °C, descartando el sobrenadante resultante para recuperar las células que estuvieran en suspensión. Mientras, las células que aún estaban adheridas a la placa se lavaron y se disgregaron mecánicamente con PBS, y se transfirieron a su respectivo microtubo. Finalmente separar a las células del PBS por centrifugación (200 x *g* 10 min, 4 °C).

Los sedimentos celulares se resuspendieron en 50  $\mu$ L de tampón de lisis 1x y se incubaron durante 20 min en hielo. Para separar el contenido de los organelos citoplasmáticos intracelulares y las membranas celulares, las muestras se centrifugaron a 22,500 x *g* durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante resultante de cada tratamiento se transfirió a microtubos nuevos y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Para la medición de la actividad enzimática, se colocaron 5  $\mu$ L del sobrenadante en una placa de 96 pocillos y se añadieron 100  $\mu$ L de una solución de sustrato que se preparó siguiendo las

instrucciones del fabricante. La fluorescencia de la rodamina 110 se midió en un lector de placas, registrando longitudes de onda ( $\lambda$  excitación: 496 nm;  $\lambda$  emisión: 520 nm) durante 60 min a temperatura ambiente. La actividad de caspasa-3 se calculó a partir de la pendiente de la fase lineal de la fluorescencia resultante de la acumulación de rodamina 110 y se expresó en unidades de fluorescencia arbitrarias por mg de proteína por minuto ( $\Delta$  fluorescencia (u.a.) mg de proteína<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>). Este ensayo se realizó en tres experimentos independientes con pasajes celulares distintos, durante tres días distintos. Debido a la sensibilidad a la luz de la 6-OHDA, todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones de oscuridad, protegiendo las placas con papel aluminio durante la incubación.

Para expresar los resultados por mg de proteínas, se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976) en el cual se cuantificó la cantidad de proteínas presentes en cada tratamiento a partir del sobrenadante obtenido previamente, mediante una curva estándar de la proteína gammaglobulina con diluciones conocidas (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg mL<sup>-1</sup>). En una placa de 96 pozos, se colocaron 10  $\mu$ L de cada dilución, así como de las muestras de cada tratamiento y control por triplicado. A continuación, se añadieron 290  $\mu$ L de reactivo de Bradford 1x a cada pozo y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 595 nm y se construyó la curva estándar, la cual permitió calcular la cantidad de proteína presente en cada tratamiento.

## **6.5 Caracterización química de los extractos neuroprotectores**

### **6.5.1 Detección química mediante Resonancia Magnética Nuclear de protón (<sup>1</sup>H RMN)**

La RMN de protones es una técnica analítica basada en la propiedad de resonancia magnética de los núcleos de hidrógeno (protones) cuando se encuentran en un campo magnético externo. Esta técnica explora la alineación de los protones de los núcleos de hidrógeno en dos estados de energía: uno paralelo y otro antiparalelo al campo magnético aplicado. Al aplicar una radiación electromagnética de frecuencia específica (resonancia), los protones absorben energía y cambian de estado. Posteriormente, al volver a su estado original, emiten señales de radiofrecuencia que

son detectadas y procesadas para obtener espectros de RMN (Tampieri *et al.*, 2021). Para analizar los espectros obtenidos, se consideran las regiones específicas de desplazamientos químicos característicos de distintos grupos funcionales, como protones aromáticos, alifáticos, oxigenados, y aquellos asociados a heteroátomos.

Para este ensayo, los extractos que presentaron actividad neuroprotectora se analizaron mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$  RMN) en un espectrómetro Bruker AMX400 (400.13 MHz). Para este análisis, aproximadamente 5 mg de cada muestra (a partir de los extractos concentrados obtenidos en el inciso 6.2.1 y 6.2.2, sin disolver en DMSO) se disolvieron en 0.5 mL de metanol deuterado (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y los espectros se adquirieron a 25 °C. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón (ppm) y se referenciaron en función de la señal residual del disolvente ( $\delta\text{H} = 4.89$ ).

### **6.5.2 Cuantificación de ácidos grasos por Cromatografía de Gases-Espectrofotometría de Masas (GC-MS).**

El perfil de ácidos grasos de las algas con actividad neuroprotectora se analizó mediante cromatografía de gases siguiendo las condiciones descritas por Neves *et al.* (2021). Los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) se obtuvieron mediante transmetilación directa de muestras liofilizadas como lo describen Fernández *et al.* (2015) con pocas modificaciones. En tubos de vidrio con tapa de rosca, las muestras liofilizadas (50 mg) se mezclaron con 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (2%, v/v) en metanol y se calentaron durante 2 h a 80 °C. Después de enfriar, se agregaron a cada tubo 1 mL de agua MilliQ y 2 mL de *n*-hexano. Luego, las muestras se agitaron con vórtex durante 1 min y se centrifugaron (Eppendorf, Centrifuge 5810 R) a 123 *g* durante 5 min. Los análisis se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases Finnigan Ultra Trace, equipado con una columna capilar Thermo Tr-FAME (60 m  $\times$  0.25 mm ID, espesor de película de 0.25  $\mu\text{m}$ ); un muestreador automático AS 3000 de Thermo Electron Corporation y un detector de ionización de llama (FID). Las temperaturas del detector y del inyector (splitless) fueron 280 °C y 250 °C, respectivamente. La temperatura del horno se fijó en 100 °C durante 1 min, seguido de un aumento de 10 °C  $\text{min}^{-1}$  hasta 150 °C (manteniéndose durante 1 min), un segundo aumento de 5 °C  $\text{min}^{-1}$  hasta 200 °C

(durante 9 min) y un tercer aumento de 2 °C min<sup>-1</sup> hasta 235 °C (durante 5 min). Se utilizó helio como gas portador a un flujo constante de 1.2 mL min<sup>-1</sup>. Se suministraron aire e hidrógeno al detector a caudales de 350 mL min<sup>-1</sup> y 35 mL min<sup>-1</sup>, respectivamente. Los ácidos grasos se identificaron comparando su tiempo de retención con los de las mezclas estándar Supelco 37. Los resultados se expresaron como porcentaje de ácidos grasos totales (% de AG totales).

## 6.6 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad v10.2.3 (Graphpad Software, Inc. La Jolla, CA, EE. UU.). Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con una prueba *a posteriori* de pareado de Tukey para encontrar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos. Se verificó la normalidad y la homocedasticidad de todos los datos con pruebas de Shapiro-Wilk para verificar la normalidad de los datos ( $p > 0.05$ ). Las comparaciones de variables que no cumplían los supuestos de varianza o distribución se llevaron a cabo con pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis. Cuando corresponde, los resultados se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas al nivel de 0.05 ( $p < 0.05$ ). Las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos se representan con letras. La determinación de EC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub> se calculó mediante el análisis de regresión no lineal utilizando el software GraphPad Prism con la Ecuación 6 (donde la X es la variable independiente (concentración del extrcato) y la Y es el porcentaje del efecto observado).

$$Y = 100 / (1 + 10 (X - \text{Log}EC_{50}/IC_{50})) \quad (6)$$

Para analizar el perfil de ácidos grasos las diferencias en las concentraciones de ácidos grasos entre las especies de algas que mostraron actividad neuroprotectora, se utilizó un modelo de regresión Gamma. La variable dependiente fue la concentración de ácidos grasos, una medida continua y positiva. Dado que la distribución Gamma es adecuada para datos estrictamente mayores que cero y sesgados hacia la izquierda, se seleccionó este modelo como el más

apropiado. Se filtraron los datos para excluir las observaciones con concentraciones iguales a cero, asegurando que el modelo se ajustara a las características de los datos.

El modelo se ajustó mediante regresión, utilizando la especie de alga como variable explicativa para evaluar su efecto sobre la concentración de cada grupo de ácidos grasos. Para cada grupo de ácidos grasos, se calcularon los coeficientes de regresión y los  $p$ -valores asociados, lo que permitió determinar si las diferencias entre las especies eran estadísticamente significativas. El nivel de significancia se interpretó utilizando la convención de  $p < 0.05$  para valores significativos, con el apoyo de símbolos gráficos (, \*, \*), según corresponda.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Actividad antioxidante de los extractos de algas

En las Fig. 7, 8 y 9, y Anexo C se muestra la actividad antioxidante de los extractos de microalgas y macroalgas evaluados mediante los ensayos DPPH,  $O_2^{\cdot -}$  y FRAP.

Los valores porcentuales más altos de las pruebas de DPPH y  $O_2^{\cdot -}$  reflejan una menor capacidad para neutralizar determinados radicales libres, en comparación con otros extractos. En el ensayo DPPH (Fig. 7, Anexo C), que evalúa la capacidad de los extractos para eliminar radicales libres, los extractos de *C. capsulata* (NA:  $71.48\% \pm 2.49$  y NF:  $89.98\% \pm 4.20$ ) presentaron los valores más bajos entre las microalgas, lo que indica una mayor capacidad para eliminar radicales DPPH y, por tanto, una mayor actividad antioxidante. En contraste, los extractos de *C. calcitrans* (KA:  $106.3\% \pm 0.92$ ) y *I. galbana* (GA:  $108.4\% \pm 0.73$ ) registraron los valores más altos (Fig. 7a).

En el caso de las macroalgas (Fig. 7b), los extractos probados mostraron valores similares, con el extracto con mayor actividad antioxidante el de *S. horridum* (HA:  $99.06\% \pm 1.74$ ), y que el menos activo correspondió a *U. lactuca* (UD:  $105.0\% \pm 0.94$ ).

En el ensayo de  $O_2^{\cdot -}$  (Fig. 8 y Anexo C) que evalúa la capacidad de eliminación de radicales superóxido, los extractos de microalgas con mayor actividad fueron de *P. cruentum* (CA:  $22.88\% \pm 1.81$  ( $EC_{50}$ : 41.26)) y *A. margalefii* (LA:  $40.82\% \pm 1.33$  ( $EC_{50}$ : 169.10)) presentando los valores de porcentaje más bajos, destacándose como los más efectivos en la eliminación de radicales superóxido, y una alta actividad antioxidante. En contraste, los extractos de *I. galbana* (GF:  $92.28\% \pm 0.49$ ) y *P. cruentum* (CF:  $91.07\% \pm 2.18$ ) mostraron una menor actividad antioxidante en comparación con otros extractos. En las macroalgas, los extractos más activos fueron *Spyridia sp* (SA) y *S. horridum* (HA), con valores de  $47.67\% \pm 0.50$  ( $EC_{50} > 200$ ) y  $59.05\% \pm 1.02$  ( $EC_{50} > 200$ ), respectivamente. Mientras que los menos activos fueron de *U. lactuca* (UD) y *S. horridum* (HD), con valores de  $98.10\% \pm 0.34$  y  $97.90\% \pm 0.41$ , respectivamente.

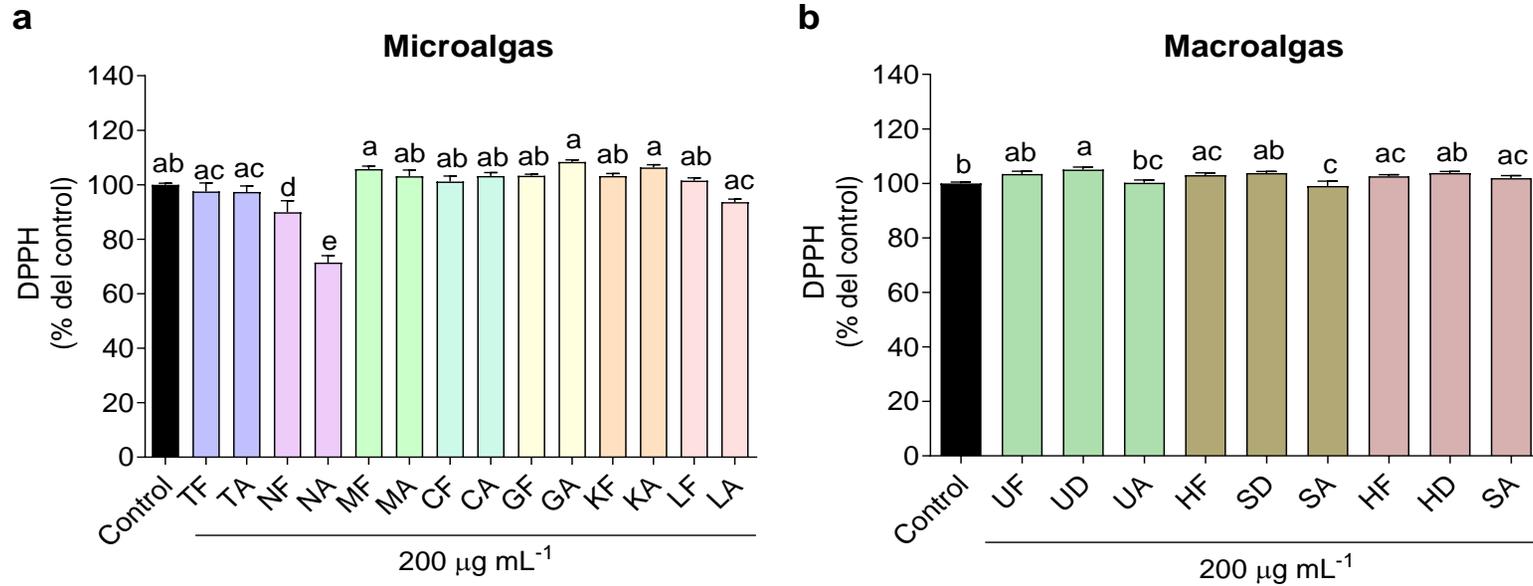
La prueba FRAP, que mide la capacidad antioxidante como micromoles de  $\text{FeSO}_4$  por gramo de extracto ( $\mu\text{M FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$ ), evalúa la eficiencia del extracto para reducir iones férricos ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a ferrosos ( $\text{Fe}^{2+}$ ). En el ensayo FRAP (Fig. 9, Anexo C), los extractos de microalgas con mayor actividad antioxidante fueron *P. cruentum* (CA:  $231.40 \pm 7.17 \mu\text{M FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$  de extracto) y *C. capsulata* (NF:  $199.50 \pm 23.35 \mu\text{M FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$  de extracto). En contraste, los extractos con menor actividad fueron *R. marinus* (MA:  $19.42 \pm 1.95 \mu\text{M FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$  de extracto) y *R. marinus* (MF:  $43.63 \pm 13.47 \mu\text{M FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$  de extracto) (Fig. 9a).

Para las macroalgas (Fig. 9b) los extractos más activos correspondieron a *U. lactuca* (UA:  $166.20 \pm 7.29 \mu\text{M FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$  de extracto) y *S. horridum* (HA:  $162.90 \pm 6.79 \mu\text{M FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$  de extracto), mientras que los menos activos fueron *Spyridia sp* (SD:  $10.10 \pm 2.84 \mu\text{M FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$  de extracto) y *S. horridum* (HD:  $12.69 \pm 2.68 \mu\text{M FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$  de extracto).

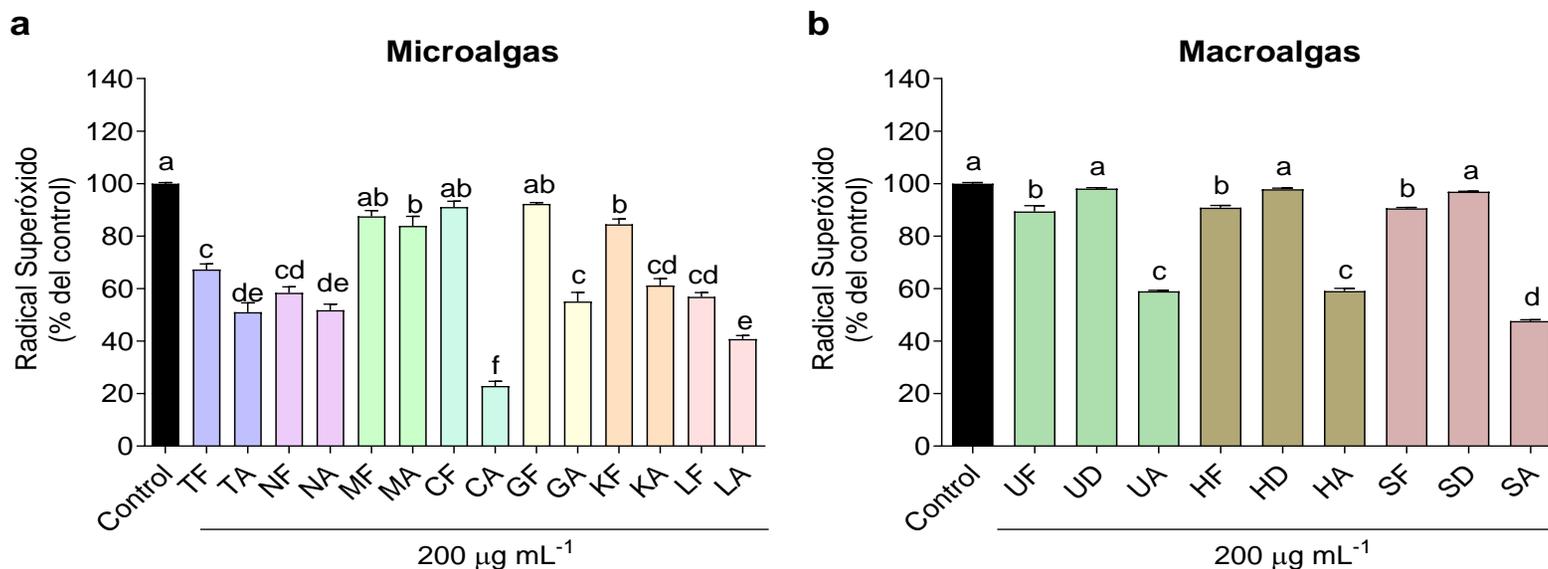
## 7.2 Viabilidad celular de las células SH-SY5Y expuestas a los extractos de algas

Se evaluó la viabilidad celular de las células SH-SY5Y con los extractos obtenidos de las algas mediante el método de MTT en células SH-SY5Y a distintas concentraciones (Fig. 10, Anexo D). A una concentración de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ , todos los extractos de las microalgas disminuyeron significativamente la viabilidad de las células SH-SY5Y cuando se compararon con el vehículo, a excepción de los extractos de *P. cruentum* (CF) y *C. calcitrans* (KF) ( $107.9 \pm 4.20$  y  $84.96 \pm 4.20\%$  de células viables, respectivamente), que no mostraron diferencias significativas con el vehículo, por lo tanto, ambos extractos fueron los únicos que no afectaron la viabilidad celular a  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 10a).

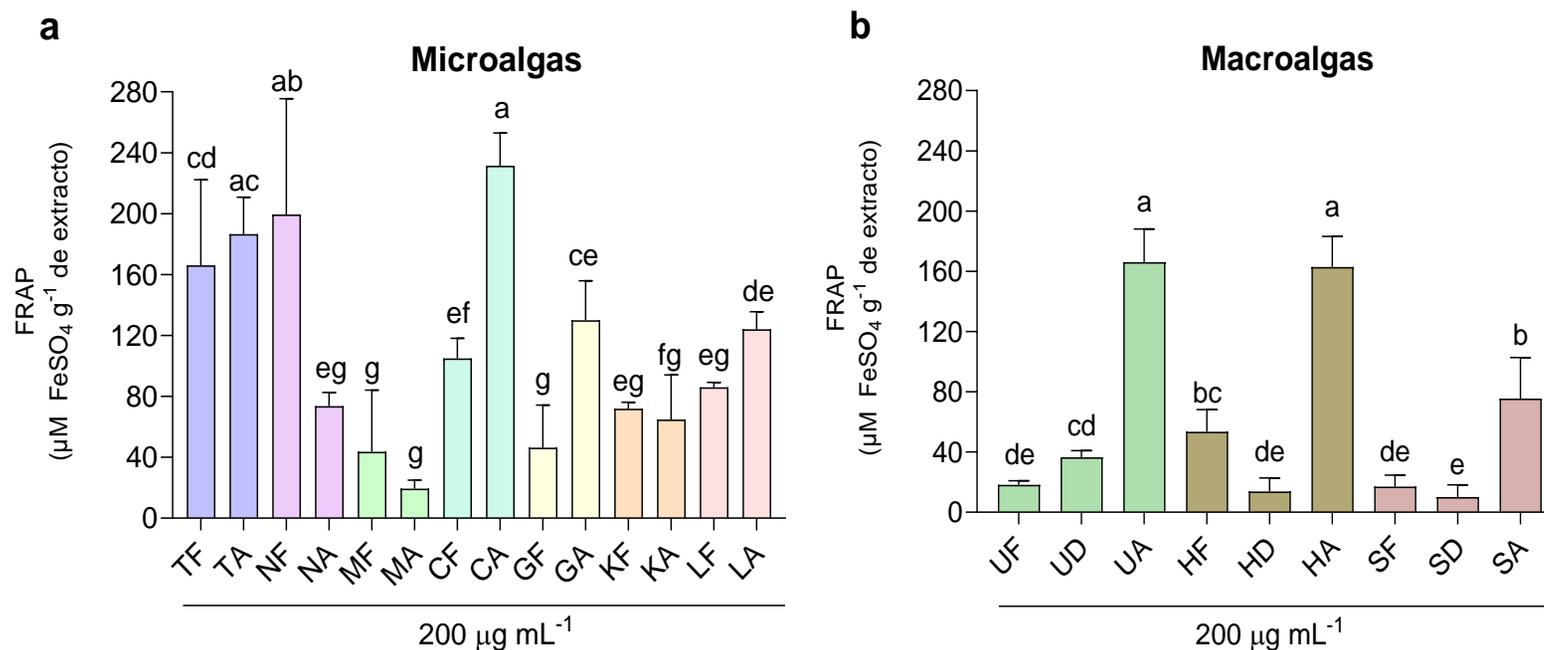
Con respecto a las macroalgas (Fig. 10b), los extractos UA ( $46.89 \pm 0.67\%$  de células viables), HF ( $70.27 \pm 5.54\%$  de células viables), HA ( $35.78 \pm 1.53\%$  de células viables) y SA ( $46.96 \pm 0.66\%$  de células viables) redujeron la viabilidad de las células SH-SY5Y significativamente cuando se compararon con el vehículo. Por el contrario, los extractos UF, UD, HD, SF y SD no presentaron diferencias estadísticas con el vehículo ( $101.7 \pm 5.81$ ;  $114.0 \pm 6.10$ ;  $86.63 \pm 4.27$ ;  $108.2 \pm 4.33$  y  $106.2 \pm 4.69\%$  de células viables, respectivamente).



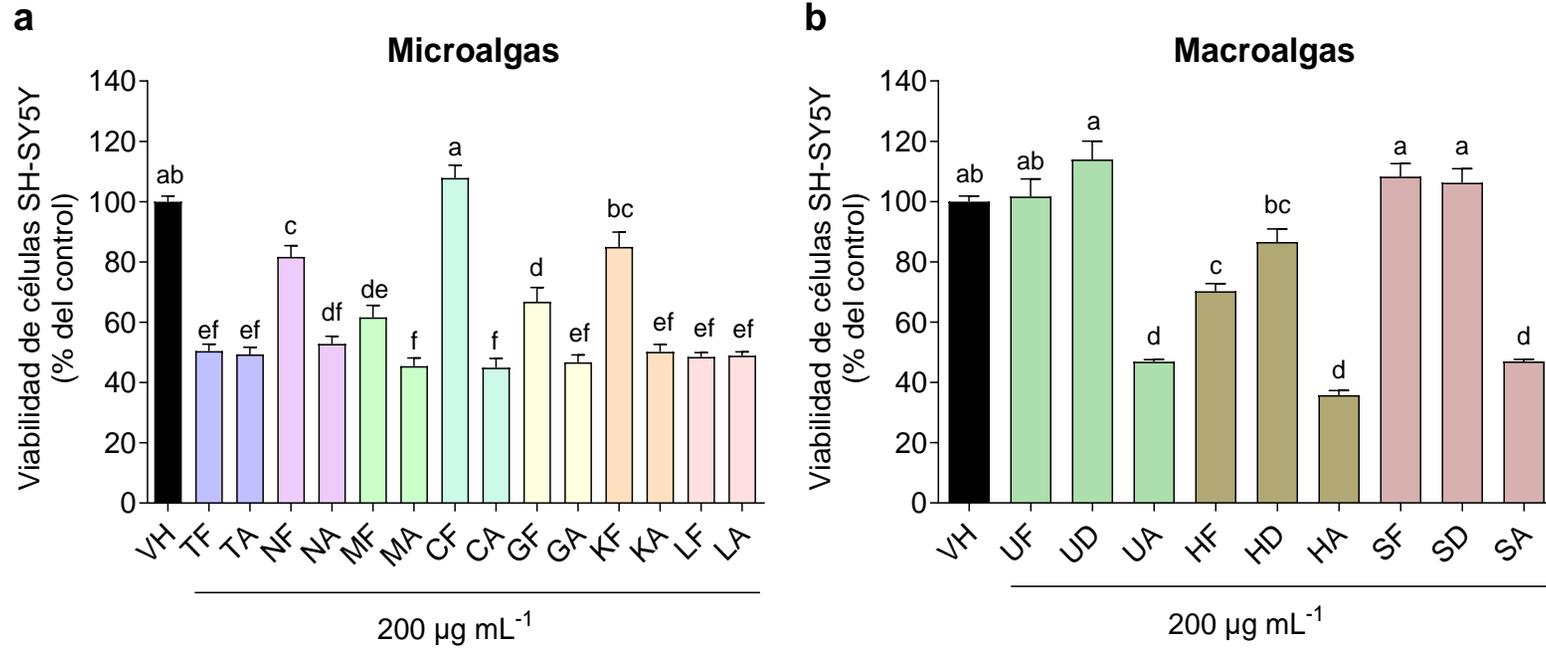
**Figura 7.** Actividad antioxidante por actividad eliminadora del radical DPPH de los extractos de **a)** microalgas y **b)** macroalgas, a una concentración de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ . *Dunaliella tertiolecta* (T), *Chlorella capsulata* (N), *Rhodorus marinus* (M), *Porphyridium cruentum* (C), *Isochrysis galbana* (G), *Chaetoceros calcitrans* (K), *Alexandrium margalefii* (L), *Ulva lactuca* (U), *Sargassum horridum* (H), *Spyridia sp.* (S). Los sufijos en las abreviaciones de los letreros en el eje x señalan el solvente orgánico utilizado para obtener el extracto: cloroformo:metanol (CFMO:MeOH, F), diclorometano:metanol (DCMO:MeOH, D) y acetona (A). Los resultados se expresan como % de reducción del DPPH en relación al control. Los valores en cada columna representan el promedio  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y el control (ANOVA,  $p < 0.05$ ).



**Figura 8.** Actividad antioxidante por actividad eliminadora del anión superóxido de los extractos de **a)** microalgas y **b)** macroalgas, a una concentración de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ . *Dunaliella tertiolecta* (T), *Chlorella capsulata* (N), *Rhodospirillum rubrum* (M), *Porphyridium cruentum* (C), *Isochrysis galbana* (G), *Chaetoceros calcitrans* (K), *Alexandrium margalefii* (L), *Ulva lactuca* (U), *Sargassum horridum* (H), *Spyridia sp.* (S). Los sufijos en las abreviaciones de los letreros en el eje x señalan el solvente orgánico utilizado para obtener el extracto: cloroformo:metanol (CFMO:MeOH, F), diclorometano:metanol (DCMO:MeOH, D) y acetona (A). Los resultados se expresan como % de reducción del NBT en relación al control. Los valores en cada columna representan el promedio  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y el control (ANOVA,  $p < 0.05$ ).



**Figura 9.** Actividad antioxidante por el método de FRAP de los extractos de **a)** microalgas y **b)** macroalgas, a una concentración de 200 µg mL<sup>-1</sup>. *Dunaliella tertiolecta* (T), *Chlorella capsulata* (N), *Rhodorus marinus* (M), *Porphyridium cruentum* (C), *Isochrysis galbana* (G), *Chaetoceros calcitrans* (K), *Alexandrium margalefii* (L), *Ulva lactuca* (U), *Sargassum horridum* (H), *Spyridia sp.* (S). Los sufijos en las abreviaciones de los letreros en el eje x señalan el solvente orgánico utilizado para obtener el extracto: cloroformo:metanol (CFMO:MeOH, F), diclorometano:metanol (DCMO:MeOH, D) y acetona (A). Los resultados se expresan como µM FeSO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> de extracto. Los valores en cada columna representan el promedio ± el error estándar de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y el control (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

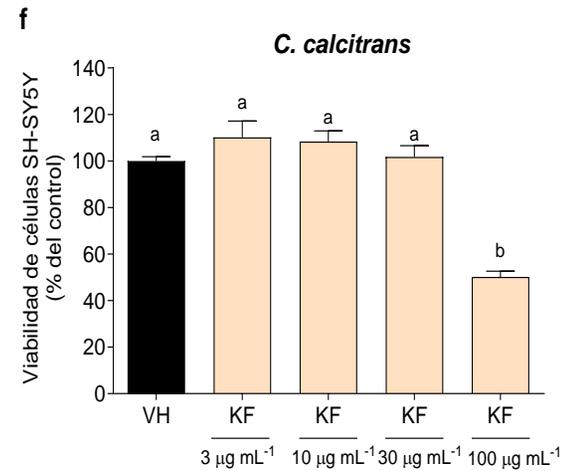
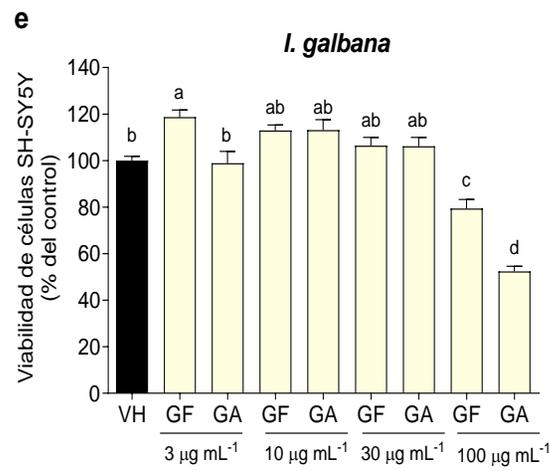
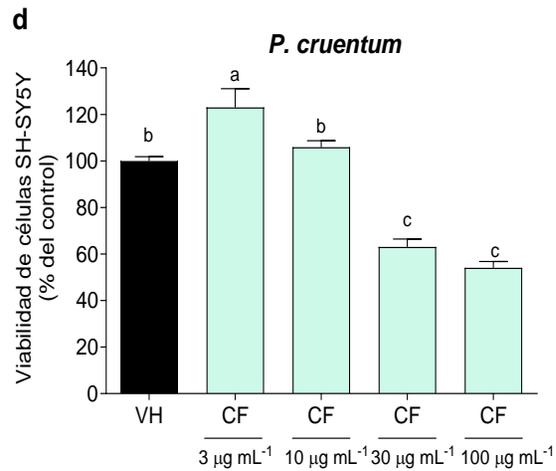
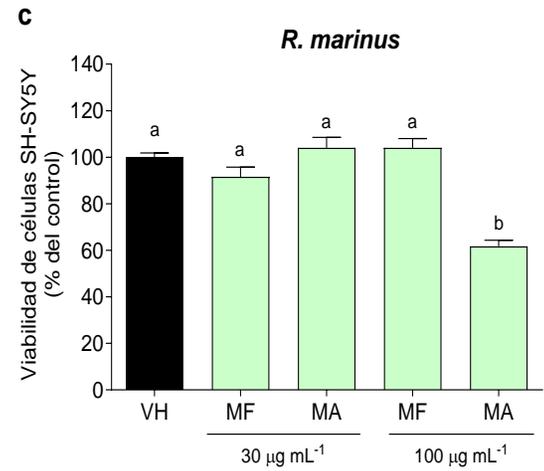
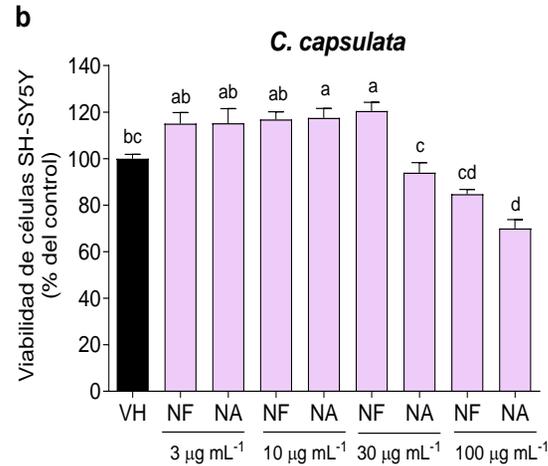
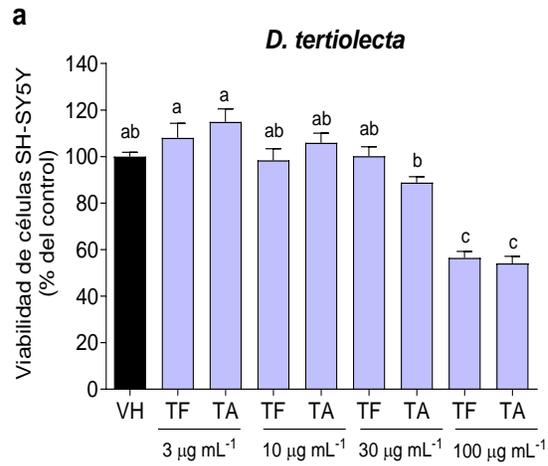


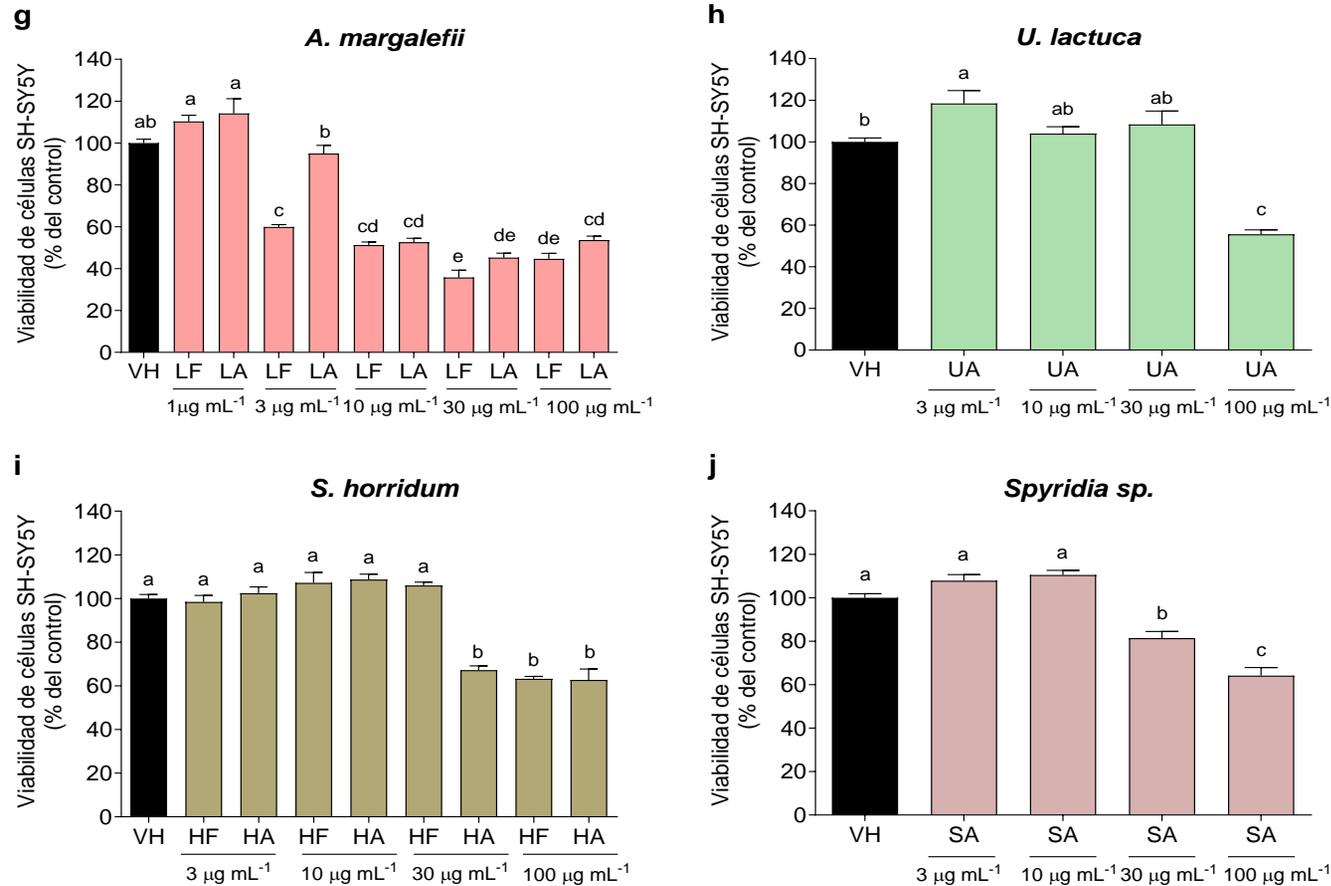
**Figura 10.** Viabilidad celular de las células SH-SY5Y expuestas a los extractos de **a)** microalgas y **b)** macroalgas, a una concentración de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Vehículo (VH), *Dunaliella tertiolecta* (T), *Chlorella capsulata* (N), *Rhodospirillum rubrum* (M), *Porphyridium cruentum* (C), *Isochrysis galbana* (G), *Chaetoceros calcitrans* (K), *Alexandrium margalefii* (L), *Ulva lactuca* (U), *Sargassum horridum* (H), *Spyridia sp.* (S). Los sufijos en las abreviaciones de los letreros en el eje x señalan el solvente orgánico utilizado para obtener el extracto: cloroformo:metanol (CFMO:MeOH, F), diclorometano:metanol (DCMO:MeOH, D) y acetona (A). Los valores en cada columna representan el promedio  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes por triplicado. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y el vehículo (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

Para los extractos de microalgas y macroalgas que disminuyeron la viabilidad de las células SH-SY5Y significativamente a  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ , se evaluó la viabilidad celular con las concentraciones 100, 30, 10 y  $3 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 11, Anexo D).

Las células SH-SY5Y mostraron una viabilidad celular igual a la del vehículo tras la exposición con el extracto MF a la concentración de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $104.0 \pm 3.97\%$  de células viables) (Fig. 11c), y lo mismo se muestra con los extractos a la concentración de  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  de *D. tertiolecta* (TF, Fig. 11a), *C. capsulata* (NF, Fig. 12b), *R. marinus* (MA, Fig. 11c), *P. cruentum* (CF, Fig. 11d), *I. galbana* (GF, Fig. 11e) y *C. calcitrans* (KF, Fig. 11f). Para los extractos de *D. tertiolecta* (TA, Fig. 11a), *C. capsulata* (NA, Fig. 11b), *P. cruentum* (CA, Fig. 11d), *I. galbana* (GA, Fig. 11e) y *C. calcitrans* (KA, Fig. 11f) el menor impacto sobre la viabilidad celular se alcanzó a la concentración de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Sin embargo, con los extractos de *A. margalefii* la viabilidad celular se vio comprometida hasta la concentración mínima analizada de  $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a la cual, el extracto LA no redujo la viabilidad celular. Para los extractos LF y LA, se analizó una concentración adicional de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a la cual ambos demostraron no ser citotóxicos para las células SH-SY5Y (LF  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $110.3 \pm 2.96\%$  de células viables y LA  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $114.1 \pm 7.02\%$  de células viables) (Fig. 11g).

En cuanto a la exposición con los extractos de macroalgas, las células SH-SY5Y mostraron una viabilidad celular como la del vehículo tras su exposición con los extractos de *U. lactuca* (UA, Fig. 11h) y *S. horridum* (HF, Fig. 11i) a la concentración de  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Así mismo, para los extractos de *S. horridum* (HA, Fig. 11i) y *Spyridia sp.* (SA, Fig. 11j) el mayor porcentaje de viabilidad celular se alcanzó a la concentración de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ .





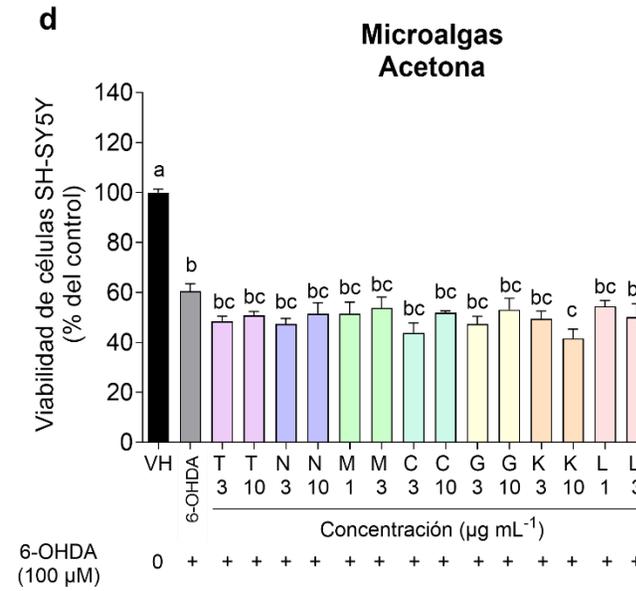
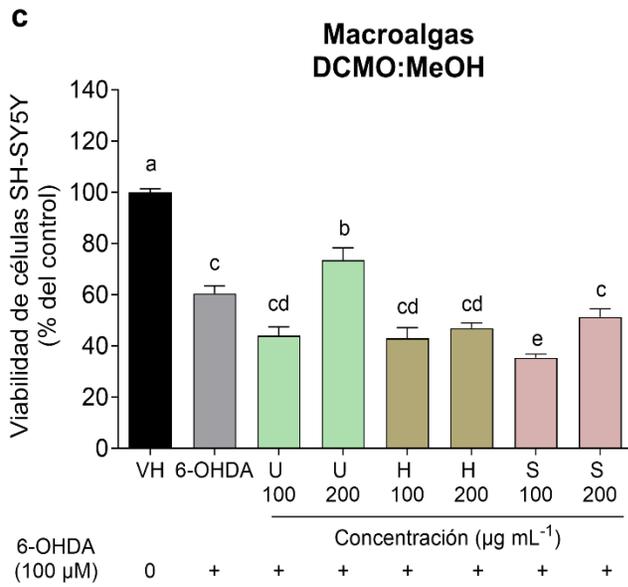
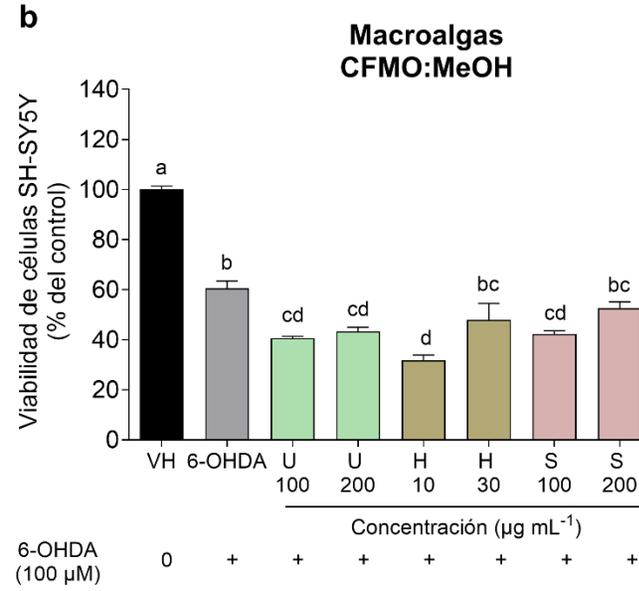
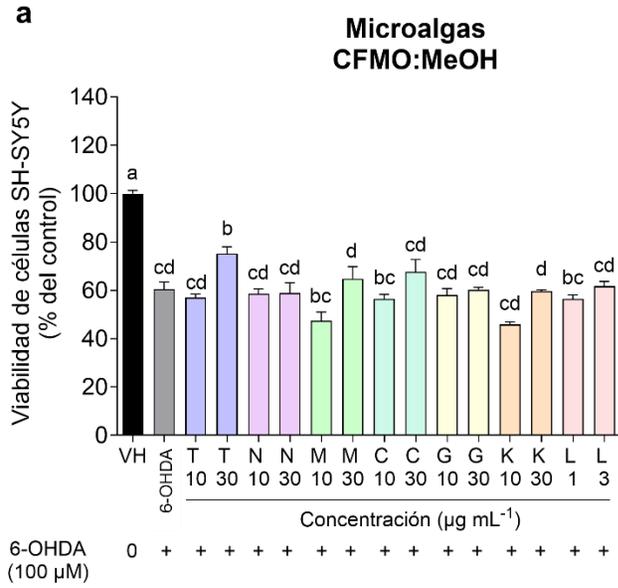
**Figura 11.** Viabilidad celular de células SH-SY5Y expuesta a distintas concentraciones de los extractos de las microalgas **a) *Dunaliella tertiolecta*** (T) **b) *Chlorella capsulata*** (N), **c) *Rhodospirillum rubrum*** (M), **d) *Porphyridium cruentum*** (C), **e) *Isochrysis galbana*** (G), **f) *Chaetoceros calcitrans*** (K), **g) *Alexandrium margalefii*** (L), y de las macroalgas **h) *Ulva lactuca*** (U), **i) *Sargassum horridum*** (H) y **j) *Spyridia sp.*** (S). Los sufijos en las abreviaciones de los letreros en el eje x señalan el solvente orgánico utilizado para obtener el extracto: cloroformo:metanol (CFMO:MeOH, F), diclorometano:metanol (DCMO:MeOH, D) y acetona (A). VH: vehículo. Los valores en cada columna representan el promedio  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y el vehículo (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

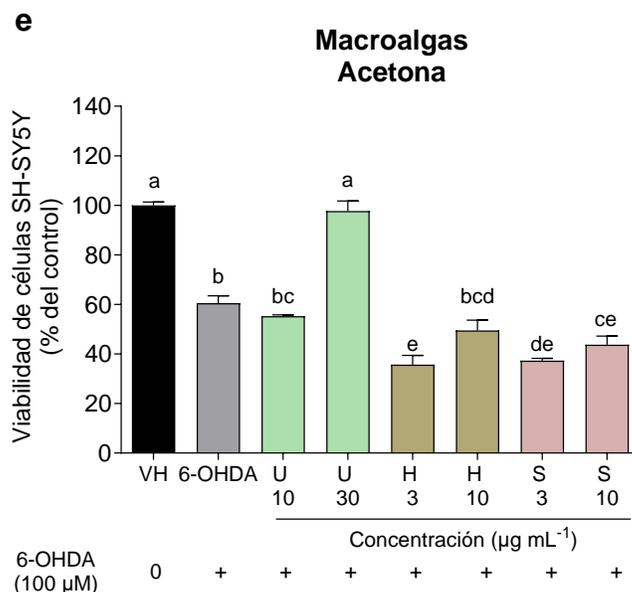
### 7.3 Actividad neuroprotectora en células SH-SY5Y

Se evaluó la actividad neuroprotectora de las concentraciones de los extractos más altas no tóxicas en la viabilidad celular de las células SH-SY5Y determinadas durante el experimento anterior (Fig. 10 y 11) contra el efecto de la 6-OHDA (100  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 12). En la Fig. 12, la primera barra corresponde al vehículo que representa el 100% de la viabilidad celular. En todos los gráficos de la Fig. 12 también se muestra la exposición a la 6-OHDA sobre las células SH-SY5Y y se observa como este compuesto reduce la viabilidad en un 40%.

En contraste, se observa el efecto del tratamiento con los extractos de CFMO:MeOH en las Fig. 12a y 12b (microalgas y macroalgas, respectivamente), donde únicamente el extracto de *D. tertiolecta* (TF, 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) redujo la neurotoxicidad inducida por el efecto de la 6-OHDA, aumentando la viabilidad de las células en un  $\sim 20\%$ . Por su parte, de los resultados obtenidos con el tratamiento de los extractos de DCMO:MeOH (Fig. 12c) se destaca la actividad del extracto de *U. lactuca* (UD, 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) al aumentar la viabilidad celular en un  $\sim 15\%$ .

Las Fig. 12d y 12e (microalgas y macroalgas, respectivamente) corresponden al tratamiento con los extractos de acetona, donde el extracto de *U. lactuca* (UA, 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) disminuyó la neurotoxicidad inducida, manteniendo la viabilidad celular en un 100%. El resto de extractos y concentraciones no mostraron actividad neuroprotectora.





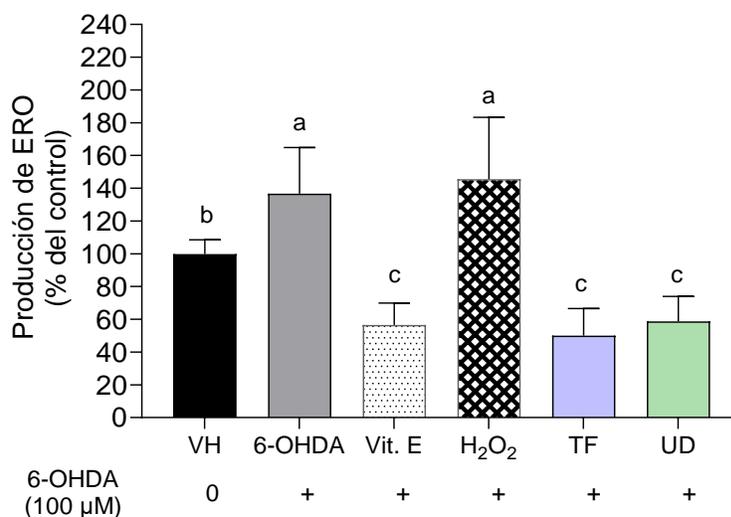
**Figura 12.** Actividad neuroprotectora de los extractos de **a)** microalgas en cloroformo:metanol (CFMO:MeOH), **b)** macroalgas en cloroformo:metanol (CFMO:MeOH), **c)** macroalgas en diclorometano:metanol (DCMO:MeOH), **d)** macroalgas en acetona (A) y **e)** macroalgas en acetona (A), en células SH-SY5Y incubadas con 6-OHDA (100 µM, 24 h). VH: vehículo, *Dunaliella tertiolecta* (T), *Chlorella capsulata* (N), *Rhodospirillum rubrum* (M), *Porphyridium cruentum* (C), *Isochrysis galbana* (G), *Chaetoceros calcitrans* (K), *Alexandrium margalefii* (L), *Ulva lactuca* (U), *Sargassum horridum* (H), *Spyridia* sp. (S). Los valores en cada columna representan el promedio  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y el vehículo (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

#### 7.4 Mecanismos de neuroprotección

Para determinar de qué manera los extractos de *D. tertiolecta* (TF, 30 µg mL<sup>-1</sup>) y *U. lactuca* (UD, 200 µg mL<sup>-1</sup>) estaban protegiendo a las células SH-SY5Y de la neurotoxicidad inducida por la 6-OHDA actuando sobre la viabilidad celular, se llevaron a cabo diferentes análisis *in vitro* para evaluar las vías relacionadas con los efectos de estrés oxidativo (producción de ERO (Fig. 13) y cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 14), disfunción mitocondrial (PMM) (Fig. 15), y apoptosis (actividad de la caspasa-3) (Fig. 16) en células SH-SY5Y tratadas con 6-OHDA en presencia y ausencia de los extractos.

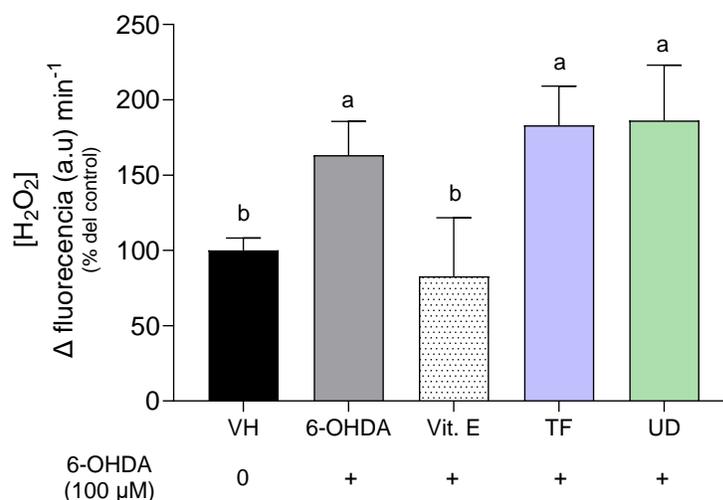
La Fig. 13 muestra la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en células SH-SY5Y tratadas con la neurotoxina 6-OHDA (100  $\mu$ M) durante 6 h, en presencia y ausencia de los extractos de *D. tertiolecta* (TF, 30  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) y *U. lactuca* (UD, 200  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). La incubación con 6-OHDA (136.7%  $\pm$  9.98,  $p < 0.01$ ) provocó un aumento significativo en la producción de ERO (36.87% en comparación con el vehículo), además, este mismo efecto se observa cuando las células fueron tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (145.50%  $\pm$  15.42,  $p < 0.01$ ), lo que indica un alto nivel de estrés oxidativo en las células. En contraste, la vitamina E disminuyó el 80.05% de la cantidad de ERO (56.62%  $\pm$  4.01,  $p < 0.01$ ) producido tras la exposición a la 6-OHDA, mismo efecto que se observa tras el tratamiento con los extractos de *D. tertiolecta* (TF, 50.07%  $\pm$  4.42,  $p < 0.01$ ) y *U. lactuca* (UD, 58.70%  $\pm$  4.42,  $p < 0.01$ ).

Por otra parte, en la Fig. 14 se muestran los niveles de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células SH-SY5Y tratadas con la neurotoxina 6-OHDA (100  $\mu$ M) durante 6 h, en presencia y ausencia de los extractos de *D. tertiolecta* (TF, 30  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) y *U. lactuca* (UD, 200  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). El tratamiento con 6-OHDA (163.30%  $\pm$  9.10,  $p < 0.01$ ) incrementó 63.26% la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en comparación con el vehículo, lo que indica un alto nivel de estrés oxidativo en las células tras la exposición al neurotóxico. Por el contrario, las células tratadas con vitamina E mantuvieron el nivel de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> igual que el vehículo (82.81%  $\pm$  15.89,  $p < 0.01$ ). No obstante, las células tratadas con los extractos TF (183.10%  $\pm$  10.63,  $p < 0.01$ ) y UD (183.20%  $\pm$  15.00,  $p < 0.01$ ) exhibieron un aumento en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 83.08% y 86.20%, respectivamente, igual que el observado con la neurotoxina.



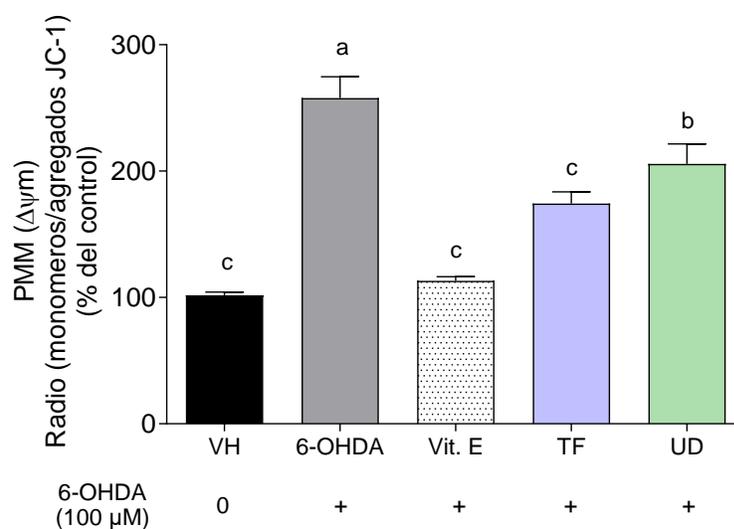
**Figura 13.** Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en células SH-SY5Y después de incubarse con 6-hidroxidopamina (100 μM, 6 h) en la ausencia y presencia de los extractos de *Dunaliella tertiolecta* (TF, 30 μg mL<sup>-1</sup>) y de *Ulva lactuca* (UD, 200 μg mL<sup>-1</sup>). Los sufijos en las abreviaciones de los letreros en el eje x señalan el solvente orgánico utilizado para obtener el extracto: cloroformo:metanol (CFMO:MeOH, F) y diclorometano:metanol (DCMO:MeOH, D). VH: vehículo, Vit. E: vitamina E (25 μM), peróxido de hidrógeno: (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100 μM), 6-OHDA: 6-hidroxidopamina. Los valores en cada columna representan el promedio ± el error estándar de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y el vehículo (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

La Fig. 15 muestra los efectos de los extractos de *D. tertiolecta* (TF, 30 μg mL<sup>-1</sup>) y *U. lactuca* (UD, 200 μg mL<sup>-1</sup>) sobre el potencial de membrana mitocondrial (PMM) en células SH-SY5Y tratadas con 6-OHDA (100 μM) durante 6 h. El tratamiento con 6-OHDA aumentó significativamente la proporción de monómeros/agregados (257.80% ± 16.86,  $p < 0.01$ ), lo que indica alteraciones en el PMM, es decir, disfunción mitocondrial. No obstante, ambos extractos de algas lograron disminuir este aumento en la proporción de monómeros/agregados provocados por la 6-OHDA. A pesar de que ambos extractos mostraron diferencias significativas con el tratamiento de 6-OHDA, el extracto TF (174.30% ± 9.25,  $p < 0.01$ ) mostró una menor relación de monómeros/agregados en comparación con los efectos del extracto UD (205.60% ± 15.88,  $p < 0.01$ ), y, estadísticamente igual al efecto de la vitamina E (113.10% ± 3.36,  $p < 0.01$ ).

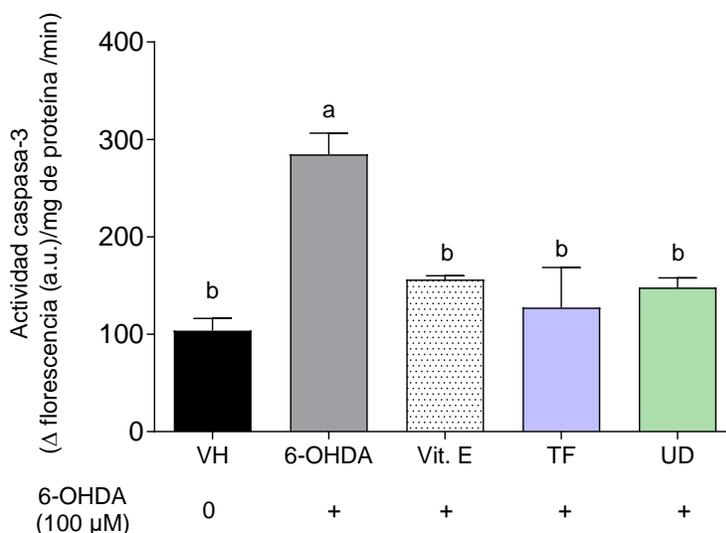


**Figura 14.** Niveles de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) producidos por las células SH-SY5Y después de incubarse con 6-hidroxidopamina ( $100 \mu M$ , 6 h) en la ausencia y presencia de los extractos de *Dunaliella tertiolecta* (TF,  $30 \mu g mL^{-1}$ ) y de *Ulva lactuca* (UD,  $200 \mu g mL^{-1}$ ). Los sufijos en las abreviaciones de los letreros en el eje x señalan el solvente orgánico utilizado para obtener el extracto: cloroformo:metanol (CFMO:MeOH, F) y diclorometano:metanol (DCMO:MeOH, D). VH: vehículo, Vit. E: vitamina E ( $25 \mu M$ ), 6-OHDA: 6-hidroxidopamina. Los valores en cada columna representan el promedio  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y el vehículo (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

Por último, en la Fig. 16 se muestran los efectos del tratamiento con 6-OHDA ( $100 \mu M$ , 6 h), sobre la actividad de la caspasa-3 en células SH-SY5Y, en ausencia y presencia de extractos *D. tertiolecta* (TF,  $30 \mu g mL^{-1}$ ) y *U. lactuca* (UD,  $200 \mu g mL^{-1}$ ). Los resultados muestran que las células tratadas con 6-OHDA ( $284.60 \pm 21.90$ ,  $p < 0.01$ ) aumentaron significativamente la actividad de caspasa-3 en comparación al vehículo en un 180.90%, indicando activación de la apoptosis. Por el contrario, el tratamiento con vitamina E disminuyó este efecto en 128.50% ( $156.10 \pm 4.06$ ,  $p < 0.01$ ). Los extractos de ambas algas exhibieron el mismo comportamiento, disminuyendo la actividad de la caspasa-3 en un 157.2 (TF:  $127.4 \pm 41.11$ ,  $p < 0.01$ ) y 136.6 (UD:  $148.0 \pm 3.90$ ,  $p < 0.01$ ), lo que sugiere un efecto protector contra la muerte celular por apoptosis.



**Figura 15.** Potencial de membrana mitocondrial (PMM) en células SH-SY5Y después de incubarse con 6-hidroxiopamina (100  $\mu$ M, 6 h) en la ausencia y presencia de los extractos de *Dunaliella tertiolecta* (TF, 30  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) y de *Ulva lactuca* (UD, 200  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). Los sufijos en las abreviaciones de los letreros en el eje x señalan el solvente orgánico utilizado para obtener el extracto: cloroformo:metanol (CFMO:MeOH, F) y diclorometano:metanol (DCMO:MeOH, D). VH: vehículo, Vit. E: vitamina E (25  $\mu$ M), 6-OHDA: 6-hidroxiopamina. Los valores en cada columna representan el promedio  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y el vehículo (ANOVA,  $p < 0.05$ ).



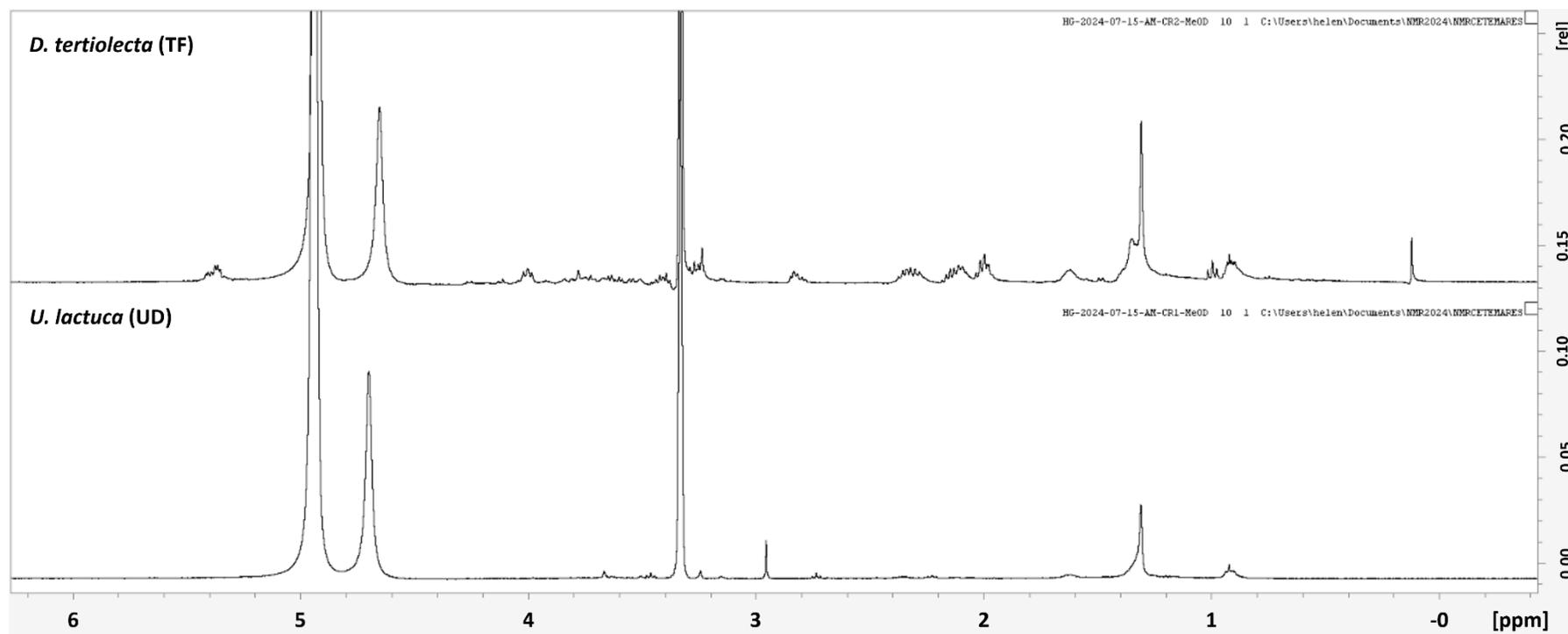
**Figura 16.** Actividad caspasa-3 en células SH-SY5Y después de incubarse con 6-hidroxidopamina (100 μM, 6 h) en la ausencia y presencia de los extractos de *Dunaliella tertiolecta* (TF, 30 μg mL<sup>-1</sup>) y de *Ulva lactuca* (UD, 200 μg mL<sup>-1</sup>). Los sufijos en las abreviaciones de los letreros en el eje x señalan el solvente orgánico utilizado para obtener el extracto: cloroformo:metanol (CFMO:MeOH, F) y diclorometano:metanol (DCMO:MeOH, D). VH: vehículo, Vit. E: vitamina E (25 μM), 6-OHDA: 6-hidroxidopamina. Los valores en cada columna representan el promedio ± el error estándar de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y el vehículo (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

### 7.5 Perfil químico de los extractos

La Fig. 17 presenta los espectros de <sup>1</sup>H RMN obtenidos en metanol-*d* (MeOD) para los extractos de *U. lactuca* (UD) y *D. tertiolecta* (TF), a 25 °C. Los espectros muestran las señales correspondientes a las distintas regiones químicas de los compuestos presentes en ambos extractos, estos picos, ubicados a lo largo del eje horizontal en función de su desplazamiento químico (δ) expresado en partes por millón (ppm), permite identificar grupos funcionales y tipos de compuestos en los extractos.

Los espectros de los extractos de *U. lactuca* y *D. tertiolecta* (Fig. 17) exhibieron principalmente señales de lípidos y aminoácidos. Sin embargo, al comparar ambos espectros hay una abundancia de moléculas lipofílicas en el extracto de *D. tertiolecta*. Las señales en la región alifática (0.85 - 2.92 ppm) se atribuyen comúnmente a protones de metilo, metileno y metino de compuestos lipofílicos como ácidos grasos, pigmentos y esteroides. Sin embargo, los grupos -CH<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub> de

aminoácidos resuenan entre 0.95 – 3.15 ppm, mientras que los -CH<sub>2</sub> de ácidos orgánicos como glutarato, succinato, citrato, etc., resuenan a 2.16 – 2.19 ppm. Empero, debido a la considerable superposición de señales en varias regiones de resonancia, es difícil asignar metabolitos específicos solo con datos de <sup>1</sup>H RMN.



**Figura 17.** Espectros de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$  RMN) en metanol deuterado (MeOD) de los extractos de *Dunaliella tertiolecta* (TF) (CR2, imagen superior) y *Ulva lactuca* (UD) (CR1, imagen inferior). Los espectros muestran las señales correspondientes a las diferentes regiones químicas presentes en los extractos de estas algas, obtenidas a 25 °C. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón (ppm)

En la tabla 2, se muestra el perfil de ácidos grasos (AG) de *D. tertiolecta* y *U. lactuca*. En el análisis de las concentraciones de estos AG entre las algas, se encontraron diferencias significativas en dos de los tres grupos de ácidos grasos evaluados (AGS, AMI y AGP). En el grupo de ácidos grasos poliinsaturados (AGP), *D. tertiolecta* presentó una concentración media significativamente mayor ( $8.29 \pm 13.4$ ) en comparación con *U. lactuca* ( $1.09 \pm 1.60$ ), con un valor de  $p$  de 0.000124 ( $p < 0.001$ ). En el grupo de ácidos grasos monoinsaturados (AMI), *U. lactuca* mostró concentraciones medias superiores ( $2.79 \pm 3.75$ ) a las de *D. tertiolecta* ( $1.46 \pm 0.784$ ), con una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, en el grupo de ácidos grasos saturados (AGS), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las dos especies ( $p$  0.146).

**Tabla 2.** Composición total de ácidos grasos de *Dunaliella tertiolecta* y *Ulva lactuca*. Los datos muestran la media  $\pm$  desviación estándar.

AG	<i>D. tertiolecta</i>	<i>U. lactuca</i>	Valor de $p$
11:0	-	-	
12:0	$0.02 \pm 0.02$	-	
13:0	$0.48 \pm 0.02$	$0.22 \pm 0.12$	
14:0	$0.25 \pm 0.01$	$1.08 \pm 0.03$	
14:1n-5	$0.96 \pm 0.03$	$0.28 \pm 0.42$	
15:0	$0.18 \pm 0.01$	$0.39 \pm 0.02$	
15:1n-5	$2.33 \pm 0.11$	$0.93 \pm 0.57$	
16:0	$26.07 \pm 1.06$	$58.32 \pm 0.51$	
16:1n-9	$2.14 \pm 0.06$	$1.53 \pm 0.03$	
16:1n-7	$1.22 \pm 0.03$	$6.12 \pm 0.01$	
16:2n-4	$0.04 \pm 0.00$	$0.06 \pm -.02$	
17:0	$0.24 \pm 0.01$	$0.15 \pm 0.03$	
16:3n-4	$0.23 \pm 0.02$	$0.09 \pm 0.02$	
17:1n-7	$0.09 \pm 0.01$	$0.46 \pm 0.04$	
18:0	$1.64 \pm 0.08$	$1.13 \pm 0.01$	
16:4n-1	-	$1.15 \pm 0.04$	
18:1n-9 trans	$0.02 \pm 0.00$	-	

18:1n-9	2.24 ± 0.09	1.24 ± 0.04	
18:1n-11	1.24 ± 0.10	11.99 ± 0.06	
18:2n-6 trans	-	-	
18:2n-6	20.54 ± 0.42	3.52 ± 0.05	
18:2n-4	-	-	
18:3n-6	-	0.19 ± 0.01	
18:3n-3 (ALA)	34.30 ± 1.69	4.72 ± 0.05	
20:0	5.13 ± 0.51	0.35 ± 0.07	
20:1n-9	-	2.36 ± 0.02	
18:4n-3	-	0.08 ± 0.01	
21:0	-	-	
20:2n-6	0.06 ± 0.01	-	
20:3n-6	-	-	
20:4n-6	-	0.19 ± 0.03	
20:3n-3	-	-	
22:0	0.28 ± 0.02	-	
23:0	-	-	
22:1n-9	-	0.18 ± 0.03	
22:2n-6	0.06 ± 0.00	-	
22:5n-3 (EPA)	-	0.24 ± 0.03	
24:0	0.27 ± 0.02	0.06 ± 0.01	
21:5n-3	-	0.62 ± 0.06	
24:1n-9	-	-	
22:5n-3	-	-	
22:6n-3 (DHA)	-	-	
AGS	34.55 ± 1.73	64.05 ± 0.25	0.15
AMI	10.20 ± 0.42	25.09 ± 0.12	< 0.05
AGP	55.22 ± 2.14	10.87 ± 0.13	< 0.001
Suma n3	34.30 ± 1.69	5.67 ± 0.13	

---

Suma n6	20.65 ± 0.41	3.90 ± 0.06
Otros AGP	0.26 ± 0.04	1.30 ± 0.02
n3/n6	1.66 ± 0.05	1.45 ± 0.05
AGP/AGS	1.60 ± 0.14	0.17 ± 0.00

---

Entre algas por grupo de ácido graso (AG) se realizó un modelo lineal generalizado Gamma (AGS, AMI y AGP). Notas: Ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AMI), poliinsaturados (AGP), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA), ácido alfa-linolénico (ALA).

## 8. DISCUSIÓN

El potencial terapéutico de las algas marinas ha generado un interés creciente debido a su capacidad para producir compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitumorales y neuroprotectores (Talero *et al.*, 2015; Bule *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2023). Entre estos compuestos destacan, ácidos grasos poliinsaturados, pigmentos fotosintéticos, polifenoles, carbohidratos, entre otros, cuyas actividades han sido ampliamente documentados (Silva *et al.*, 2019; Adetunji *et al.*, 2023). Particularmente, su posible aplicación en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas resalta la importancia de explorar más a fondo su diversidad química y funcional (Przedborski *et al.*, 2003; Hussain *et al.*, 2018; Adetunji *et al.*, 2023).

En este estudio, se evaluó la actividad antioxidante de extractos obtenidos a partir de las microalgas *D. tertiolecta*, *C. capsulata*, *R. marinus*, *P. cruentum*, *I. galbana*, *C. calcitrans* y *A. margalefii*, y de las macroalgas *U. lactuca*, *S. horridum* y *Spyridia sp.*, además de su actividad neuroprotectora en células SH-SY5Y tratadas con 6-hidroxdopamina (6-OHDA) para inducir neurotoxicidad. Se planteó como hipótesis que la actividad antioxidante de estos extractos podría mitigar el daño celular mediante la mitigación del estrés oxidativo, la preservación de la función mitocondrial y la reducción de la muerte celular por apoptosis.

Desde esta perspectiva, se utilizaron tres metodologías para medir la actividad antioxidante: 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH, Fig. 7), poder de reducción antioxidante del ion férrico (FRAP, Fig. 9) y la actividad eliminadora de radicales del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ , Fig. 8), donde los extractos obtenidos con acetona presentaron las mayores actividades antioxidantes, especialmente en la prueba  $O_2^{\cdot-}$ , destacándose el extracto de *C. capsulata* (NA) (Fig. 8a). En contraste, los extractos obtenidos con diclorometano:metanol (DCMO:MeOH) mostraron la menor actividad antioxidante en todas las pruebas. Este comportamiento se atribuye a la composición de los extractos, ya que la extracción con acetona favorece la obtención de pigmentos fotosintéticos, como clorofilas y carotenoides (El-Sayed *et al.*, 2016; Pniewski, 2020; Qiu *et al.*, 2019). Por otro

lado, los solventes cloroformo:metanol (CFMO:MeOH) y diclorometano:metanol (CFMO:MeOH) extraen principalmente compuestos lipídicos como ácidos grasos poliinsaturados, esteroides y, en menor medida, ciertos ácidos orgánicos y aminoácidos (Patel *et al.*, 2018; Clemente *et al.*, 2020; Habib *et al.*, 2022; Baeshen *et al.*, 2023).

Los resultados de este estudio subrayan que los pigmentos fotosintéticos, que son los extractos extraídos con acetona, poseen una mayor capacidad antioxidante que otros compuestos como los lípidos debido a su estructura química, caracterizada por dobles enlaces conjugados que neutralizan especies reactivas de oxígeno (ERO) y otras moléculas reactivas (Silva *et al.*, 2018; Chini *et al.*, 2023). Aunque los lípidos y en particular los ácidos grasos poliinsaturados también exhiben actividad antioxidante gracias a los dobles enlaces que se encuentran en sus cadenas hidrocarbonadas, los cuales, tienen la capacidad de donar electrones y secuestrar ERO, su susceptibilidad a la oxidación limita su eficacia en comparación con los pigmentos fotosintéticos (Santoro *et al.*, 2022; Ahamefule *et al.*, 2023).

Las diferencias en los resultados de las distintas pruebas pueden explicarse por las características específicas de cada metodología (Nishikimi *et al.*, 1972; Brand-Williams *et al.*, 1995; Benzie *et al.*, 1996; Gulcin y Alwased, 2023). Los ensayos de DPPH y FRAP, basados en la transferencia de electrones, son pruebas generales que no siempre representan con precisión la actividad antioxidante en un contexto biológico (Benzie *et al.*, 1996; Gulcin y Alwased, 2023). En cambio, la prueba del  $O_2^{\cdot -}$ , que mide la actividad eliminadora del anión superóxido, mediante la simulación de la acción de la enzima SOD, tiene mayor relevancia fisiológica al reflejar procesos intracelulares (Nishikimi *et al.*, 1972). De manera que esta diferencia en el fundamento de las pruebas, explica por qué algunos extractos mostraron una mejor actividad antioxidante en la prueba de eliminación de superóxido.

En trabajos previos se ha reportado el uso de compuestos bioactivos de origen marino (principalmente provenientes de macroalgas) como neuroprotectores contra la neurotoxicidad

inducida con 6-OHDA, por lo que se ha utilizado este mismo modelo para explorar nuevos compuestos (Souza *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2018 – 2021, 2023). En este estudio, las células que fueron tratadas con los extractos de *D. tertiolecta* (TF: 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y *U. lactuca* (UA: 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; UD 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) exhibieron una disminución en la mortalidad celular contra el efecto de la 6-OHDA, aumentando la viabilidad celular en un 20%, 40% y 15%, respectivamente (Fig. 12).

Es importante considerar que los ensayos químicos no son suficientes para evaluar el potencial antioxidante, ya que en sistemas biológicos los compuestos pueden interactuar en rutas metabólicas más complejas (Silva *et al.*, 2019). Así, aunque algunos compuestos no muestren una alta actividad antioxidante en ensayos químicos como el DPPH, podrían tener efectos significativos en modelos *in vitro* o *in vivo*, donde intervienen otros mecanismos celulares (Silva *et al.*, 2021b). Tal es el caso de nuestras muestras con actividad neuroprotectora, TF, UD y UA, las cuales no presentaron actividad antioxidante por la prueba de DPPH, pero si por la prueba de  $\text{O}_2^{\cdot -}$  y FRAP, principalmente los extractos TF y UA. Esto nos indica que mientras que TF y UA actúan mediante la transferencia de electrones y la reducción del radical superóxido, UD podría estar interviniendo en otras rutas o con otro tipo de moléculas, sin embargo, es necesario realizar pruebas complementarias que nos indiquen cómo es que este extracto está interviniendo en la protección celular. Por otro lado, pese a que el extracto de UA parece poseer la mayor actividad antioxidante, y la mayor actividad contra la neurotoxicidad inducida, es importante aclarar que este último resultado corresponde a un falso positivo, debido a que, en la observación de las células al microscopio, las células no eran viables con y sin la 6-OHDA.

Estos resultados resaltan la importancia de complementar las pruebas químicas con estudios biológicos para una evaluación más completa de su potencial antioxidante. Por ejemplo, Souza *et al.* (2018), reportaron que el kappa-carragenano aislado del alga roja *Hypnea musciformis* posee una baja actividad antioxidante, sin embargo, mostró actividad neuroprotectora en la neurotoxicidad inducida por 6-OHDA en células SH-SY5Y mediante la modulación del potencial transmembrana de las mitocondrias y la reducción de la actividad de la caspasa 3.

Para comprender los mecanismos mediante los cuales estos extractos protegieron a las células, se llevaron a cabo distintos ensayos *in vitro* (cuantificación de ERO, cuantificación de peróxido de hidrógeno, potencial de membrana mitocondrial y actividad de la caspasa-3) en células tratadas con 6-OHDA en presencia y ausencia de los extractos TF y UD (Fig. 13, 14, 15 y 16, respectivamente).

El estrés oxidativo (EO) es un factor determinante en la neurodegeneración, debido a la acumulación de ERO, particularmente en el cerebro, un órgano altamente vulnerable debido a la riqueza en lípidos particularmente fosfolípidos y ácidos grasos poliinsaturados (AGP) y a su actividad metabólica elevada (Drechsel y Patel, 2008; Juárez-Olguín *et al.*, 2016; Niedzielska *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2021a). La neurotoxicidad inducida por 6-OHDA genera un aumento de ERO dentro de las células SH-SY5Y, imitando condiciones de EO que contribuyen a la degeneración neuronal (Huang *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2023). En este contexto, los extractos de *D. tertiolecta* y *U. lactuca* lograron reducir la producción de ERO, aunque no mostraron efectos específicos sobre la generación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), una ERO particularmente estable. Este efecto antioxidante se asocia con la capacidad de los compuestos presentes en los extractos para donar electrones y neutralizar ERO, lo cual se relaciona con sus dobles enlaces conjugados y grupos funcionales reactivos que permiten la estabilización de radicales libres (Hwang, 2013; Silva *et al.*, 2018; Angeloni *et al.*, 2019; Aramouni *et al.*, 2023).

Diversos estudios se centran en comprender el papel del EO en eventos específicos como la muerte celular neuronal y cómo puede prevenirse mediante mecanismos antioxidantes (Huang *et al.*, 2019; Sanghai y Tranmer, 2023; Silva *et al.*, 2023). Así, los resultados demuestran que nuestros extractos tienen la capacidad para reducir la producción de ERO en las células SH-SY5Y cuando se comparó con el efecto de la 6-OHDA previniendo el EO, no obstante, no reducen en específico la producción del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), por lo tanto, este efecto neuroprotector es mediado por la reducción de algunas ERO, pero no del  $H_2O_2$ .

Además del control del EO, la preservación de la función mitocondrial es fundamental en la neuroprotección. Las mitocondrias son el principal sitio de producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa y están involucradas en la regulación del calcio intracelular (Mohd y Sirajudeen, 2020; Matuz-Mares *et al.*, 2022; Alhial *et al.*, 2023). Sin embargo, cuando el EO es elevado, se produce una disfunción mitocondrial, especialmente en los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones, desencadenando la pérdida de potencial de membrana mitocondrial (PMM) y conduciendo a la activación de la apoptosis (Mohd y Sirajudeen, 2020; Matuz-Mares *et al.*, 2022; Rosenstock *et al.*, 2022; Mohamed y Mohd, 2024). En este estudio, el extracto de *D. tertiolecta* mostró un efecto protector significativo al prevenir la despolarización de la membrana mitocondrial inducida por 6-OHDA, mientras que el extracto de *U. lactuca* presentó una tendencia a proteger la mitocondria, aunque con una diferencia estadística no tan significativa como la de TF (Fig. 15). Este efecto sugiere que el extracto de *D. tertiolecta* es más eficaz en la estabilización de la función mitocondrial, posiblemente debido a su mayor contenido en carotenoides y glicerol, compuestos conocidos por sus efectos estabilizadores de membranas y neutralizadores de ERO (Johnson *et al.*, 2018).

Por otro lado, la apoptosis mediada por la caspasa-3 representa otro mecanismo clave en la neurodegeneración, ya que la activación de esta enzima ejecutora lleva a cambios morfológicos y funcionales que resultan en la muerte celular programada (Mohd y Sirajudeen, 2020; Asadi *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2023; Tong y Wong, 2023). En células tratadas con 6-OHDA, se observó un incremento significativo en la actividad de la caspasa-3 (Fig. 16), mientras que los extractos de *D. tertiolecta* y *U. lactuca* lograron reducir esta actividad, sugiriendo un efecto anti-apoptótico. Debido a las alteraciones de membrana mitocondrial observadas en los resultados obtenidos junto a la disminución de la actividad de la caspasa-3 sugiere que los compuestos presentes en las muestras podrían estar protegiendo las membranas celulares, evitando la liberación de citocromo C y la activación de caspasas en la cascada apoptótica, estabilizando así las células y previniendo su muerte, teniendo un efecto sobre la modulación de la vía intrínseca de apoptosis (vía mitocondrial), en la cual las mitocondrias juegan un papel central. Sin embargo, nuestros resultados no son suficientes para confirmar esta nueva hipótesis y es necesario llevar a cabo

otros análisis adicionales. Por ejemplo, para confirmar sobre qué vía podría estar siendo modulada la apoptosis, es necesario evaluar otros biomarcadores de la vía externa como la caspasa-8 (específica de la vía extrínseca) o la caspasa-9 (específica de la vía intrínseca), así como cuantificar los niveles de citocromo C.

Para comprender los mecanismos por los cuales los compuestos obtenidos ejercen su acción neuroprotectora, es importante identificar y conocer la composición química de los extractos de *U. lactuca* (UD) y *D. tertiolecta* (TF). Para esto, se realizaron análisis de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$  RMN) para conocer el tipo de compuestos presentes en los extractos. Los espectros de  $^1\text{H}$  RMN de ambos extractos revelaron diferencias en su composición química, las cuales podrían explicar sus diferentes efectos en los mecanismos antioxidantes y neuroprotectores. Estas diferencias reflejan las adaptaciones bioquímicas y estructurales de cada tipo de alga, con *D. tertiolecta* enfocándose en compuestos lipídicos, pigmentos y esteroides, y *U. lactuca* en lípidos y aminoácidos (Arora *et al.*, 2018; Iglesias *et al.*, 2019; Eltamany *et al.*, 2021; Sanchez-Arcos *et al.*, 2022).

El  $^1\text{H}$  RMN nos muestra un perfil químico preliminar de los compuestos presentes en las muestras, debido a la considerable superposición de señales en varias regiones de resonancia, sin embargo, es difícil asignar metabolitos específicos solo con datos de  $^1\text{H}$  RMN. Por lo tanto, en trabajos futuros, será necesario realizar un análisis complementario de ambos extractos mediante espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), lo que permitiría una identificación más precisa, así como la cuantificación y caracterización estructural de compuestos presentes en mezclas complejas como las analizadas en este estudio (Yu *et al.*, 2024). Este método se basa en la separación de compuestos mediante cromatografía líquida y su análisis mediante fragmentación y detección de iones en dos etapas.

La identificación de grupos de compuestos bioactivos en los extractos de *U. lactuca* mediante  $^1\text{H}$  RMN confirmó la presencia de lípidos, ácidos grasos y aminoácidos, compuestos que pueden ser los responsables de los efectos antioxidantes y neuroprotectores observados. Entre los ácidos

grasos presentes en la muestra de *U. lactuca* se identificaron el 18:3n-3 (ácido alfa-linolénico, ALA), 18:4n-3 (ácido estearidónico, SDA), 24:0 (ácido lignocérico) y 18:1n-11 (ácido vaccénico), los cuales han demostrado propiedades antioxidantes al incrementar la actividad de enzimas antioxidantes y reducir los niveles de estrés oxidativo mediante la interacción con especies reactivas de oxígeno (ERO) (Rincón-Cervera *et al.*, 2016; Oppedisano *et al.*, 2020a, 2020b).

El ALA, un ácido graso poliinsaturado omega-3 con tres dobles enlaces en configuración *cis*, neutraliza los radicales libres (RL) y actúa como precursor de ácidos grasos de cadena más larga como el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6n-3) (Wijaya y Linawati, 2024). Estos compuestos son conocidos por modular sistemas antioxidantes celulares, promoviendo la activación de enzimas antioxidantes como la CAT, la GPx y la SOD (Borgonovi *et al.*, 2023; Seth *et al.*, 2024). Por otro lado, el SDA, al ser un precursor directo del EPA, facilita su síntesis y contribuye a la interacción con las ERO, previniendo el daño oxidativo en biomoléculas esenciales (Palaniswamy *et al.*, 2014).

Además, en el extracto de *U. lactuca* se detectó EPA, aunque en menor proporción, el cual exhibe propiedades tanto antioxidantes como antiinflamatorias (Limón-Pachecho y Gonsebatt, 2009; Palaniswamy *et al.*, 2014). El EPA, con cinco dobles enlaces en configuración *cis*, interactúa eficazmente con ERO y RL, reduciendo el daño oxidativo en lípidos, proteínas y ADN. Asimismo, estimula la actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT), que degrada el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); la superóxido dismutasa (SOD), que elimina el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>); y la glutatión peróxidasa (GPx), que degrada hidroperóxidos lipídicos (Limón-Pachecho y Gonsebatt, 2009; Sakai *et al.*, 2017).

Por su parte, *D. tertiolecta* es una microalga conocida por su acumulación de lípidos debido a su naturaleza unicelular, además, al igual que otras microalgas del género, es conocida por habitar ambientes hipersalinos, gracias a los cuales produce glicerol en altas cantidades, como respuesta osmótica (Keil *et al.*, 2023; Keil *et al.*, 2024). Así, la identificación de los compuestos bioactivos en los extractos de *D. tertiolecta* mediante <sup>1</sup>H RMN también muestra la presencia de lípidos en

particular ácidos grasos (18:3n-3 (ALA), 18:4n-3 (SDA), 24:0 (ácido lignocérico) y 22:2n-6 (ácido docosadienoico)), glicerol y carotenoides (especialmente  $\beta$ -caroteno), compuestos que pueden ser los responsables de los efectos antioxidantes y neuroprotectores observados. La alta concentración de lípidos, especialmente ácidos grasos y  $\beta$ -caroteno, junto con glicerol, sugiere una composición rica en compuestos que actúan como osmoprotectores y antioxidantes. El  $\beta$ -caroteno, además de sus propiedades antioxidantes, puede regular la apoptosis a través de su interacción con las mitocondrias, estabilizando las membranas y previniendo la liberación de factores proapoptóticos (Wang y Youle, 2009; Johnson *et al.*, 2018).

Los ácidos grasos presentes en los extractos obtenidos contribuyeron a la reducción de la producción de ERO, a la protección de las mitocondrias y a la disminución de la actividad de la caspasa-3, lo que mejoró la viabilidad celular. Además de su papel como antioxidantes, algunos ácidos grasos poseen propiedades antiinflamatorias (Kobayashi y Morita, 2019). Por ejemplo, el EPA y DHA han sido reportados como antiinflamatorios (Kobayashi y Morita, 2019; So *et al.*, 2019).

En las neuronas y en las EN, la inflamación junto al estrés oxidativo desempeña un papel central (Mohd y Sirajundeen, 2020). El exceso de ERO provoca daño en lípidos, proteínas y ADN, lo que afecta funciones clave como la transmisión sináptica y la supervivencia celular (Gandhi y Abramov, 2012; Aramouni *et al.*, 2023). Este daño activa respuestas inflamatorias mediadas por la microglía y los astrocitos, que liberan citoquinas proinflamatorias y generan más ERO, exacerbando el daño neuronal (Mohd y Sirajundeen, 2020). Este ciclo de estrés oxidativo e inflamación contribuye a la muerte progresiva de las neuronas y la acumulación de proteínas mal plegadas, características distintivas de estas enfermedades (Gao y Hong, 2008; Yildiz-Unal *et al.*, 2015; Dugger y Dickson, 2017; Mohd y Sirajundeen, 2020). Interrumpir este ciclo con compuestos antioxidantes y antiinflamatorios podría ayudar a proteger las neuronas y retrasar la progresión de la neurodegeneración. Por lo tanto, trabajos que exploren estas propiedades en conjunto son necesarios para sugerir un efecto neuroprotector significativo en células expuestas a estrés oxidativo.

Desde una perspectiva metabólica, los compuestos bioactivos identificados en las algas estudiadas están relacionados con la activación de vías de señalización antioxidantes (Matin *et al.*, 2024). Estudios previos han indicado que los compuestos derivados de algas marinas, como los polifenoles, carotenoides, lípidos y polisacáridos, tienen la capacidad de modular vías intracelulares críticas (Basha *et al.*, 2024; Matin *et al.*, 2024). Por ejemplo, la activación del factor de transcripción Nrf2, un regulador de la respuesta antioxidante, induce la expresión de enzimas como la superóxido dismutasa y la catalasa, que son esenciales para la neutralización de especies reactivas de oxígeno y la prevención del daño oxidativo (Carpena *et al.*, 2024; Matin *et al.*, 2024).

La comparación con estudios similares sugiere que estos efectos podrían ser generalizables a otros tipos de algas marinas, lo que resalta su potencial en el desarrollo de terapias para enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson (Silva *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2020). Por ejemplo, Silva *et al.* (2021a) encontraron que el loliolide, un monoterprenoide extraído de *Codium tomentosum*, aumentó la viabilidad celular en un 40% frente a la neurotoxicidad inducida por 6-OHDA. Silva *et al.* (2021b) reportaron que el eleganolone, un diterpeno extraído de *Bifurcaria bifurcata*, incrementó la viabilidad celular en un 20%, protegiendo a las mitocondrias y reduciendo las condiciones de EO y apoptosis. Nuestros resultados concuerdan con estudios previos que han explorado compuestos bioactivos de otras algas. Por ejemplo, los fucoidanos extraídos de algas marrones como *Sargassum hemiphyllum* han mostrado efectos similares, protegiendo las células SH-SY5Y del daño inducido por 6-OHDA a través de la inhibición de caspasas y la preservación de la función mitocondrial (Huang *et al.*, 2017). Asimismo, el fucoxantín, otro carotenoide de algas marrones ha demostrado en diversos modelos su capacidad para mitigar el daño oxidativo y prevenir la disfunción mitocondrial, lo cual es consistente con los efectos observados en este estudio con *D. tertiolecta* y *U. lactuca* (Wu *et al.*, 2021).

## 9. CONCLUSIONES

El presente trabajo evaluó el potencial neuroprotector de los extractos lipídicos de *Dunaliella tertiolecta* y *Ulva lactuca* frente a la neurotoxicidad inducida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Los compuestos estudiados presentaron una potencial capacidad neuroprotectora, dada su actividad sobre reducción del estrés oxidativo y la prevención de la disfunción mitocondrial, previniendo así la muerte celular neuronal por apoptosis, en particular, por disminuir la disfunción mitocondrial al reducir la actividad de la caspasa-3, factores críticos en las vías apoptóticas. Aunque no se logró una reducción específica del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), los extractos inhibieron otras especies reactivas de oxígeno (ERO), como el radical superóxido, lo que sugiere una protección antioxidante dirigida y altamente específica.

Estos efectos están estrechamente vinculados a la composición bioactiva de los extractos de algunas algas, en específico, *D. tertiolecta* se caracteriza por su riqueza en ácidos grasos poliinsaturados, pigmentos fotosintéticos y glicerol, mientras que *U. lactuca* destaca por su contenido de ácidos grasos y aminoácidos. Estas propiedades refuerzan la relevancia de las algas marinas como fuentes sostenibles y versátiles de compuestos bioactivos con aplicaciones prometedoras en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Los resultados de la presente tesis muestran un interesante potencial de uso de las algas para enfermedades neurodegenerativas, no obstante, la transición de estos compuestos a aplicaciones clínicas requiere investigaciones adicionales, tal como la exploración de más biomarcadores como la caspasa-8 y el citocromo C, así como la evaluación de su actividad frente a otros factores involucrados en los procesos neurodegenerativos como la neuroinflamación y la excitotoxicidad. Así mismo, la caracterización más detallada de sus metabolitos activos mediante técnicas avanzadas, como espectrometría de masas, es fundamental para comprender con mayor precisión sus mecanismos de acción.

Estudios futuros complementarios deberían explorar además su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica y mantener concentraciones terapéuticamente efectivas en el cerebro. Asimismo, deberían centrarse en el desarrollo de sistemas de administración innovadores, como nanopartículas o vehículos lipídicos, que mejoren su biodisponibilidad y eficacia en tejidos neuronales.

En este contexto, los recursos naturales derivados de algas marinas se posicionan como una alternativa viable y sustentable para el desarrollo de terapias efectivas, seguras y respetuosas con el medio ambiente. La investigación continua en este campo tiene el potencial de abrir nuevas perspectivas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como el Parkinson, consolidando el papel de las algas marinas en la biotecnología médica y la neurociencia.

## 10. LITERATURA CITADA

- Adetunji, J., Agbolade, A.O., Adewale, O.O., Ejidike, I.P., Adetunji, C.O. y Oyewole, I.O. (2023). Pharmacological and antioxidant attributes of significant bioactives constituents derived from algae. In: Adetunji, C.O., Oloke, J.K., Dwivedi, N., Ummalyma, S.B., Dwivedi, S., Hefft D.J. y Adetunji, J.B. (eds.). *Next-generation algae: Volume II: Applications in medicine and the pharmaceutical industry*. Scrivener Publishing, Beverly, MA. pp. 197-221. doi: 10.1002/9781119857860.ch9
- Ahamefule, C. S., Ogbonna, C. N., Ahamefule, B. C., Ogbonna, I. y Ogbonna, J. (2023). Lipids and fatty acids from microalgae. En: Jacob-Lopes, E., Queiroz, M.I., Maroneze, M.M., Queiroz, L. (eds.). In: *Handbook of food and feed from microalgae*. Academic Press, Elsevier, Cambridge, MA., pp. 73-86. doi: 10.1016/b978-0-323-99196-4.00029-2
- Alexander, G.E. (2004). Biology of Parkinson's disease: pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. *Dialogues Clinical Neuroscience*, 6: 259–280. doi: 10.31887/DCNS.2004.6.3/galexander.
- Alshial, E.E., Abdulghaney, M.I., Wadan, A.H.S., Abdellatif, M.A., Ramadan, N.E., Suleiman, A.M., Waheed, N., Abdellatif, M. y Mohammed, H.S. (2023). Mitochondrial dysfunction and neurological disorders: a narrative review and treatment overview. *Life Sciences*, 122257. doi: 10.1016/j.lfs.2023.122257
- Amould, R., Dubois, J., Abikhalil, F., Libert, A., Ghanem, G., Atassi, G., Hanoca, M. y Lejeune, F.J. (1990). Comparison of two cytotoxicity assays-tetrazolium derivative reduction (MTT) and tritiated thymidine uptake on three malignant mouse cell lines using chemotherapeutic agents and investigational drugs. *Anticancer Research*, 10 (1): 145–154. PMID: 2334120.
- Andrade, S., Nunes, D., Dabur, M., Ramalho, M.J., Pereira, M.C. y Loureiro, J.A. (2023). Therapeutic potential of natural compounds in neurodegenerative diseases: Insights from clinical trials. *Pharmaceutics*, 15(1): 212. doi: 10.3390/pharmaceutics15010212
- Angeloni, C. y Vauzour, D. (2019). Natural products and neuroprotection. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (22): 5570. doi: 10.3390/ijms20225570
- Angeloni, C., Giusti, L. y Hrelia, S. (2019). New neuroprotective perspectives in fighting oxidative stress and improving cellular energy metabolism by oleocanthal. *Neural Regeneration Research*, 14 (7): 1217–1218. doi: 10.4103/1673-5374.251327
- Aoyama, K. y Nakaki, T. (2013). Impaired glutathione synthesis in neurodegeneration. *International Journal of Molecular Science*, 14 (10): 21021-21044. doi: 10.3390/ijms141021021.
- Aramouni, K., Assaf, R., Shaito, A., Fardoun, M., Al-Asmakh, M., Sahebkar, A. y Eid, A. (2023). Biochemical and cellular basis of oxidative stress: Implications for disease onset. *Journal of Cellular Physiology*, 238: 1951-1963. doi: 10.1002/jcp.31071
- Aravind, G.K. y Inbakandan, D. (2022). Role of algal metabolites and pigments: characterization and application. In: *Algal functional foods and nutraceuticals: Benefits, opportunities, and challenges*. Bentham Science Publishers, pp. 395-405. doi: 10.2174/97898150518721220101 Ebook ISBN: 9789815051872
- Arora, N., Dubey, D., Meenakshi, S., Patel, A., Guleria, A., Pruthi, P.A., Kumar, D., Pruthi, V. y Mohan, K. (2018). NMR-Based metabolomic approach to elucidate the differential cellular responses during mitigation of arsenic (iii, v) in a green microalga. *American Chemical Society Omega*, 3: 11847–11856. doi: 10.1021/acsomega.8b01692

- Arredondo-Vega, B. y Voltolina, D. (2017). Determinación de pigmentos totales por métodos espectrofotométricos. En: Arredondo-Vega B.O., Voltolina D., Zenteno-Zavin T., Arce-Montoya M., Gómez-Anduro G. (eds). *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*, 2.<sup>a</sup> ed. México, pp. 75-85.
- Asadi, M., Taghizadeh, S., Kaviani, E., Vakili, O., Taheri-Anganeh, M., Tahamtan, M. y Savardashtaki, A. (2022). Caspase-3: Structure, function, and biotechnological aspects. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(4): 1633–1645. doi: 10.1002/bab.2233
- Aslantürk, Ö.S. (2018). *In vitro* cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. En: Larramendy, M.L. y Soloneski, S. (eds.). *Genotoxicity-A predictable risk to our actual world*. London: IntechOpen, vol. 2, pp. 64-80. doi: 10.5772/intechopen.71923
- Bách, N. Đ., Minh, P. T., Hương, V. L. D., y Miên, P. T. C. (2023). Nghiên cứu thử nghiệm nuôi tảo *Chaetoceros calcitrans* trong hệ thống quang sinh vận hành bằng khí. *Bản B của Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 65(2). doi: 10.31276/VJST.65(2).66-72
- Baeshen, N.A., Almulaiky, Y.Q., Afifi, M., Al-Farga, A., Ali, H.A., Baeshen, N.N., Mosieh, M., Aaser, A., Abdelazim, M. y Baeshen, M.N. (2023). GC-MS analysis of bioactive compounds extracted from plant *Rhazya stricta* using various solvents. *Plants*, 12(4): 960. doi: 10.3390/plants12040960
- Balboa, E., Conde, E., Moure, A., Falqué, E. y Domínguez, H. (2013). *In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chemistry*, 138 2-3): 1764-1785. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.11.026
- Balech, E. (1994). Three new species of the genus *Alexandrium* (Dinoflagellata). *Transactions of the American Microscopical Society*, 113(2): 216. doi: 10.2307/322665
- Banni, S., Angioni, E., Murru, E., Carta, G., Paola Melis, M., Bauman, D., Dong, Y. y Ip, C. (2001). Vaccenic acid feeding increases tissue levels of conjugated linoleic acid and suppresses development of premalignant lesions in rat mammary gland. *Nutrition and Cancer*, 41(1-2): 91-97. doi: 10.1080/01635581.2001.9680617
- Barbosa, M., Garcia, L., Afonso, C. y Maranhão, P. (2023). The microalga *Dunaliella* and its applications: a review. *Applied Phycology*, 4(1): 99-120. doi: 10.1080/26388081.2023.2222318
- Basha, A.N., Akhir, F.N.M. y Hara, H. (2024). Antioxidant and anticancer potential of bioactive compounds from locally isolated microalgae. *Journal of Health and Quality of Life*, 3(1): 40-54. doi: 10.37934/jhqol.3.1.4054
- Belkis, A., Yıllancıoğlu, K., Gültekin, S.K., y Albayrak, İ.G. (2022). Chemical constituent of *Isochrysis galbana* microalgae extract and its cytotoxic activities on leukemic cell lines. *Istanbul Journal of Pharmacy*, 52(1): 64-68. doi: 10.26650/IstanbulJPharm.2022.1057338
- Benzie, I.F. y Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, (239): 70–76. doi: 10.1006/abio.1996.0292
- Bhosale, P., Ha, S., Vetrivel, P., Kim, H., Kim, J.A., Park, K., Kim, S. y Kim, G. (2020). Flavonoid-induced apoptotic cell death in human cancer cells and its mechanisms. *Journal of Biomedical Translational Research*, 21: 50-58. doi: 10.12729/jbtr.2020.21.2.050.
- Blackburn, S.I., Bolch, C.J.S., Haskard, K.A. y Hallegraef, G.M. (2001). Reproductive compatibility among four global populations of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Phycologia*, 40 (1): 78-87. doi: 10.2216/i0031-8884-40-1-78.1

- Blesa, J., Trigo-Damas, I., Quiroga-Varela, A. y Jackson-Lewis, V.R. (2015). Oxidative stress and Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9: 1–9. doi: 10.3389/fnana.2015.00091
- Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M.F., Benabid, A.L., Sadoul, R. y Verna, J. M. (2001). Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 65(2): 135-172. doi: 10.1016/S0301-0082(01)00003-X.
- Bolton, C., Wood, E.G., Scott, G.S. y Flower, R.J. (2009). A comparative evaluation of the response to peroxynitrite by a brain endothelial cell line and control of the effects by drug targeting. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 29(5): 707-717. doi: 10.1007/s10571-009-9391-5
- Borgonovi, S.M., Iametti, S. y Di Nunzio, M. (2023). Docosahexaenoic acid as master regulator of cellular antioxidant defenses: A systematic review. *Antioxidants*, 12(6): 1283. doi: 10.3390/antiox12061283
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1): 25-30. doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
- Bueno, M., Vitali, C., Sánchez-Martínez, J.D., Mendiola, J.A., Cifuentes, A., Ibáñez, E. y Herrero, M. (2020). Compressed CO<sub>2</sub> technologies for the recovery of carotenoid-enriched extracts from *Dunaliella salina* with potential neuroprotective activity. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. American Chemical Society (ACS), 8 (30): 11413-11423. doi: 10.1021/acssuschemeng.0c03991
- Bule, M.H., Ahmed, I., Maqbool, F., Bilal, M. y Iqbal, H. M. (2018). Microalgae as a source of high-value bioactive compounds. *Frontiers in Bioscience*, 10(2): 197-216. doi: 10.2741/s509
- Butcher, R.W. (1959). An introductory account of the smaller algae of British coastal waters. Part I: Introduction and Chlorophyceae. *Fisheries Investigations*, London, series IV 1: 1-74.
- Carpena, M., Pereira, C.S., Silva, A., Barciela, P., Jorge, A.O.S., Perez-Vazquez, A., Pereira, A., Barreira, J.C., Oliveira, M.B. y Prieto, M.A. (2024). Metabolite profiling of macroalgae: biosynthesis and beneficial biological properties of active compounds. *Marine Drugs*, 22(10): 478. doi: 10.3390/md22100478
- Chelikani, P., Fita, I. y Loewen, P.C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(2): 192-208. doi: 10.1007/s00018-003-3206-5
- Chini Z.G., Lauceri, R., Faraloni, C., Silva Benavides, A.M. y Torzillo, G. (2023). Valuable pigments from microalgae: phycobiliproteins, primary carotenoids, and fucoxanthin. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 22(8): 1733-1789. doi: 10.1007/s43630-023-00407-3
- Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Hunt, R.W. y Das, K.C. (2010). Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technology*, 101: 3097-3105. doi: 10.1016/j.biortech.2009.12.026
- Clemente, I., Menicucci, F., Sautariello, G. y Ristori, S. (2020). Eco-friendly lipid nanoformulations: toward greener alternatives for organic extraction solvents. In: *Advances in bionanomaterials ii: selected papers from the 3rd international conference on bio and nanomaterials, BIONAM*

- 2019, September 29–October 3, 2019 (pp. 139-150). Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-030-47705-9\_13
- Cohen, A.D., Tillerson, J.L., Smith, A.D., Schallert, T. y Zigmond, M.J. (2003). Neuroprotective effects of prior limb use in 6-hydroxydopamine-treated rats: possible role of GDNF. *Journal of Neurochemistry*, 85: 299-305. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01657.x
- Dailah, H.G. (2022). Potential of therapeutic small molecules in apoptosis regulation in the treatment of neurodegenerative diseases: An updated review. *Molecules*, 27(21): 7207. doi: 10.3390/molecules27217207
- Davies, K.J. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50 (4-5): 279-289. doi: 10.1080/713803728
- de Medeiros, L.M., de Bastiani, M.A., Rico, E.P., Schonhofen, P., Pfaffenseller, B., Wollenhaupt-Aguiar, B., Grun, B., Barbé-Tuana, L., Zimmer, F., Castro, E.R., Parsons, M.M.A. y Klamt, F. (2019). Cholinergic differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cell line and its potential use as an *in vitro* model for Alzheimer's disease studies. *Molecular Neurobiology*, 56: 7355–7367. doi: 10.1007/s12035-019-1605-3
- Decker, D.E., Althaus, J.S., Buxser, S.E., VonVoigtlander, P.F. y Ruppel, P.L. (1993). Competitive irreversible inhibition of dopamine uptake by 6-hydroxydopamine. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 79(2): 195-208. PMID: 8451541.
- Denault, J.B. y Salvesen, G.S. (2001). Caspases. *Current Protocols in Protein Science*, 26: 1934-3655. doi: 10.1002/0471140864.ps2108s26
- Dorado-Martínez, C., Rugerio-Vargas, C. y Rivas-Arancibia, S. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 46(6): 229:235.
- dos Santos, M.A.Z., Berneira, L.M., Goulart, N.L., Mansilla, A., Astorga-España, M.S. y de Pereira, C.M.P. (2021). Rhodophyta, Ochrophyta and Chlorophyta macroalgae from different sub-Antarctic regions (Chile) and their potential for polyunsaturated fatty acids. *Brazilian Journal of Botany*, 44: 429-438. doi: 10.1007/S40415-021-00712-0
- Drechsel, D.A. y Patel, M. (2008). Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 44 (11): 1873-1886. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.02.008
- Dugger, B.N. y Dickson, D.W. (2017). Pathology of neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9 (7): a028035. doi: 10.1101/cshperspect.a028035
- Dumont, M., Wille, E., Stack, C., Calingasan, N.Y., Beal, M.F. y Lin, M.T. (2009). Reduction of oxidative stress, amyloid deposition, and memory deficit by manganese superoxide dismutase overexpression in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*, 23(8): 2459-2466. doi: 10.1096/fj.09-132928
- El-Sayed, A.E.K.B., Hamed, A.F., El-Fouly, M.M., Abd El Fatah, H.M. y Hassoub, M.A. (2016). A comparative study on the estimation of extracted pigments from some algae using different solvents. *Egyptian Journal of Phycology*, 17(1): 1-16. doi: 10.21608/EGYJS.2016.115971
- Eltamany, E.E., Elhady, S.S., Goda, M.S., Aly, O.M., Habib, E.S., Ibrahim, A.K., Hassanean, H.A., Abdelmohsen, U.R., Safo, M.K. y Ahmed, S.A. (2021). Chemical composition of the red sea green algae *Ulva lactuca*: isolation and *in silico* studies of new anti-COVID-19 Ceramides. *Metabolites*, 11(12): 816. doi: 10.3390/metabo11120816

- Erkkinen, M.G., Kim, M.O. y Geschwind, M.D. (2018). Clinical Neurology and epidemiology of the major neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10. doi: 10.1101/cshperspect.a033118.
- Estrada, R., Sánchez-Colón, S., y Morón, O. (2014). *Sargassum*: An extraordinary floating alga ecosystem in the Caribbean. *Proceedings of the 67th Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, 67: 197-200.
- Fahn, S. (2003). Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 991(1): 1-14. doi: 10.1016/j.algal.2021.102264
- Fang, J., Xu, X., Chen, Q., Lin, A., Lin, S., Lei, W., Zhong, C., Huang, Y. y He, Y. (2022). The complete mitochondrial genome of *Isochrysis galbana* harbors a unique repeat structure and a specific trans-spliced *cox1* gene. *Frontiers in Microbiology*, 13: 966219. doi: 10.3389/fmicb.2022.966219
- Fernández, A., Grienke, U., Soler-vila, A., Guihéneuf, F., Stengel, D. B. y Tasdemir, D. (2015). Seasonal and geographical variations in the biochemical composition of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) from Ireland. *Food Chemistry*, 177: 43–52. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.12.062
- Gallego, R., Valdés, A., Sánchez-Martínez, J., Suárez-Montenegro, Z., Ibáñez, E., Cifuentes, A. y Herrero, M. (2022a). Study of the potential neuroprotective effect of *Dunaliella salina* extract in SH-SY5Y cell model. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414: 5357-5371. doi: 10.1007/s00216-021-03819-1
- Gallego, R., Valdés, A., Suarez-Montenegro, Z., Sanchez-Martínez, J., Cifuentes, A., Ibáñez, E. y Herrero, M. (2022b). Anti-inflammatory and neuroprotective evaluation of diverse microalgae extracts enriched in carotenoids. *Algal Research*, 67: 102830. doi: 10.1016/j.algal.2022.102830
- Gandhi, S. y Abramov, A.Y. (2012). Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 428010. doi: 10.1155/2012/428010
- Gao, F., Nan, F., Feng, J., Lv, J., Liu, Q., Liu, X. y Xie, S. (2022). Comparative morphological, physiological, biochemical and genomic studies reveal novel genes of *Dunaliella bioculata* and *D. quartolecta* in response to salt stress. *Molecular Biology Reports*, 49(3): 1749-1761. doi: 10.1007/s11033-021-06984-9
- Gao, H.M. y Hong, J.S. (2008). Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression, *Trends in Immunology*, 29 (8): 357–365. doi: /10.1016/j.it.2008.05.002
- Geitler, L. (1930). Ein grünes Filarplasmodium und andere neue Protisten. *Archiv für Protistenkunde*, 69: 614-636.
- Ghaliaoui, N., Hazzit, M. y Mokrane, H. (2024). Seaweeds as a potential source of bioactive compounds. *Research in Biotechnology and Environmental Science*, 3 (1): 1-8. doi: 10.58803/rbes.v3i1.19
- Gilmour, D.J. (2023). Diversity of algae and their biotechnological potential. *Advances in Microbial Physiology*, 82: 301-321. doi: 10.1016/bs.ampbs.2023.02.001
- Golbe, L.I., Mark, M.H. y Sage, J.I. (2009). *Parkinson's disease handbook*. American Parkinson Disease Association. pp. 44.

- Gómez, F. y Artigas, L. F. (2019). Redefinition of the dinoflagellate genus *Alexandrium* based on *Centrodinium*: Reinstatement of *Gessnerium* and *Protogonyaulax*, and *Episemicolon* gen. Nov (Gonyaulacales, Dinophyceae). *Journal of Marine Biology*, 1-17. doi: 10.1155/2019/1284104
- Gong, M. y Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*, 34(8): 1396-1412. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.10.005
- Gower, J. y King, S.A. (2011). Distribution of floating *Sargassum* in the Caribbean region. *Proceedings of the 64th Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, 64: 213-216. doi: 10.1080/01431161003639660
- Gradinaru, D., Minn, A.L., Artur, Y., Minn, A. y Heydel, J.M. (2012). Effect of oxidative stress on UDP-glucuronosyltransferases in rat astrocytes. *Toxicology Letters*, 213(3): 316-324. doi: 10.1016/j.toxlet.2012.07.014
- Guedes, A.C., Amaro, H.M. y Malcata, F.X. (2011). Microalgae as sources of carotenoids. *Marine Drugs*, 9(4): 625-644. doi: 10.3390/md9040625
- Guillard, R.R.L. y Ryther, J.H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms: i. *Cyclotella nana hustedt*, and *Detonula confervacea* (cleve) gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2): 229-239. doi: 10.1139/m62-029
- Guillard, R.R.L., Bold, H.C. y MacEntee, F.J. (1975). Four new unicellular chlorophycean algae from mixohaline habitats. *Phycologia*, 14: 13-24. doi: doi.org/10.2216/i0031-8884-14-1-13.1
- Guiry, M.D. (2012). How many species of microalgae are there? *Journal of Phycology*, 48: 1057–1063. doi: 10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x
- Guiry, M.D. y Guiry, G.M. (2014). *Isochrysis galbana*. En AlgaeBase. Disponible en: <https://www.algaebase.org> (consulta: 30 de mayo de 2024).
- Guiry, M.D. y Guiry, G.M. (2018a). *Sargassum horridum*. En AlgaeBase. Disponible en: <https://www.algaebase.org> (consulta: 30 de mayo de 2024).
- Guiry, M.D. y Guiry, G.M. (2018b). *Spyridia*. En AlgaeBase. Disponible en: <https://www.algaebase.org> (consulta: 30 de mayo de 2024).
- Guiry, M.D. y Guiry, G.M. (2020a). *Chlorella capsulata*. En AlgaeBase. Disponible en: <https://www.algaebase.org> (consulta: 29 de mayo de 2024).
- Guiry, M.D. y Guiry, G.M. (2020b). *Rhodosorus marinus*. En AlgaeBase. Disponible en: <https://www.algaebase.org> (consulta: 29 de mayo de 2024).
- Guiry, M.D. y Guiry, G.M. (2022a). *Chaetoceros calcitrans*. En AlgaeBase. Disponible en: <https://www.algaebase.org> (consulta: 30 de mayo de 2024).
- Guiry, M.D. y Guiry, G.M. (2022b). *Porphyridium cruentum*. En AlgaeBase. Disponible en: <https://www.algaebase.org> (consulta: 29 de mayo de 2024).
- Guiry, M.D. y Guiry, G.M. (2024a). *Alexandrium margalefii*. En AlgaeBase. Disponible en: <https://www.algaebase.org> (consulta: 30 de mayo de 2024).
- Guiry, M.D. y Guiry, G.M. (2024b). *Ulva lactuca*. En AlgaeBase. Disponible en: <https://www.algaebase.org> (consulta: 30 de mayo de 2024).
- Gulcin, I. y Alwasel, S.H. (2023). DPPH radical scavenging assay. *Processes*, 11(8): 2248. doi: 10.3390/pr11082248

- Habib, M., Jan, K. y Bashir, K. (2022). Extraction and characterization of bioactive compounds from different sources. In: *Bioactive components: A sustainable system for good health and well-being*. Springer Nature, Singapore, pp.121-141.
- Hallegraeff, G.M., Nichols, P.D., Volkman, J.K., Blackburn, S.I. y Everitt, D.A. (1991). Pigments, fatty acids, and sterols of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium Catenatum*. *Journal of Phycology*, 27: 591-599. doi: 10.1111/j.0022-3646.1991.00591.x
- Harvey, W.H. (1833). Div. I. Inarticulatae. Div. II. Confervoideae; Div. III. Gloiocladeae. In: *The English Flora of Sir James Edward Smith. Class XXIV. Cryptogamia. Vol. V. (or Vol. II of Dr. Hooker's British flora). Part I. Comprising the Mosses, Hepaticae, Lichens, Characeae and Algae.* (Hooker, W.J. Eds), pp. 259-262, 264-401. London: Longman, Brown, Green & Longmans Paternoster-Row.
- Hermund, D., Plaza, M., Turner, C., Jónsdóttir, R., Kristinsson, H., Jacobsen, C. y Nielsen, K. (2018). Structure dependent antioxidant capacity of phlorotannins from Icelandic *Fucus vesiculosus* by UHPLC-DAD-ECD-QTOFMS. *Food Chemistry*, 240: 904-909. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.08.032
- Hernández, R., Fernández, J.A., Rancaño, I. y Cueto, A. (2001). Calidad de vida y enfermedades neurológicas. *Neurología*, 16(1): 30-37.
- Hernandez-Baltazar, D., Zavala-Flores, D.M. y Villanueva-Olivo, A. (2017). El modelo de 6-hidroxdopamina y la fisiopatología parkinsoniana: nuevos hallazgos en un viejo modelo. *Neurología*, 32(8): 533-539. doi: 10.1016/j.nrl.2015.06.011
- Huang, C., Zhang, Z. y Cui, W. (2019). Marine-derived natural compounds for the treatment of Parkinson's disease. *Marine Drugs*, 17(4): 221. doi: 10.3390/md17040221
- Huang, C.Y., Kuo, C.H. y Chen, P.W. (2017). Compressional-puffing pretreatment enhances neuroprotective effects of fucoindans from the brown seaweed *Sargassum hemiphyllum* on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Molecules*, 23(1): 78. doi: 10.3390/molecules23010078
- Hurd, C.L., Harrison, P.J., Bischof, K. y Lobban, C.S. (2014). *Seaweed ecology and physiology*. 2th. Ed. Cambridge University Press. 551 pp.
- Hurd, C.L., Hepburn, C.D., Currie, K.I., Raven, J.A. y Hunter, K.A. (2009) Testing the effects of ocean acidification on algal metabolism: considerations for experimental designs. *Journal of Phycology*, 45: 1236-1251. doi: 10.1111/j.1529-8817.2009.00768.x
- Hussain, R., Zubair, H., Pursell, S. y Shahab, M. (2018). Neurodegenerative diseases: regenerative mechanisms and novel therapeutic approaches. *Brain Sciences*, 8(9): 177. doi: 10.3390/brainsci8090177
- Hwang, O. (2013). Role of oxidative stress in parkinson's disease. *Experimental Neurobiology*, 22: 11-17. doi:10.5607/en.2013.22.1.11.
- Iglesias, M.J., Soengas, R., Probert, I., Guilloud, E., Gourvil, P., Mehiri, M., López, Y., Cepas, V., Gutiérrez-del-Río, I., Redondo-Blanco, S., Villar, C., Lombó, F., Soto, S. y López, F. (2019). NMR characterization and evaluation of antibacterial and antiobiofilm activity of organic extracts from stationary phase batch cultures of five five marine microalgae (*Dunaliella sp.*, *D. salina*, *Chaetoceros calcitrans*, *C. gracilis* and *Tisochrysis lutea*). *Phytochemistry*, 164: 192-205. doi: 10.1016/j.phytochem.2019.05.001

- Instituto Nacional de las Personas Adultas Mayores (INAPAM). (2019). Parkinson, segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente en personas mayores de 50 años. En: Gobierno de México. Disponible en: <https://www.gob.mx/inapam/es/articulos/parkinson-segunda-enfermedad-neurodegenerativa-mas-frecuente-en-personas-mayores-de-50-anos?idiom=es> (consulta: 29 de mayo de 2024).
- Irato, P. y Santovito, G. (2021). Enzymatic and non-enzymatic molecules with antioxidant function. *Antioxidants*, 10(4): 579. doi: 10.3390/ANTIOX10040579
- Jeong, S.E., Jeon, S.H., Chun, B.H., Kim, D.W. y Jeon, C.O. (2017). *Marinicauda algicola* sp. nov., isolated from a marine red alga *Rhodorus marinus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(9): 3423-3427. doi: 10.1099/IJSEM.0.002129
- Johnson, Q.R., Mostofian, B., Gomez, G.F., Smith, J.C. y Cheng, X. (2018). Effects of carotenoids on lipid bilayers. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20(5): 3795-3804. doi: 10.1039/C7CP07126D
- Jónasdóttir, S.H. (2019). Fatty acid profiles and production in marine phytoplankton. *Marine Drugs*, 17(3): 151. doi: 10.3390/MD17030151
- Juárez-Olguín, H., Calderón Guzmán, D., Hernández García, E. y Barragán Mejía, G. (2016). The role of dopamine and its dysfunction as a consequence of oxidative stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 1: 9730467. doi: 10.1155/2016/9730467
- Kalashnikova, E.E. y Kirakosyan, R.N. (2022). The creation of the photobioreactor for the effective *Chlorella* growth and study of the light spectral composition influence on its biomass. *E3S Web of Conferences*, 376: 02026-02026. doi: 10.1051/e3sconf/202337602026
- Keil, L., Breitsameter, J., Rieger, B., Garbe, D. y Brueck, T. (2023). Optimization of the glycerol production from *Dunaliella tertiolecta* and *Dunaliella* isolates. *bioRxiv*, 09. doi: /10.1101/2023.09.18.558238
- Keil, L., Qoura, F.M., Breitsameter, J.M., Rieger, B., Garbe, D. y Brück, T.B. (2024). Evaluation of chemical and physical triggers for enhanced photosynthetic glycerol production in different *Dunaliella* Isolates. *Microorganisms*, 12(7): 1318. doi: 10.3390/microorganisms12071318
- Khan, M.I., Shin, J.H. y Kim, J.D. (2018). The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed and other products. *Microbial Cell Factories*, 17: 1-21. doi 10.1186/s12934-018-0879-x
- Kich, D.M., Bitencourt, S., Alves, C., Silva, J., Pinteus, S., Pedrosa, R., Pedrosa, R., Laufer, S., de Souza, C.F.V. y Goettert, M.I. (2016). Neuromodulatory effects of *Calypttranthes grandifolia* extracts against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84: 382-86. doi: 10.1016/j.biopha.2016.09.063
- Kim, E.S., Li, Z., Oh, S.J., Yoon, Y.H. y Shin, H.H. (2017). Morphological identification of *Alexandrium* species (Dinophyceae) from Jinhae-Masan Bay, Korea. *Ocean Science Journal*, 52: 427-437. doi: 10.1007/s12601-017-0031-6
- Kobayashi, Y. y Morita, M. (2019). Strategies for the synthesis of anti-inflammatory metabolites of unsaturated fatty acids. In: *Cutting-edge organic synthesis and chemical biology of bioactive molecules: The shape of organic synthesis to come*. Springer, Singapore, pp. 193-231. doi: 10.1007/978-981-13-6244-6\_9

- Koçancı, F.G. (2024). Effects of collagen coating, fetal bovine serum concentration, differentiation agents, and neurotoxin application on *in vitro* modeling of parkinson's disease using SH-SY5Y cell culture. *Acta Medica Alanya*, 8(2): 105-109. doi: 10.30565/medalanya.1459470
- Krayesky-Self, S., Phung, D., Schmidt, W. y Sauvage, T., Butler, L. y Fredericq, S. (2020). First report of endolithic members of *Rhodorus marinus* (Stylonematales, Rhodophyta) growing inside rhodoliths offshore Louisiana, Northwestern Gulf of Mexico. *Frontiers in Marine Science*, 7: 7. doi: 10.3389/fmars.2020.00007.
- Kutako, M., Hiransuchalert, R., Watchasit, S., Kaewduang, M., Hanchana, O., Setthamongkol, P., Chiindudsadeegul, P., Gunbua, V. y Jaritkhuan, S. (2023). Morphological and molecular comparison as a useful tool for identification of the three centric marine diatoms (Bacillariophyceae: Chaetoceros). *Archives of Microbiology*, 205 (5): 173. doi: 10.1007/s00203-023-03525-9
- Landers, M.R., Kinney, J.W. y Van Breukelen, F. (2014). Forced exercise before or after induction of 6-OHDA-mediated nigrostriatal insult does not mitigate behavioral asymmetry in a hemiparkinsonian rat model. *Brain Research*, 1543: 263-270. doi: 10.1016/j.brainres.2013.10.054
- Leibniz Institute DSMZ. (s.f.). SH-SY5Y (ACC 209). Disponible en: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-209>. (consulta: 26 de noviembre de 2024).
- Leigh, S. (2020). An introduction to the history of infectious diseases, epidemics and the early phases of the long-run decline in mortality. *The Economic History Review*, 73(3): E1-E19. doi: 10.1111/EHR.13019
- Levy, O.A., Malagelada, C. y Greene, L.A. (2009). Cell death pathways in Parkinson's disease: Proximal triggers, distal effectors, and final steps. *Apoptosis*, 14: 478-500. doi:10.1007/s10495-008-0309-3
- Liberti, D., Imbimbo, P., Giustino, E., D'Elia, L., Ferraro, G., Casillo, A., Illiano, A., Pinto, G., Di-Meo, M.C., Álvarez-Rivera, G., Corsaro, M.M., Amoresano, A., Zarrelli, A., Ibáñez, E., Merlino, A. y Monti, D.M. (2022). Inside out *Porphyridium cruentum*: Beyond the conventional biorefinery concept. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 11(1): 381-389. doi: 10.1021/acssuschemeng.2c05869
- Liberti, D., Imbimbo, P., Giustino, E., D'Elia, L., Silva, M., Barreira, L. y Monti, D.M. (2023). Shedding light on the hidden benefit of *Porphyridium cruentum* culture. *Antioxidants*, 12(2): 337. doi: 10.3390/antiox12020337
- Limón-Pacheco, J. y Gonsebatt, M.E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1-2): 137-147. doi: 10.1016/J.MRGENTOX.2008.09.015
- Linnaeus, C. (1753). Species plantarum, exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas. Vol. 2. pp. [i], 561-1200.
- Lizzul, A., Lekuona-Amundarain, A., Purton, S. y Campos, L. (2018). Characterization of *Chlorella sorokiniana*, UTEX 1230. *Biology*, 7(2): 25. doi: 10.3390/biology7020025

- Lora-Vilchis, M.C. (2022). Colección de microalgas. In: List. cepas autóctonas. Disponible en: <https://www.cibnor.gob.mx/investigacion/colecciones-biologicas/coleccion-de-microalgas/microalgas-listas-de-cepas>. (consulta: 28 octubre 2022)
- Lorenzo, K., Santocildes, G., Torrella, J.R., Magalhães, J., Pagès, T., Viscor, G., Torres, J.L. y Ramos-Romero, S. (2023). Bioactivity of macronutrients from *Chlorella* in physical exercise. *Nutrients*, 15(9): 2168. doi: 10.3390/nu15092168.
- Lortou, U., Panou, M., Papapanagiotou, G., Florokapi, G., Giannakopoulos, C., Kavoukis, S., Iakovou, G., Zalidis, G., Triantafyllidis, K. y Gkelis, S. (2023). Beneath the aegean sun: investigating *Dunaliella* strains. Diversity from Greek Saltworks. *Water*, 15: 1037. doi: 10.3390/w15061037
- Lotharius, J., Dugan, L.L. y O'Malley, K.L. (1999). Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *Journal of Neuroscience*, 19(4): 1284-1293. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-04-01284.1999
- Magalingam K.B., Somanath S.D., Ramdas P., Haleagrahara N. y Radhakrishnan, A. K. (2022). 6-Hydroxydopamine induces neurodegeneration in terminally differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells via enrichment of the nucleosomal degradation pathway: a global proteomics approach. *Journal of Molecular Neuroscience*, 72(5): 1026-1046. doi: 10.1007/s12031-021-01962-z
- Majhi, P., Mohanty, M.K. y Samantaray, S.M. (2022). Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids from microalgae for nutraceuticals. In *Advances in Agricultural and Industrial Microbiology: Volume 1: Microbial Diversity and Application in Agroindustry* (pp. 205-216). Singapore: Springer Nature Singapore. doi: 10.1007/978-981-16-8918-5\_11
- Mansour, M.P., Volkman, J.K., Jackson, A.E. y Blackburn, S.I. (1999). The fatty acid and sterol composition of five marine dinoflagellates. *Journal of Phycology*, 35(4): 710-720. doi: 10.1046/j.1529-8817.1999.3540710.x
- Marín-López, A.G., Murguía-Castillo, J., Macías-Vélez, R.J. y Rivera-Cervantes, M.C. (2022). Neurodegeneración aguda y crónica un continuo en el establecimiento de los desórdenes neurodegenerativos. *E-Cucba* 10(19): 175-182. doi: 10.32870/ecucba.vi19.277
- Martins, F., Lopes de Castro, T.C., Saad, S.T., Trevisane, R., Moreira, R.P., Taninaga, E., Queiroz, M. y Okuda-Torello, C. (2022). *Chlorella* improves inflammatory profiles and quality of life of prediabetes and diabetes patients. *Fundamental Toxicological Sciences*, 10(2): 31-44. doi: 10.2131/fts.10.31
- Matin, M., Koszarska, M., Atanasov, A.G., Król-Szmajda, K., Jóźwik, A., Stelmasiak, A. Y Hejna, M. (2024). Bioactive potential of algae and algae-derived compounds: focus on anti-inflammatory, antimicrobial, and antioxidant effects. *Molecules*, 29(19): 4695. doi: 10.3390/molecules29194695
- Matuz-Mares, D., González-Andrade, M., Araiza-Villanueva, M.G., Vilchis-Landeros, M.M. y Vázquez-Meza, H. (2022). Mitochondrial calcium: effects of its imbalance in disease. *Antioxidants*, 11(5): 801. doi: 10.3390/antiox11050801
- Maznah, W.O. y Hamza, A.Z. (2024). Potential of marine microalgae for the production of food and feed industry. *Marine Biomass: Biorefinery, Bioproducts and Environmental Bioremediation*, 249-277. doi: 10.1515/9783111353951-011

- Mero, A. y Conti, F. (2023). Algal biotechnology: properties of bioactive derivatives and pharmaceutical applications. *Biotechnologies, Bioresources*, 82-82. doi: 10.7250/conect.2023.060
- Mhyre, T.R., Boyd, J.T., Hamill, R.W. y Maguire-Zeiss, K.A. (2015). Parkinson's disease. *Subcell Biochemistry*, 389-455. doi:10.1007/978-94-007-5416-4\_16.
- Mishra, P., Gupta, N., Singh, M. y Tiwari, D. (2023). Bioactive compounds synthesized by algae: current development and prospects as biomedical application in the pharmaceutical industry. Next-Generation Algae: Volume II: *Applications in Medicine and the Pharmaceutical Industry*, 41-75. doi: 10.1002/9781119857860.ch2
- Mohamed, A.A., y Mohd, S.Z.N. (2024). Unraveling mitochondrial dysfunction: comprehensive perspectives on its impact on neurodegenerative diseases. *Reviews in the Neurosciences*. doi: 10.1515/revneuro-2024-0080
- Mohanty, J.G., Jaffe, J.S., Schulman, E.S. y Raible, D.G. (1997). A highly sensitive fluorescent micro-assay of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *Journal of Immunological Methods*, 202(2): 133-141. doi: 10.1016/S0022-1759(96)00244-X
- Mohd, N.S. y Sirajudeen, K.N.S. (2020). Natural products and their bioactive compounds: neuroprotective potential against neurodegenerative diseases. *Hindawi*, 30 pp. doi: 10.1155/2020/6565396.
- Molinari E.A. (2024). *Dunaliella tertiolecta*. En AlgaeBase, en Guiry, M.D. y Guiry, G.M. Disponible en: <https://www.algaebase.org> (consulta: 29 de mayo de 2024)
- Morquecho-Escamilla, L. y Reyes-Salinas, A. (2022). Colección de Dinoflagelados Marinos. In: Colección Dinoflagelados Mar. Disponible en: <http://www.cibnor.mx/investigacion/colecciones-biologicas/codimar>
- Morquecho-Escamilla, L., Reyes-salinas, A. y Okolodkov, Y. (2016). Guía taxonómica ilustrada de la Colección de Dinoflagelados (CODIMAR). 1 ed. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz. 143 p.
- Mukherjee, T.K. (2023). Culture of continuous cell lines. In *Practical Approach to Mammalian Cell and Organ Culture*. Springer Nature, Singapore, pp. 527-587. doi: 10.1007/978-981-19-1731-8\_11-1
- Nägeli, C. (1849). Gattungen einzelliger Algen, physiologisch und systematisch bearbeitet. Neue Denkschriften der Allg. *Schweizerischen Gesellschaft für die Gesamten Naturwissenschaften*, 10(7): 1-139. doi: 10.5962/bhl.title.6805
- Nef, C., Madoui, M. A., Pelletier, É. y Bowler, C. (2022). Whole-genome scanning reveals selection mechanisms in epipelagic *Chaetoceros* diatom populations. *bioRxiv*, 5. doi: 10.1371/journal.pbio.3001893
- Neves, M., Antunes, M., Fernandes, W., Campos, M.J., Azevedo, Z.M., Freitas, V., Rocha, J.M. y Tecelão, C. (2021). Physicochemical and nutritional profile of leaves, flowers, and fruits of the edible halophyte chorão-da-praia (*Carpobrotus edulis*) on Portuguese West shores. *Food Bioscience*, 43: 101288. doi: 10.1016/j.fbio.2021.101288
- Niedzielska, E., Smaga, I., Gawlik, M., Moniczewski, A., Stankowicz, P., Pera, J. y Filip, M. (2016). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Molecular Neurobiology*, 53: 4094-4125. doi: 10.1007/s12035-015-9337-5

- Nishikimi, M., Rao, N.A. y Yagi, K. (1972). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46(2): 849-854. doi: 10.1016/S0006-291X(72)80218-3.
- Nishit, P., Kumar-Vimal, S., Tandon, I., Agrawal, L., Hongyi, C. y Bhattacharyya, S. (2021). Neurodegenerative disorders of Alzheimer, Parkinsonism, Amyotrophic lateral sclerosis and Multiple sclerosis: an early diagnostic approach for precision treatment. *Metabolic Brain Disease*, 37: 67-104. doi: 10.1007/S11011-021-00800-W
- Novosadova, E.V., Arsenyeva, E.L., Antonov, S.A., Vanyushina, Y.N., Malova, T.V., Komissarov, A.A., Sergey, N.I., Khaspekov, L.G., Andreeva, L.A., Vyacheslav, Z.T. y Grivennikov, I.A. (2019). The use of human induced pluripotent stem cells for testing neuroprotective activity of pharmacological compounds. *Biochemistry (Moscow)*, 84: 1296-1305. doi: 10.1134/S0006297919110075
- O'Brien, M.A. y Kirby, R. (2008). Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency Critical Care*, 18(6): 572–585. doi: 10.1111/j.1476-4431.2008.00363.x.
- Ogunro, O.B., Fakayode, A.E. y Batiha, G.E.S. (2022). Involvement of antioxidant in the prevention of cellular damage. In *Importance of Oxidative Stress and Antioxidant System in Health and Disease*. doi: 10.5772/intechopen.108732
- Okouchi, M., Ekshyyan, O., Maracine, M. y Aw, T.J. (2007). Neuronal apoptosis in neurodegeneration. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(8): 1059–1096. doi: 10.1089/ars.2007.1511
- Oppedisano, F., Macri, R., Gliozzi, M., Musolino, V., Carresi, C., Maiuolo, J., Bosco, F., Nucera, S., Zito, M.C., Guarnieri, L., Scarano, F., Nicita, C., Coppoletta, A.R., Ruga, S., Scicchitano, M., Mollace, R., Palma, E. y Mollace, V. (2020). The anti-inflammatory and antioxidant properties of n-3 PUFAs: Their role in cardiovascular protection. *Biomedicines*, 8(9): 306. doi: 10.3390/biomedicines8090306
- Oppedisano, F., Maiuolo, J., Gliozzi, M., Musolino, V., Carresi, C., Nucera, S., Scicchitano, M., Scarano, F., Bosco, F., Macri, R., Ruga, S., Zito, M.C., Palma, E., Muscoli, C. y Mollace, V. (2020). The potential for natural antioxidant supplementation in the early stages of neurodegenerative disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7): 2618. doi: 10.3390/ijms21072618
- Ouahabi, S., Daoudi, N. E., Loukili, E. H., Asmae, H., Merzouki, M., Bnouham, M., Dépeint, F., Gotor, A., Rhazi, L., Faconnier, M. y Ramdani, M. (2024). Investigation into the phytochemical composition, antioxidant properties, and *in vitro* anti-diabetic efficacy of *Ulva lactuca* Extracts. *Marine drugs*, 22(6): 240. doi: 10.3390/md22060240
- Ouazia, D., Levros, L.C., Rassart, É. y Desrosiers, R.R. (2014). Dopamine down-regulation of protein L-isoaspartyl methyltransferase is dependent on reactive oxygen species in SH-SY5Y cells. *Neuroscience*, 267: 263-276. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.03.001.
- Palaniswamy, K.S., Vishwanadha, V.P. y Singaravelu, S.R. (2014). Fish oil rich in eicosapentaenoic acid protects against oxidative stress-related renal dysfunction induced by TCDD in Wistar rats. *Cell Stress and Chaperones*, 19(3): 409-419. doi: 10.1007/S12192-013-0470-7
- Parke, M. (1949). Studies on marine flagellates. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 28: 255-288. doi: 10.1017/S0025315400055302
- Patel, M.K., Das, S. y Thakur, J.K. (2018). GC-MS-based analysis of methanol: chloroform-extracted fatty acids from plant tissues. *Bio-protocol*, 8(18). doi: 10.21769/BIOPROTOCOL.3014

- Pinteus, S., Silva, J., Alves, C., Horta, A., Fino, N., Rodrigues, A.I., Mendes, S. y Pedrosa, R. (2017). Cytoprotective effect of seaweeds with high antioxidant activity from the Peniche coast (Portugal). *Food Chemistry*, 218: 591–599. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.067
- Pniewski, F. (2020). HPLC separation of cyanobacterial and algal photosynthetic pigments. *Biología*, 75(2): 223-233. doi: 10.2478/S11756-019-00407-8
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C., Halliday, G., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A.E. y Lang, A.E. (2017). Parkinson's disease. *Nature reviews Disease Primers*, 3: 1–21. doi: 10.1038/nrdp.2017.13
- Porter, C.C., Totaro, J.A. y Burcin, A. (1965). The relationship between radioactivity and norepinephrine concentrations in the brains and hearts of mice following administration of labelled methyl dopa or 6-hydroxydopamine (6-OHDA). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 150: 17–22
- Porter, C.C., Totaro, J.A. y Stone, C.A. (1963). Effect of 6-hydroxydopamine and some other compounds on the concentration of norepinephrine in the hearts of mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 140(3): 308-316.
- Przedborski S., Vila M. y Jackson-Lewis A. (2003). Series introduction: neurodegeneration: what is it and where are we? *Journal of Clinical Investigation*, 111(1): 3–10. doi: 10.1172/JCI17522
- Qiao, M., Guo, J., Wang, R., Chen, C., Li, J. y Lyu, J. (2023). Research progress on population aging and chronic diseases. *MEDS Public Health and Preventive Medicine*, 3: 28-35. doi: 10.23977/phpm.2023.030105.
- Qiu, H., Liu, R. y Long, L. (2019). Analysis of chemical composition of extractives by acetone and the chromatic aberration of teak (*Tectona grandis* L.F.) from China. *Molecules*, 24: 1989. doi: 10.3390/molecules24101989
- Raposo, M.F., Morais, A.M.M. y Morais, R.M. (2015). Carotenoids from marine microalgae: A valuable natural source for the prevention of chronic diseases. *Marine Drugs*, 13(8): 5128-5155. doi: 10.3390/md13085128
- Rincón-Cervera, M.Á., Valenzuela-Báez, R., Hernández-Rodas, M. C., Barrera-Ramírez, C., Espinosa, A., Marambio, M. y Valenzuela Bonomo, C. (2016). Vegetable oils rich in alpha linolenic acid increment the patien-3 LCPUFA, modulating the fatty acid metabolism and antioxidant response in rats. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 111: 25-35. doi: 10.1016/j.plefa.2016.02.002
- Rodríguez-Zuñiga D., Méndez-Zavala A., Solís-Quiroz O., Montañez J. C., Morales-Oyervides L., y Benavente-Valdés J.R. (2023). Microalgae as cell factories for biofuel and bioenergetic precursor molecules. *Plants as Bioreactors for Industrial Molecules*, 299-316. doi: 10.1002/9781119875116.ch12
- Ronga, D., Biazzi, E., Parati, K., Carminati, D., Carminati, E. y Tava, A. (2019). Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions. *Agronomy*, 9(4): 192. doi: 10.3390/agronomy9040192
- Rosenstock, T.R., Sun, C., Hughes, G. W., Winter, K. y Sarkar, S. (2022). Analysis of mitochondrial dysfunction by microplate reader in hiPSC-derived neuronal cell models of neurodegenerative disorders. *Induced Pluripotent Stem Cells and Human Disease: Methods and Protocols*, 1-21. doi: 10.1007/7651\_2021\_451

- Rossi, A.J. y Machado, K.E. (2022). O potencial uso da microalga *Porphyridium cruentum* na prevenção do envelhecimento cutâneo/The potential use of the microalgae *Porphyridium cruentum* in the prevention of skin aging. *Revista de psicologia*, 16(61): 347-360. doi: 10.14295/online.v16i61.3482
- Ruiz-Domínguez, M. C., Rincón, B., de los Ángeles Martín, M., del Carmen Gutiérrez, M., Salinas, F., Medina, E. y Cerezal, P. (2022). Microalgae *Isochrysis galbana* biorefinery: Obtaining fucoxanthin and biogas after supercritical fluid extraction. *Journal of Applied Phycology*, 34(4): 1997-2014. doi: 10.1007/s10811-022-02768-1
- Rynkowska, A., Stępnia, J. y Karbownik-Lewińska, M. (2020). Fenton reaction-induced oxidative damage to membrane lipids and protective effects of 17 $\beta$ -estradiol in porcine ovary and thyroid homogenates. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(18): 6841. doi: 10.3390/IJERPH17186841
- Safitri, D., Yuliani, D., Aldi, M. F., Julfika, T., Larasati, C. E., Rahman, I. y Jefri, E. (2024). Antioxidant and anti-inflammatory potential of *Sargassum sp* extract in lotion preparations. *Jurnal Biologi Tropis*, 24(2): 44-50. doi: 10.29303/jbt.v24i2.6660
- Sakai, C., Ishida, M., Ohba, H., Yamashita, H., Uchida, H., Yoshizumi, M. y Ishida, T. (2017). Fish oil omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate oxidative stress-induced DNA damage in vascular endothelial cells. *PloS one*, 12(11): e0187934. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0187934
- Salim, D., Al-Alam, J., Merah, O., Chbani, A. y de Caro, P. (2023). Extracts of *Ulva lactuca* Induce Responses against *Penicillium digitatum* on Oranges. *Phycology*, 3(1): 202-210.
- Sanchez-Arcos, C., Paris, D., Mazzella, V., Mutalipassi, M., Costantini, M., Buia, M.C., von Elert, E., Cutignano, A. y Zupo, V. (2022). Responses of the macroalga *Ulva prolifera* müller to ocean acidification revealed by complementary NMR- and MS-based omics approaches. *Marine Drugs*, 20: 743. doi: 10.3390/md20120743
- Sanghai, N., y Tranmer, G.K. (2023). Biochemical and molecular pathways in neurodegenerative diseases: an integrated view. *Cells*, 12(18): 2318. doi: 10.3390/cells12182318
- Santoro, I., Russo, A., Perri, E., Sindona, G., y Nardi, M. (2022). Lipid peroxidation in algae oil: Antagonist effects of natural antioxidants. *Molecules*, 27(14): 4453. doi: 10.3390/molecules27144453
- Senoh, S. y Witkop, B. (1959a). Formation and rearrangements of aminochromes from a new metabolite of dopamine and some of its derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, 81: 6231–6235. doi: 10.1021/ja01532a029
- Senoh, S. y Witkop, B. (1959b). Nonenzymatic conversions of dopamine to norepinephrine and trihydroxyphenethylamine. *Journal of the American Chemical Society*, 81: 6222–6231. doi: 10.1021/ja01532a028
- Senoh, S., Creveling, C.R., Udenfriend, S. y Witkop, B. (1959). Chemical, enzymatic and metabolic studies on the mechanism of oxidation of dopamine. *Journal of the American Chemical Society*, 81: 6236–6240. doi: 10.1021/ja01532a030
- Setchell, W.A. y Gardner, N.L. (1924). XXIX Expedition of the California academy of sciences to the Gulf of California in 1921. *The marine algae. Proceedings of the California Academy of Science, Fourth Series*, 12(29): 695-949.

- Seth, J., Sharma, S., Leong, C.J. y Rabkin, S.W. (2024). Eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) ameliorate heart failure through reductions in oxidative stress: A systematic review and meta-analysis. *Antioxidants*, 13(8): 955. doi: 10.3390/antiox13080955
- Shapovalova, V.T., Evstigneyev, V., Gadzhi, A. y Lantushenko, O. (2022). Comparative study on morphometrics of microalgae of the genus *Dunaliella* from hypersalted lakes of crimea. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 7(4): 662-665. doi: 10.29039/rusjbp.2022.0579
- Silva, J., Alves, C., Freitas, R., Martins, A., Pinteus, S., Ribeiro, J., Gaspar, H., Alfonso, A. y Pedrosa, R. (2019). Antioxidant and neuroprotective potential of the brown seaweed *Bifurcata bifurcata* in an *in vitro* Parkinson's disease model. *Marine Drugs*, 17 (2): 85. doi: 10.3390/md17020085
- Silva, J., Alves, C., Martins, A., Susano, P., Simões, M., Guedes, M., Rehfeldt, S., Pinteus, S., Gaspar, H., Rodrigues, A., Goetter, M.I., Alfonso, A. y Pedrosa, R. (2021a). Loliolide, a new therapeutic option for neurological diseases? *In vitro* neuroprotective and anti-inflammatory activities of a monoterpenoid lactone isolated from *Codium tomentosum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4): 1888. doi: 10.3390/ijms22041888
- Silva, J., Alves, C., Pinteus, S., Mendes, S. y Pedrosa, R. (2018). Neuroprotective effects of seaweeds against 6-hydroxidopamine-induced cell death on an *in vitro* human neuroblastoma model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18: 1-10. doi: 10.1186/s12906-018-2103-2
- Silva, J., Alves, C., Pinteus, S., Susano, P., Simoes, M., Guedes, M., Martins, A., Rehfeldt, S., Gaspar, Goetter, H., Alfonso, M. y Pedrosa, R. (2021b). Disclosing the potential of eleganolone for Parkinson's disease therapeutics: Neuroprotective and anti-inflammatory activities. *Pharmacological Research*, 168: 105589. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105589.
- Silva, J., Alves, C., Soledade, F., Martins, A., Pinteus, S., Gaspar, H., Alfonso, A. y Pedrosa, R. (2023). Marine-derived components: can they be a potential therapeutic approach to Parkinson's disease? *Marine Drugs*, 21(8): 451. doi: 10.3390/md21080451
- Silva, J., Martins, A., Alves, C., Pinteus, S., Gaspar, H., Alfonso, A. y Pedros, R. (2020). Natural approaches for neurological disorders—the neuroprotective potential of *Codium tomentosum*. *Molecules*, 25: 5478. doi: 10.3390/molecules25225478.
- Singh, J. y Saxena, R.C. (2015). An introduction to microalgae: diversity and significance. diversity and significance. *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*, 11-24. doi: 10.1016/B978-0-12-800776-1.00002-9
- Slanzi, A., Iannoto, G., Rossi, B., Zenaro, E. y Constantin, G. (2020). *In vitro* models of neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8: 328. doi: 10.3389/fcell.2020.00328
- So, J., Wu, D., Lichtenstein, A. y Lamon-Fava, S. (2019). Docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid supplementation differentially modulate pro-and anti-inflammatory cytokines in subjects with chronic inflammation (OR29-02-19). *Current Developments in Nutrition*, 3: nzz031-OR29. doi: 10.1093/CDN/NZZ031.OR29-02-19
- Sogos, V., Caria, P., Porcedda, C., Mostallino, R., Piras, F., Miliano, C., De Luca, M.A. y Castelli, M.P. (2021). Human neuronal cell lines as an *in vitro* toxicological tool for the evaluation of novel psychoactive substances. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13): 6785. doi: 10.3390/IJMS22136785

- Son, T.H. (2022). Bioactivity and toxicity evaluation of nutraceuticals using *in vitro* cell-based models: A review. *Vietnam Journal of Food Control*, 5(4): 553-574. doi: 10.47866/2615-9252/vjfc.4004
- Souza, R., Frota, A., Souza, R., Aguiar, L. y Benevides, N. (2014). Effects of a sulfated agaran from red seaweed *Gracilaria cornea* in 6-OHDA hemi-parkinsonian rats. *Blucher Neuroscience Proceedings*, 1(1): 35-35. doi: 10.5151/ISNM-SINE30.
- Souza, R.B., Frota, A.F., Silva, J., Alves, C., Neugebauer, A.Z., Pinteus, S., Rodrigues, J.A.G., Cordeiro, E.M.S., de Almeida, R.R., Pedrosa, R. y Benevides, N.M.B. (2018). *In vitro* activities of kappa-carrageenan isolated from red marine alga *Hypnea musciformis*: Antimicrobial, anticancer and neuroprotective potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 112: 1248-1256. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.029
- Stone, C.A., Stavorski, J.M., Ludden, C.T., Wengler, H.C., Ross, C.A., Totaro, J.A. y Porter, C.C. (1963). Comparison of the some pharmacological effects of certain 6-substituted dopamine derivatives with the reserpine guanethidine and metaraminol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 142(2): 147-156.
- Strope, T.A., Birky, C.J., y Wilkins, H.M. (2022). The role of bioenergetics in neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16): 9212. doi: 10.3390/ijms23169212
- Susanto, E., Fahmi, A. S., Hosokawa, M. y Miyashita, K. (2019). Variation in lipid components from 15 species of tropical and temperate seaweeds. *Marine Drugs*, 17(11): 630. doi: 10.3390/MD17110630
- Takakura, A.C., Moreira, T.S. y Falchetto, B. (2023). 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) rodent model of Parkinson's disease: Investigating neural control of cardiorespiratory function. *In Handbook of Animal Models in Neurological Disorders* (pp. 493-506). doi: 10.1016/b978-0-323-89833-1.00046-x
- Takano, H. (1968). On the diatom *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) emend. and its dwarf form pumilus forma nov. *Bulletin Tokai Regional Fisheries Research Laboratory*, 55: 1-7.
- Talero, E., García-Mauriño, S., Ávila-Román, J., Rodríguez-Luna, A., Alcaide, A. y Motilva, V. (2015). Bioactive compounds isolated from microalgae in chronic inflammation and cancer. *Marine Drugs*, 13(10): 6152-6209. doi: 10.3390/md13106152
- Tampieri, A., Szabó, M., Medina, F. y Gulyás, H. (2021). A brief introduction to the basics of NMR spectroscopy and selected examples of its applications to materials characterization. *Physical Sciences Reviews*, 6(1): 20190086. doi: 10.1515/PSR-2019-0086
- Thoré, E.S., Muylaert, K., Bertram, M.G., y Brodin, T. (2023). Microalgae. *Current Biology*, 33(3): R91-R95. doi: 10.1016/j.cub.2022.12.032
- Tiffany-Castiglioni, E., Saneto, R.P., Proctor, P.H. y Perez-Polo, J.R. (1982). Participation of active oxygen species in 6-hydroxydopamine toxicity to a human neuroblastoma cell line. *Biochemical Pharmacology*, 31(2): 181-188. doi: 10.1016/0006-2952(82)90208-8
- Tong J., Ruffi S. y Wong W.W.L. (2023). Measuring caspase activity using a fluorometric assay or flow cytometry. *Journal of Visualized Experiments*, 193. doi: 10.3791/64745
- Turrens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, 552(2): 335-344. doi: 10.1113/jphysiol.2003.049478

- Tyagi, U. y Sarma, A.K. (2024). Bioactive compounds from algae: extraction, purification, and applications. In *Value Added Products From Bioalgae Based Biorefineries: Opportunities and Challenges* (pp. 259-288). Singapore: Springer Nature Singapore. doi: 10.1007/978-981-97-1662-3\_12
- Ullah, I., Park, H.Y. y Kim, M.O. (2014). Anthocyanins protect against kainic acid-induced excitotoxicity and apoptosis via ROS-activated AMPK pathway in hippocampal neurons. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 20(4): 327-338. doi: 10.1111/cns.12218
- Usup, G., Hamid, S.Z., Chiet, P.K., Wah, C.K. y Ahmad, A. (2008). Marked differences in fatty acid profiles of some planktonic and benthic marine dinoflagellates from Malaysian waters. *Phycology*, 47(1): 105-111. doi: 10.2216/07-55.
- Wal, A., Wal, P., Vig, H., Samad, A., Khandai, M. y Tyagi, S. (2022). A systematic review of various *in vivo* screening models as well as the mechanisms involved in Parkinson's disease screening procedures. *Current Reviews in Clinical and Experimental Pharmacology*, 17. doi: 10.2174/2772432817666220707101550.
- Wang, C. y Youle, R.J. (2009). The role of mitochondria in apoptosis. *Annual review of genetics*, 43: 95-118. doi: 10.1146/annurev-genet-102108-134850
- Wang, N., Lv, J., Yang, F., Li, T., Wu, H., Li, C., Pei, H., Wu, H. y Xiang, W. (2020). Effects of seawater acidification and solar ultraviolet radiation on photosynthetic performances and biochemical compositions of *Rhodorus sp.* SCSIO-45730. *Frontiers in Marine Science*, 9. doi: 10.3389/fmars.2022.1092451
- Wijaya, D.C. y Linawati, N.M. (2024). The role of alpha linolenic acid on neuroinflammation: A systemic review. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA*, 10(7): 3597-3604. doi: 10.29303/jppipa.v10i7.6173
- Wójcik, P., Jastrzębski, M.K., Zięba, A., Matosiuk, D. y Kaczor, A.A. (2024). Caspases in Alzheimer's disease: mechanism of activation, role, and potential treatment. *Molecular Neurobiology*, 61(7): 4834-4853. doi: 10.1007/s12035-023-03847-1
- Won, B.Y., Frederic, S. y Cho, T.O. (2021). New insights into the phylogeny of *Spyridia* (Ceramiales, Rhodophyta) species with uncinata spines, focusing on the structure of determinate branches. *European Journal of Phycology*, 56(4): 389-402. doi: 10.1080/09670262.2020.1840634
- Wu, W., Han, H., Liu, J., Tang, M., Wu, X., Cao, X. y Chen, H. (2021). Fucoxanthin prevents 6-OHDA-induced neurotoxicity by targeting Keap1. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021(1): 6688708. doi: 10.1155/2021/6688708.
- Xi, Y., Noble, S. y Ekker, M. (2011). Modeling neurodegeneration in zebrafish. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 11: 274-282. doi: 10.1007/s11910-011-0182-2
- Yildiz-Unal, A., Korulu, S. y Karabay, A. (2015). Neuroprotective strategies against calpain-mediated neurodegeneration. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 11: 297-310. doi: 10.2147/NDT.S78226
- Yilmaz, M.B. y Dilek, M.U.Z. (2022). Apoptosis in cancer. *Turkish Journal of Veterinary Research*, 6(2): 85-95. doi: 10.47748/tjvr.1121211
- Yousef, Z.B., Elsaed, I.M. y Youssef, H. (2024). Two shades of marine life. *Medicine Updates*, 17(17): 24-36. doi: 10.21608/muj.2024.257638.1156

- Yu, S., Zou, Y., Ma, X., Wang, D., Luo, W., Tang, Y., Mu, D., Zhang, R., Cheng, X. y Qiu, L. (2024). Evolution of LC–MS/MS in clinical laboratories. *Clinica Chimica Acta*, 117797. doi: 10.1016/j.cca.2024.117797
- Ziegler, U. y Groscurth, P. (2004). Morphological features of cell death. *News in Physiological Sciences*, 19: 124–128. doi: 10.1152/nips.01519.2004.

## 11. ANEXOS

## Anexo A. Descripción de las microalgas utilizadas.

Especie	Descripción
<b><i>Dunaliella tertiolecta</i> Butcher 1959</b>	<i>Dunaliella tertiolecta</i> (Orden Volvocales) (Fig. 6a) es una microalga verde unicelular de forma ovoide o esférica, de pequeño tamaño, que mide entre 6-10 $\mu\text{m}$ de diámetro (Shapovalova <i>et al.</i> , 2022; Barbosa <i>et al.</i> , 2023; Molinari, 2024). Se caracteriza por su capacidad para acumular grandes cantidades de $\beta$ -caroteno y otros carotenoides en condiciones de estrés salino (Barbosa <i>et al.</i> , 2023). Se distribuye principalmente en ambientes extremadamente salinos como lagunas costeras (Gao <i>et al.</i> , 2022; Barbosa <i>et al.</i> , 2023; Lortou <i>et al.</i> , 2023).
<b><i>Chlorella capsulata</i> Guillard R.R.L., Bold H.C. y MacEntee F.J. 1975</b>	<i>Chlorella capsulata</i> (Orden Chlorellales) (Fig. 6b) es una microalga verde de forma esférica o elíptica, de diámetro que varía entre 3 y 10 $\mu\text{m}$ (Guiry y Guiry, 2020a; Lorenzo <i>et al.</i> , 2023). Se caracteriza por poseer una pared celular delgada y compuesta por polisacáridos y proteínas, además, de contener cloroplastos con clorofila, lo que le confiere su color verde característico (Kalashnikova y Kirakosyan, 2022; Martins <i>et al.</i> , 2022). Tiene un amplio rango de distribución gracias a su plasticidad, aunque se distribuye principalmente en ambientes dulceacuícolas como lagos y estanques (Kalashnikova y Kirakosyan, 2022).
<b><i>Rhodospirillum rubrum</i> Geitler 1930</b>	<i>Rhodospirillum rubrum</i> (Orden Sphaeriales) (Fig. 6c) es una microalga roja unicelular de forma redondeada o ligeramente alargada y de tamaño entre los 5 y 20 $\mu\text{m}$ (Guiry y Guiry, 2020b; Krayesky-Self <i>et al.</i> , 2020). Pertenece al grupo de las algas rojas por lo que contiene pigmentos fotosintéticos como la ficoeritrina, que le confiere un color rosado/rojo (Wang <i>et al.</i> , 2020). Se distribuye en ambientes marinos, particularmente en aguas costeras poco profundas y áreas intermareales de diversas regiones del mundo (Jeong <i>et al.</i> , 2017; Wang <i>et al.</i> , 2020).
<b><i>Porphyridium cruentum</i> (S.F. Gray) Nägeli 1849</b>	<i>Porphyridium cruentum</i> (Orden Porphyridiales) (Fig. 6d) es una microalga roja de forma irregular o esférica, su diámetro varía entre 3 y 8 $\mu\text{m}$ (Guiry y Guiry, 2022b; Rossi y Machado, 2022). Es de un color rojo intenso gracias a la presencia de ficoeritrina en sus células, se distribuye en aguas costeras y estuarios alrededor del mundo y se

---

caracteriza por la composición de su pared celular siendo principalmente de polisacáridos de interés industrial para la producción de biopolímeros como la carragenina (Liberti *et al.*, 2022, 2023).

***Isochrysis galbana* Parke 1949** *Isochrysis galbana* (Orden Isochrysidales) (Fig. 6e) es una microalga café de forma esférica u ovalada cuyo diámetro es de 2 – 6  $\mu\text{m}$  (Guiry y Guiry, 2014; Fang *et al.*, 2022; Ruíz-Domínguez *et al.*, 2022). Es de color entre dorado y café debido a la presencia de pigmentos como la fucoxantina y carotenoides (Belkis *et al.*, 2022; Fang *et al.*, 2022). *I. galbana* se encuentra en ambientes marinos, en especial en aguas costeras y estuarios con salinidad moderada y una buena disponibilidad de luz solar (Ruíz-Domínguez *et al.*, 2022). Es una microalga rica en ácidos grasos omega-3, especialmente el ácido docosahexaenoico (DHA) por lo que es ampliamente utilizada en acuicultura como alimento para larvas de moluscos y crustáceos (Ruíz-Domínguez *et al.*, 2022; Fang *et al.*, 2022).

***Chaetoceros calcitrans* (Paulsen)  
H. Takano 1968** *Chaetoceros calcitrans* (Orden Chaetocerotales) (Fig. 6f) es una diatomea marina café que presenta una forma cilíndrica alargada con células que miden aproximadamente entre 5 y 30  $\mu\text{m}$  de longitud (Guiry y Guiry, 2022a; Kutako *et al.*, 2023). Posee una pared celular de sílice, que forma una estructura externa denominada frústula, la cual, tiene un patrón de ornamentación distintivo característico del género (Bách *et al.*, 2023). Esta especie es de distribución cosmopolita, aunque se encuentra comúnmente en aguas marinas, en especial en aguas costeras y estuarios (Nef *et al.*, 2022; Bách *et al.*, 2023).

***Alexandrium margalefii* Balech,  
1994** *Alexandrium margalefii* (Orden: Gonyaulacales) (Fig. 6g) es un dinoflagelado tecado, la fórmula de su teca es  $Po, x, 4', 6'', 6c, 9-10s(?), 5''', 2''''$  (Balech, 1994; Morquecho *et al.*, 2016; Gómez y Artigas, 2019; Guiry y Guiry, 2024a). En estado vegetativo su forma es subesférica con una teca delgada, sus dimensiones son 28-36  $\mu\text{m}$  de largo y 31-40  $\mu\text{m}$  de ancho (Gómez y Artigas, 2019). No posee ornamentaciones y se encuentran como células solitarias (no forman cadenas) (Kim *et al.*, 2017). Es una especie que se encuentra distribuida en aguas templadas y subtropicales (Balech, 1994; Morquecho *et al.*, 2016).

---

**Anexo B.** Descripción de las macroalgas utilizadas.

<b>Especie</b>	<b>Descripción</b>
<b><i>Ulva lactuca</i> (Linnaeus, 1753)</b>	<i>Ulva lactuca</i> (Orden Ulvales) (Fig. 3h) es un alga verde polimórfica cosmopolita cuya coloración va desde el verde claro a verde oscuro, se caracteriza por láminas planas y delgadas y creces en aguas costeras poco profundas, estuarios, lagunas y zonas intermareales en regiones tanto templadas como tropicales (Salim <i>et al.</i> , 2023; Guiry y Guiry, 2024b).
<b><i>Sargassum horridum</i> Setchell &amp; N.L. Gardner 1924</b>	<i>Sargassum horridum</i> (Orden Fucales) (Fig. 3i) es un alga parda caracterizada por su apariencia robusta y ramificada, con tallos gruesos y esponinosos, que pueden alcanzar varios metros de longitud (Guiry y Guiry, 2018a). <i>S. horridum</i> se distribuye en aguas tropicales y subtropicales, especialmente en áreas con corrientes oceánicas que favorecen su dispersión (Gower y King, 2011). Esta especie es conocida por formar densas masas flotantes llamadas “sargazos”, que pueden crear hábitats flotantes para diversos organismos marinos, como peces, tortugas y aves marinas (Estrada <i>et al.</i> , 2014).
<b><i>Spyridia</i> Harvey, 1833</b>	Las algas del género <i>Spyridia</i> (Orden Ceramiales) (Fig. 3j) son algas rojas filamentosas con una estructura ramificada, textura cartilaginosa y pueden alcanzar varios centímetros de longitud (Harvey, 1833; Guiry y Guiry, 2018b). Sus células contienen cloroplastos con ficobilisomas que contienen ficobiliproteínas como la ficoeritrina, lo que les confiere su característico color rojo. Las especies de este género se distribuyen en ambientes marinos de regiones tropicales y subtropicales, además, pueden encontrarse adheridas a sustratos duros como rocas y corales en zonas intermareales y submareales (Won <i>et al.</i> , 2021). Estas algas son productoras de una variedad de metabolitos secundarios con propiedades biológicas interesantes, entre ellos polisacáridos sulfatados, carragenanos, ficobiliproteínas y compuestos antioxidantes (Won <i>et al.</i> , 2021).

## Anexo C. Actividad antioxidante de los extractos de microalgas y macroalgas.

	Especie	Extracto	DPPH <sup>a</sup>	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> <sup>b</sup>	FRAP <sup>c</sup>
Microalga	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	TF	97.50 ± 3.16	67.26 ± 2.16 (> 200)	166.00 ± 18.76
		TA	97.32 ± 2.23	50.99 ± 3.60 (> 200)	109.70 ± 13.47
	<i>Chlorella capsulata</i>	NF	89.98 ± 4.20	58.43 ± 2.25 (> 200)	199.50 ± 23.35
		NA	71.48 ± 2.49	51.82 ± 2.29 (> 200)	77.70 ± 3.87
	<i>Rhodorus marinus</i>	MF	105.70 ± 1.12	87.56 ± 2.195	48.63 ± 13.47
		MA	103.10 ± 2.27	83.88 ± 3.67	19.42 ± 1.95
	<i>Porphyridium cruentum</i>	CF	101.20 ± 1.99	91.07 ± 2.18	104.90 ± 4.42
		CA	103.20 ± 1.24	22.88 ± 1.81 (41.26)	231.40 ± 7.17
	<i>Isochrysis galbana</i>	GF	103.30 ± 0.55	92.28 ± 0.49	36.59 ± 4.20
		GA	108.40 ± 0.73	55.10 ± 3.45 (> 200)	130.00 ± 8.62
	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	KF	103.20 ± 0.92	84.52 ± 1.98	47.89 ± 8.79
		KA	106.30 ± 0.92	61.21 ± 4.65 (> 200)	64.83 ± 9.75
	<i>Alexandrium margalefii</i>	LF	101.50 ± 0.61	56.84 ± 1.68 (> 200)	57.38 ± 14.22
		LA	93.62 ± 1.10	40.82 ± 1.33 (169.10)	124.00 ± 4.11
Macroalga	<i>Ulva lactuca</i>	UF	103.50 ± 1.02	89.39 ± 2.20	18.28 ± 1.06
		UD	105.00 ± 0.94	98.10 ± 0.34	36.42 ± 1.71
	<i>Sargassum horridum</i>	UA	100.20 ± 1.04	59.00 ± 0.33 (> 200)	166.20 ± 7.29
		HF	103.00 ± 0.87	90.83 ± 0.87	53.52 ± 4.86
		HD	103.80 ± 0.63	97.90 ± 0.41	12.69 ± 2.68
		HA	99.06 ± 1.74	59.05 ± 1.02 (> 200)	162.90 ± 6.79

<i>Spyridia sp</i>	SF	102.60 ± 0.65	90.55 ± 0.40	17.04 ± 2.52
	SD	103.80 ± 55	96.90 ± 0.21	10.10 ± 2.84
	SA	101.90 ± 0.93	47.67 ± 0.50 (> 200)	72.21 ± 8.06

<sup>a</sup> actividad eliminadora de radicales DP|PH (% de reducción del DPPH), <sup>b</sup> actividad eliminadora de radicales (% de reducción del NBT y EC<sub>50</sub> µg mL<sup>-1</sup>) de extracto, <sup>c</sup> µM FeSO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> de extracto. Los resultados se expresan como el promedio ± el error estándar de tres experimentos independientes por triplicado, y los valores se determinaron para un intervalo de confianza del 95%.

#### Anexo D. Viabilidad de células SH-SY5Y tras su exposición a distintas concentraciones.

Especie		Viabilidad celular (%)				
		100 µg mL <sup>-1</sup>	30 µg mL <sup>-1</sup>	10 µg mL <sup>-1</sup>	3 µg mL <sup>-1</sup>	1 µg mL <sup>-1</sup>
<i>Dunaliella</i>	TF	56.44 ± 2.82*	100.2 ± 4.02	98.41 ± 4.97	-	-
<i>tertiolecta</i>	TA	54.06 ± 3.04*	88.84 ± 2.53	105.9 ± 4.15	-	-
<i>Chlorella</i>	NF	84.78 ± 1.96*	120.5 ± 3.73	116.8 ± 3.32	-	-
<i>capsulata</i>	NA	69.97 ± 3.82*	93.99 ± 4.33	117.5 ± 4.10	-	-
<i>Rhodorus</i>	MF	104.00 ± 3.97	91.58 ± 4.21	-	-	-
<i>marinus</i>	MA	61.66 ± 2.70*	104.1 ± 4.47	-	-	-
<i>Porphyridium</i>	CF	54.12 ± 2.65*	63.04 ± 3.37*	105.9 ± 2.78	123.0 ± 8.09	-
<i>cruentum</i>						
<i>Isochrysis</i>	GF	79.38 ± 3.92*	106.4 ± 3.55	112.9 ± 2.38	-	-
<i>galbana</i>	GA	52.39 ± 2.22*	106.1 ± 3.79	113.1 ± 4.49	-	-
<i>Chaetoceros</i>	KA	50.18 ± 2.47*	101.8 ± 4.82	108.1 ± 4.58	-	-
<i>calcitrans</i>						
<i>Alexandrium</i>	LF	44.70 ± 2.64*	35.81 ± 3.45*	51.31 ± 1.41*	59.91 ± 1.13*	110.30 ± 2.96
<i>margalefii</i>	LA	53.68 ± 1.83*	45.31 ± 2.10*	52.66 ± 1.88*	94.95 ± 3.92	114.10 ± 7.02
<i>Ulva lactuca</i>	UA	55.58 ± 2.18*	108.40 ± 6.42	104.0 ± 3.30	-	-
<i>Sargassum</i>	HF	63.23 ± 1.13*	106.00 ± 1.50	107.2 ± 4.77	-	-
<i>horridum</i>	HA	62.75 ± 4.95*	67.21 ± 1.97*	108.7 ± 2.45	102.4 ± 2.87	-
<i>Spyridia sp</i>	SA	64.10 ± 3.72*	81.42 ± 3.06	110.5 ± 2.07	-	-

Los valores representan el promedio ± el error estándar de tres experimentos independientes por triplicado y se expresan como porcentaje del vehículo (%). Para cada extracto se realizó un ANOVA ( $p < 0.05$ ) con su respectiva prueba *a posteriori* de pareado de Tukey. \* representan diferencias estadísticamente significativas con el vehículo. Los sufijos en las abreviaciones señalan el solvente orgánico utilizado para obtener el extracto: CFMO:MeOH (F), DCMO:MeOH (D) y acetona (A).