



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGÍA**

**Expresión de CD16 y secreción de Óxido Nítrico en
macrófagos murinos de la cepa CD1 estimulados con la F6
del extracto de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J.**

Wynne.

T E S I S

Que para obtener el título de:

BIÓLOGA

Presenta:

MARIA GUADALUPE VERTIZ AMALIO

Directora de tesis:

ROSALVA RANGEL CORONA



Ciudad de México, marzo de 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue elaborado en el Laboratorio de Oncología Celular, L4-PB, de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC), perteneciente a la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES-Z), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dr. Rosalva Rangel Corona y el asesoramiento del Dr. Leonardo Trujillo Cirilo y la M. en C. Reynalda Roldán Pérez.

Así mismo hago mención que este trabajo de tesis contó con el apoyo financiero del Programa PAPIIT de la DGAPA con clave de proyecto: IN222721.

De igual forma, este trabajo de tesis contó con el apoyo del Programa para el Impulso a la Titulación por Actividades Académicas en el Extranjero (PITAAE) 2023.

AGRADECIMIENTOS.

- A la Universidad Nacional Autónoma de México, FES Zaragoza, por ofrecerme un lugar entre sus alumnos y proporcionarnos buenos profesores que a lo largo de mis estudios fueron parte fundamental para alcanzar los conocimientos que ahora me convierten en bióloga.
- A la Dra. Rosalva Rangel Corona por permitirme estar en su laboratorio y confiar en mí, en mis capacidades y por apoyarme e impulsarme siempre para que se me otorgaran las becas que en su momento fueron un gran apoyo y una gran experiencia en mi vida y por todo el apoyo que me otorgó en el tiempo que fui parte del Laboratorio.
- Al Dr. Leonardo Trujillo Cirilo, por siempre ser un gran profesor, no sólo para mí, sino para todo el Laboratorio; por todo el apoyo que me brindó a lo largo de esta travesía llamada Tesis, por sus consejos, conocimientos, su paciencia y amabilidad y por siempre estar dispuesto a atender mis dudas en todo momento.
- Al M. C. Carlos Adrián Vargas Ángeles, mi asesor de tesis, por apoyarme en mi proyecto de tesis e impulsarme a siempre ser más autodidacta y autosuficiente, por sus conocimientos y paciencia para guiarme desde el inicio al final para poder concluir lo mejor posible este proyecto.
- A todo el Laboratorio de Neuropsicofarmacología Traslacional de la Universidad Miguel Hernández por abrirme las puertas de su Laboratorio y por haberme compartido sus conocimientos en el área de investigación, la vida científica, así como a nivel personal.
- A todos mis amigos y compañeros dentro y fuera del Laboratorio de Oncología Celular que estuvieron conmigo a lo largo de la carrera y siempre han estado dispuestos a escucharme, apoyarme, impulsarme y ofrecerme su amistad, que es algo invaluable y por todos los momentos inolvidables que vivimos dentro y fuera del laboratorio y que siempre recordaré con mucho cariño.
- A mi mamá por haberme sacado adelante y por las enseñanzas que siempre voy a recordar y el apoyo en el transcurso de mi carrera y mi vida, este logro es de ambas; te quiero.
- A mi familia, porque siempre me motivaron a seguir con mis estudios, superarme y trabajar por mis sueños y por todo el apoyo que me otorgaron en muchas ocasiones de diferentes formas, que al día de hoy se ven reflejadas en este logro de mi vida.
- A Dios, por nunca dejarme sola a pesar de todo, por ser mi mayor refugio cuando he estado totalmente derrotada y ha sido mi impulso y fuerza para levantarme y seguir adelante, por todos los proyectos que sé que se vienen pronto y por todas las bendiciones recibidas de Él a través de diferentes personas, situaciones, etc., que han sido un granito de arena para el término de mis estudios.

“Las pequeñas cosas son las que a la larga se adaptarán en las grandes historias. La memoria es esa maravilla que se va formando con retazos de conversaciones, un olor, como el de la panadería, un momento justo, un beso, la súbita aparición del sol en el horizonte; en fin, es como una de esas mantas que se hacen con retazos de tela de diferentes colores que aparentemente no encajan unas con otras y que, sin embargo, acaban resultando de una perfecta armonía.”

— Benito Taibo, *Persona normal*.

“La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡Qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste.”

-Marie Curie.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIACIONES.....	1
LISTA DE FIGURAS.....	2
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
MARCO TEÓRICO.....	6
1. Macrófagos.....	6
1.1 Origen de los macrófagos.....	7
1.2 Funciones Biológicas de los macrófagos.....	8
1.3 Activación y Polarización de los macrófagos.....	9
1.4 Enfermedades que presentan macrófagos activados.....	10
2. Citocinas.....	11
3. Óxido Nítrico (ON) secretado por macrófagos activados.....	13
4. Proteína CD16.....	14
5. Lipopolisacárido (LPS).....	15
5.1 Actividad del LPS en la respuesta inmune y macrófagos activados...	16
6. Generalidades de las algas.....	17
6.1 Algas Pardas.....	18
6.2 Género <i>Sargassum</i>	19
6.3 <i>Sargassum</i> y el Sistema Inmunológico.....	20
ANTECEDENTES DIRECTOS.....	21
JUSTIFICACIÓN.....	22
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVOS.....	22
MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
• Modelo Animal.....	24
• Grupos experimentales.....	24
• Activación de macrófagos.....	24
• Extracción de macrófagos.....	24
• Aislamiento y conteo de macrófagos.....	25
• Tratamiento con <i>SabuCh-W</i>	25
• Evaluación de Óxido Nítrico a través de nitritos.....	25

• Evaluación del receptor FcyRIII CD16.....	26
RESULTADOS.....	27
• Curva estándar de Nitritos de Sodio (NaNo ₂).....	27
• Cuantificación de Nitritos en macrófagos Residentes.	28
• Cuantificación de Nitritos en macrófagos Residentes + <i>SabuCh-W</i>	29
• Cuantificación de Nitritos en macrófagos Activados con LPS.....	30
• Cuantificación de Nitritos en macrófagos Activados con LPS + <i>SabuCh-W</i>	31
• Expresión de CD16 en macrófagos Residentes + <i>SabuCh-W</i>	32
• Expresión de CD16 macrófagos Activados con LPS.....	33
• Expresión de CD16 macrófagos Activados con LPS + <i>SabuCh-W</i>	34
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	36
CONCLUSIONES.....	39
PERSPECTIVAS.....	39
ANEXOS.....	40
• Preparación de los Reactivos de Griess.....	40
• Preparación del Medio RPMI 1640 suplementado con <i>SabuCh-W</i>	40
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

LISTA DE ABREVIACIONES

- FC: Factores de Crecimiento .
- CSF: Factores Estimuladores de Colonia.
- GM-CSF: Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor.
- GM-CFUs: Unidades Formadoras de Colonias.
- CFU-GM: Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos.
- CFU-M: Unidades Formadoras de Colonias de Macrófagos.
- PAMP: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos.
- DAMP: Patrones Moleculares Asociados a Daños.
- Toll: Toll-like receptor TLRs, por sus siglas en inglés.
- LPS: Lipopolisacárido.
- ARN: Ácido Ribonucleico.
- ADN: Ácido Desoxirribonucleico.
- IL: Interleucina.
- (IFN)- γ : Interferón gamma.
- (TNF)- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa.
- (TGF)- β : Factor de Crecimiento Transformante beta.
- ON: Óxido Nítrico.
- NaNO₂: Nitritos de sodio.
- O: Oxígeno.
- N: Nitrógeno.
- NOS: Enzima Sintetasa de Óxido Nítrico.
- Antígeno CD16: En inmunología se denomina CD16 (del inglés cluster of differentiation 16) o Fc γ RIIIa, receptor de baja afinidad.
- KDO: 2-keto-3-deoxioctanato.
- *SabuCh-W*: Extracto de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne.
- F6: Fracción 6 del Extracto de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne.
- NF- κ B: Factor de Transcripción Nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
- COX: Ciclooxygenasa.
- PLA₂: Fosfolipasa A₂.
- 5-LOX: 5-Lipooxygenasa.

LISTA DE FIGURAS

- **Figura 1.** Diferentes rutas de acción y funcionalidad para los macrófagos y monocitos circulantes.
- **Figura 2.** Función de las citocinas sobre las células.
- **Figura 3.** Ruta simplificada de la producción de metabolitos estables nitrito y nitrato a partir del Óxido Nítrico.
- **Figura 4.** El Lipopolisacárido (LPS).
- **Figura 5.** Cascada de señalización del LPS para desencadenar la respuesta inmunológica.
- **Figura 6.** Clasificación de las algas y sus pigmentos.
- **Figura 7.** *Sargassum sanyaense sp.*
- **Figura 8.** *Sargassum buxifolium sp.*
- **Figura 9.** Curva estándar de Nitritos de Sodio (NaNO_2).
- **Figura 10.** Cuantificación de Nitritos en macrófagos Residentes.
- **Figura 11.** Cuantificación de Nitritos en macrófagos Residentes + *SabuCh-W*.
- **Figura 12.** Cuantificación de Nitritos en macrófagos Activados con LPS.
- **Figura 13.** Cuantificación de Nitritos en macrófagos Activados con LPS + *SabuCh-W*.
- **Figura 14.** Expresión de CD16 en macrófagos Residentes + *SabuCh-W*.
- **Figura 15.** Expresión de CD16 macrófagos Activados con LPS.
- **Figura 16.** Expresión de CD16 macrófagos Activados con LPS + *SabuCh-W*.

RESUMEN

Los macrófagos activados participan en los procesos de diversas enfermedades que generan inflamación, es importante controlar estas respuestas inmunitarias ya que en los peores casos puede ocasionar fallo multiorgánico y sepsis. La alta expresión de la proteína CD16 en macrófagos y secreción de Óxido Nítrico, son dos características inherentes de los macrófagos activados al fenotipo M1; es decir, proinflamatorios, los cuales serán los encargados de promover la respuesta inflamatoria para defender al organismo ante antígenos que van a romper con su homeostasis. En los últimos años se han estudiado las propiedades farmacológicas de las algas pardas; sin embargo, las investigaciones sobre el efecto inmunomodulador de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M.J. Wynne (*SabuCh-W*), son un campo que no había sido estudiado. Por lo tanto, en este trabajo se analizó el efecto inmunomodulador de la Fracción 6 (F6) del extracto de *SabuCh-W* en macrófagos murinos de la cepa CD1 activados con Lipopolisacárido (LPS) a través de la expresión de la proteína CD16 por citometría y secreción de Óxido Nítrico por medio de la cuantificación de su metabolito estable: el nitrito, a las 4, 8 y 12 hrs en medio de cultivo.

Los resultados de esta tesis demuestran que la Fracción 6 del extracto de *SabuCh-W* regula la activación de los macrófagos en el grupo de Residentes; es decir, en el grupo que no se activó con LPS, al añadirle el extracto, provoca una sobreactivación, reflejada en la expresión de la proteína CD16, que en esencia es mucho mayor que en los macrófagos que solo se activan con LPS, y estos resultados son homólogos con la cuantificación de nitritos. De la misma manera, los datos del grupo LPS+*SabuCh-W* no presentan una diferencia significativa en el estado de activación con el grupo LPS, a excepción de la cuantificación de nitritos, que es mayor en el grupo LPS+*SabuCh-W*. Los resultados de este trabajo demuestran que la Fracción 6 de *SabuCh-W* tienen un efecto en células del sistema inmunológico al promover en ellas un estado de sobreactivación aun mayor de la demostrada por el LPS. En general, los resultados demuestran el potencial de *SabuCh-W* para activar células del sistema inmune y provocar una respuesta en macrófagos murinos.

INTRODUCCIÓN

La activación de macrófagos es uno de los principales mecanismos de defensa del cuerpo ante diferentes agentes que rompen con su homeostasis como lo pueden ser mutaciones genéticas, tumores malignos, infecciones por un agente patógeno como un virus o una bacteria, daños genéticos o enfermedades autoinmunes (Núñez *et al.* 2020).

Se considera que, para que los macrófagos se activen y promuevan la inflamación y estimulación del sistema inmunológico, deben recibir señales como INF- γ o Lipopolisacárido (LPS) y esto provoca la polarización al fenotipo 1 (M1), que se consideran proinflamatorios y secretan TNF- α , IL-1 β , IL-12, que promueven la generación de linfocitos Th1, especies reactivas de oxígeno y derivadas de óxido nítrico y pueden destruir células tumorales; sin embargo, es importante considerar que estas células pueden cambiar de fenotipo, por ejemplo, la fagocitosis de células en apoptosis por macrófagos de tipo M1, los desactiva y puede transformar en macrófagos tipo M2. Es importante conocer y controlar estas respuestas inmunitarias; ya que nos amplían el panorama de los diferentes mecanismos de defensa del cuerpo (Ochoa & Bravo 2013).

En la actualidad, existen diversos tratamientos para suprimir las respuestas inmunitarias excesivamente activas (Inhibidores de Interleucinas, glucocorticoides, entre otros) o para estimular su activación (Interleucinas, LPS); no obstante, las algas pardas contienen varios compuestos orgánicos e inorgánicos que son fuentes potenciales de compuestos bioactivos ya que son capaces de producir varios metabolitos secundarios con un amplio espectro de actividades biológicas interesantes (Callejas J. *et al.* 2020; Frikha, F. *et al.* 2011)

Con relación a lo anterior, los miembros del género *Sargassum* han demostrado poseer diversos compuestos bioactivos que tienen propiedades antibacteriales, antineoplásicas, antifúngicas, antioxidantes y antiinflamatorias (Gutiérrez R. *et al.* 2016). Específicamente para *Sargassum buxifolium* miembros de nuestro equipo de trabajo han demostrado exitosamente que la fracción 2 del extracto de esta especie de alga posee actividad antitumoral en células de carcinoma de cérvix (Luna, 2012 & Santiago Rubí 2014); sin embargo, aún no se han realizado estudios que muestren si posee actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora, por lo que en este trabajo de investigación se decidió observar el potencial efecto de la Fracción 6 de *SabuCh-W* en macrófagos residentes (no activados, que se encuentran en su estado basal) y

activados con LPS para analizar a través de la cuantificación de nitritos y la expresión de CD16, los cuales pueden considerarse 2 características de macrófagos activados a M1.

MARCO TEÓRICO

1. Macrófagos.

Los macrófagos son células del sistema inmune que forman parte del sistema fagocítico mononuclear, el cual constituye el principal mecanismo de defensa del organismo frente a agentes extraños como los microorganismos, virus, bacterias, entre otros (Comalada M. 2002).

El sistema fagocítico mononuclear son un conjunto de células que se van a originar a partir de un precursor mieloide común en la médula ósea, donde por medio de diversos estímulos se irán diferenciando (Comalada M. 2002), pasarán al torrente sanguíneo y seguirán diferentes rutas de funcionalidad, por lo que se convertirán en una población más heterogénea en su morfología debido al tipo de patógenos que pueden reconocer, así como el nivel de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias que producen y todo esto en conjunto va a reflejar el grado de especialización que van a requerir para realizar sus funciones (Saldana J. s.f.).

Los macrófagos pueden estar un tiempo en estado de reposo; sin embargo, si no reciben señales que los estimulen a activarse o proliferar, a diferencia de los Linfocitos T o B que pueden estar un periodo de tiempo en quiescencia y cuando se activan siempre hay un proceso de expansión de estas células, los macrófagos solo pueden estar en un periodo de reposo un pequeño lapso y posteriormente mueren por procesos de apoptosis (Ver Figura 1) (Comalada M. 2002).

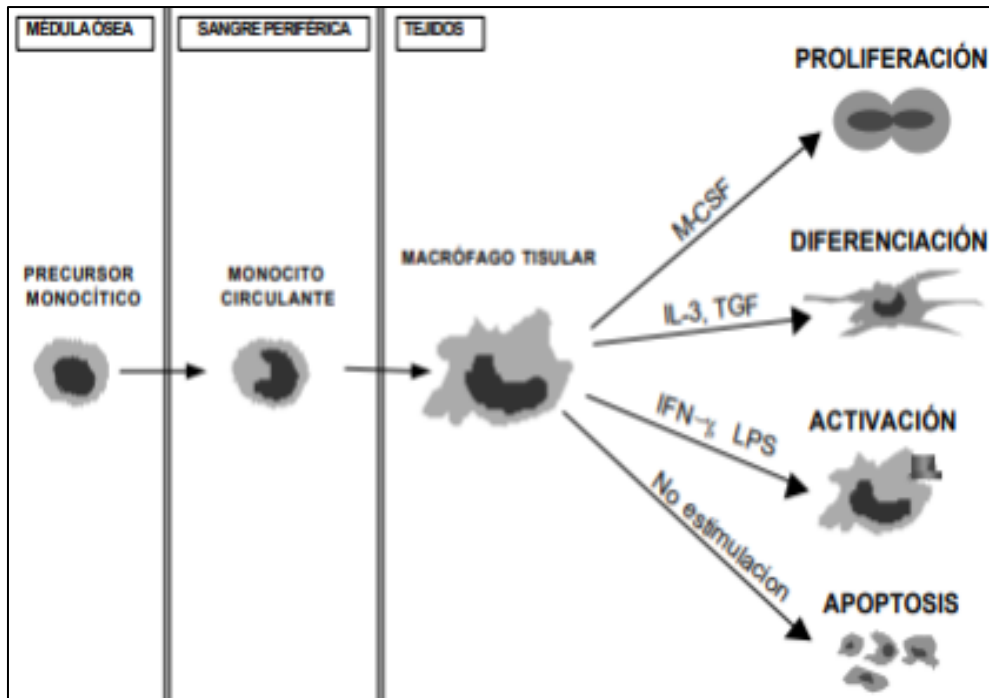


Figura 1. Diferentes rutas de acción y funcionalidad para los macrófagos y monocitos circulantes. Se observa el linaje de los macrófagos desde el precursor en la médula ósea, después de diversos estímulos se convierte en un monocito circulante que sale a la sangre periférica y se traslada a diferentes partes del cuerpo, donde finalmente se transforma en un macrófago, el cual, puede seguir diversas rutas de funcionalidad, dependiendo de los estímulos que reciba, como proliferación, diferenciación, activación o apoptosis (Comalada M., 2002).

1.1 Origen de los macrófagos.

Todas las células del sistema inmune, se originan en la médula ósea a partir de una célula madre pluripotente, la cual tiene la capacidad de autorregenerarse y el potencial para diferenciarse hacia todos los diferentes tipos celulares (Comalada M. 2002).

Específicamente para los macrófagos, su diferenciación se lleva a cabo mediante diversos procesos que van a culminar con un monocito/macrófago en el torrente circulatorio, con la capacidad para trasladarse a los diferentes tejidos del cuerpo gracias a la interacción entre moléculas de adhesión (adhesinas e integrinas) y con la posibilidad de madurar a una célula activa o diferenciarse a células pertenecientes a algún tejido (microglía en el sistema nervioso central, osteoclastos del hueso, células de Kupffer del hígado, células de Langerhans de la dermis o en células dendríticas, etc). Este proceso puede verse favorecido a causa de eventos relacionados con la

homeostasis del organismo, como inflamación, necrosis, apoptosis, etc (Sun Y. *et al.* 2021).

En respuesta a Factores de Crecimiento (FC) y citocinas como las Interleucinas IL-1, IL-3 e IL-6 y Factores Estimuladores de Colonia (CSF), la célula madre pluripotente experimenta una división que dará origen a una nueva célula madre y una célula pluripotencial mieloide o pluripotencial linfoide (progenitores comunes de las líneas monocítica y granulocítica), dependiendo de la concentración y tipo de estímulos que reciban, así como la expresión de receptores de la membrana para citoquinas específicas (Echeverría *et al.* 2004, Martínez M. *et al.* 2001).

En este punto, la Interleucina IL-3 y el Factor de Crecimiento GM-CSF (Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor) inducen la proliferación de las Unidades Formadoras de Colonias GM-CFUs. que luego se diferencian en Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (CFU-GM); posteriormente en Unidades Formadoras de Colonias de Macrófagos (CFU-M), a continuación, en Monoblastos, luego en Promonocitos, después en Monocitos y finalmente en Macrófagos. (Martínez M. *et al.* 2001, Ochoa F. & Bravo A. 2013).

Como se mencionó anteriormente, los monocitos salen al torrente circulatorio y en los tejidos completan su diferenciación y maduración; lo que implica un aumento en el grado de especialización; es decir, aumento del tamaño celular, mayor desarrollo del sistema lisosomal, tamaño de las mitocondrias, metabolismo energético, entre otros (Comalada M. 2002).

1.2 Funciones Biológicas de los macrófagos.

Los macrófagos juegan un papel importante en las respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas ya que están especializados en la detección, fagocitosis y destrucción de patógenos, microorganismos y partículas extrañas, tales como bacterias, virus, parásitos, macromoléculas, e incluso células propias dañadas o muertas debido a su capacidad para reconocer Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP) y Patrones Moleculares Asociados a los Daños (DAMP) (Moreira *et al.* 2020, Comalada M. 2002), utilizando un conjunto de receptores tipo Toll (Toll-like receptor TLRs, por sus siglas en inglés) que se pueden unir de forma específica a diferentes moléculas que expresan los patógenos como azúcares (Lipopolisacárido, LPS), ARN, ADN o proteínas extracelulares.

En la actualidad se considera que cumplen con tres funciones principales: 1) inflamación-regeneración de tejidos, 2) procesos inmunológicos y 3) homeostasis (Ochoa F. & Bravo A. 2013).

Para ello, los macrófagos son capaces de que al momento del reconocimiento de patógenos, además de fagocitar, liberen diversas moléculas como citocinas (TNF- α , IL-1- β e IL-6) para atraer y activar a otras células inmunitarias al sitio de infección e iniciar el proceso inflamatorio (Moreira L. 2020); es decir, son Presentadoras de Antígenos (APC, Antigen Presenting Cell) debido a que procesan antígenos extraños de los patógenos y los presentan en su superficie para que puedan ser reconocidos por los linfocitos T y promover su activación, por lo que también van a tener una interacción bidireccional específica con los linfocitos debido a que éstas células también tienen la capacidad para secretar citocinas que van a activar a los macrófagos y así aumentar su capacidad para realizar funciones específicas (Comalada M. 2002, Ochoa F. & Bravo A. 2013).

Por otro lado, los macrófagos también son capaces de sintetizar y secretar más de 100 metabolitos biológicamente activos como lo son las especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno (peróxido de oxígeno, óxido nítrico), algunas enzimas (perforina, granzima) (Saldana J. s.f., Echeverria *et al.* 2004) y también poseen más de 100 receptores específicos de superficie celular, tanto para la porción constante de las inmunoglobulinas como para las proteínas del complemento, por lo que el reconocimiento y eliminación de antígenos extraños se lleva a cabo de forma más rápida y eficiente y todo esto en conjunto va a complementar y favorecer la actividad antitumoral que poseen los macrófagos (Comalada M. 2002).

Finalmente, también tienen funciones no relacionadas directamente con la respuesta inmunológica, sino con la regulación de la homeostasis de los tejidos, ya que algunas de estas células van a pasar a formar parte de diversos tejidos en el organismo y especializarse en funciones específicas dependiendo del grado de especialización (Moreira L. 2020).

1.3 Activación y Polarización de los macrófagos.

La polarización de los macrófagos es un proceso que va a estar íntimamente relacionado con el tipo de activación que van a sufrirán. La activación de los

macrófagos es un proceso complejo y regulado que va a tener como consecuencia modificaciones morfológicas, bioquímicas y funcionales, que van a reflejar el aumento de su capacidad para realizar funciones complejas y específicas (Comalada M. 2002). Hay dos formas en las cuales los macrófagos se activan: 1) Clásica y 2) Alternativa y dependiendo de que se haga, se determinará la polarización de los macrófagos a los fenotipos M1 y M2.

El Interferón gamma (IFN)- γ producido por los linfocitos T y el Lipopolisacárido bacteriano (LPS), genera macrófagos activados clásicamente, que se polarizan a M1 ya que generan citocinas pro-inflamatorias como la Interleucina (IL)- 1β , IL-6, IL-12, IL-16 y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF)- α (Gao, J. *et al.* 2022), además van a experimentar un aumento en la expresión de moléculas de Histocompatibilidad Clase II (MHC II), tienen mayor capacidad para presentar antígenos y son capaces de sintetizar grandes cantidades de óxido nítrico, por lo que también se observa su capacidad citotóxica para eliminar patógenos celulares (Comalada M. 2002, Stempin C., & Cerbán, F. 2007).

Por otro lado, los macrófagos activados alternativamente M2 se generan por medio del estímulo de IL-4 e IL-13 producidas por Linfocitos T cooperadores y van a producir citocinas anti-inflamatorias como lo son la IL-10, el receptor antagonista de IL-1 (IL-1RA) y Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF)- β , por lo que van a estar relacionados con la supresión de la respuesta inmunitaria (Gao, J. *et al.* 2022), no van a producir ON a partir del aminoácido L-arginina y van a tener limitada la capacidad para eliminar patógenos (Stempin C., & Cerbán, F. 2007).

1.4 Enfermedades que presentan macrófagos activados.

Existen diversas enfermedades que al desarrollarse presentan activación de macrófagos, algunas pueden ser provocadas por algunas mutaciones o daños genéticos (enfermedades autoinmunes), mientras que otras desencadenadas por fármacos (tratamientos contra el cáncer), tumores malignos o infecciones causadas por un agente patógeno como un virus o una bacteria (Nuñez *et al.* 2020).

Una de las patologías más importantes que presenta activación de macrófagos es el Síndrome de Activación de Macrófagos (SAM), el cual consiste en una activación descontrolada del sistema inmune, con una estimulación masiva de linfocitos T y

macrófagos, lo que conlleva la secreción de enormes cantidades de citoquinas proinflamatorias como Interferón gamma (IFN- γ), Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) y las IL-1, IL-6 e IL-18, entre otras, que en conjunto conduce a lo que se conoce como tormenta de citocinas, debido a la producción exacerbada y persistente de citocinas proinflamatorias que genera el sistema inmunitario y que en los peores casos produce fallo multiorgánico, shock séptico y muerte (Hernández L. 2021).

Es importante conocer y controlar estas respuestas inmunitarias dañinas, ya que la activación de macrófagos es un mecanismo importante del sistema inmune para protegernos ante enfermedades derivadas de diversas causas; pero si no existe una autorregulación por parte del sistema inmunitario, puede provocar daños severos al paciente.

Hoy en día existen diversos tratamientos para suprimir la respuesta inmunitaria excesivamente activa (inhibidores de interleucinas, glucocorticoides, esteroides, inmunoglobulinas, entre otros); sin embargo, no existe tratamiento que sea ampliamente efectivo, ya que dan lugar a poco o ningún aumento de la mejora en pacientes y la mayoría se deben de combinar dos o más de ellos para presentar un efecto positivo y amortiguar la respuesta inmunitaria excesivamente activa (Wunderlich M. *et al.* 2016, Montoya I. *et al.* 2022)

2. Citocinas.

Las citocinas son glicoproteínas producidas principalmente por células del sistema inmunológico (Tortora G. y Derrickson B., 2006) que pueden secretarse o mantenerse unidas a la membrana de las células (Bermúdez-Morales *et al.* 2005).

Funcionan de forma similar a las hormonas (Ver Fig. 2) (autocrinas si modulan la actividad de la misma célula que la produce o paracrina al inducir la producción de otras citocinas o provocar un estímulo a otras células) y son encargadas de estimular o inhibir varias funciones celulares como crecimiento, activación y diferenciación celular; también estimulan la proliferación de células progenitoras, otras se involucran en los mecanismos de defensa del organismo en la inmunidad innata o adaptativa (Tortora G. y Derrickson B., 2006)

Las citocinas se secretan en respuesta a una amplia variedad de estímulos, como: estrés celular, lesiones inducidas por carcinógenos, infecciones o inflamación (Bermúdez-Morales. *et al.* 2005) y poseen una característica poco común denominada pleiotropía; es decir, una única citocina es capaz de actuar en diversos

tipos de células y diferentes tipos de células pueden secretar la misma citocina. Debido a ello, las citocinas no se pueden clasificar de acuerdo con célula de origen o función biológica y es por lo que se agrupan actualmente en Interleucinas (IL), numeradas secuencialmente de IL-1 a IL-35, Factores de Necrosis Tumoral (TNF), Interferones (IFN), Factores Estimulantes de Colonias (CSF) y Factores de Crecimiento Mesenquimal (Barros *et al.* 2011).

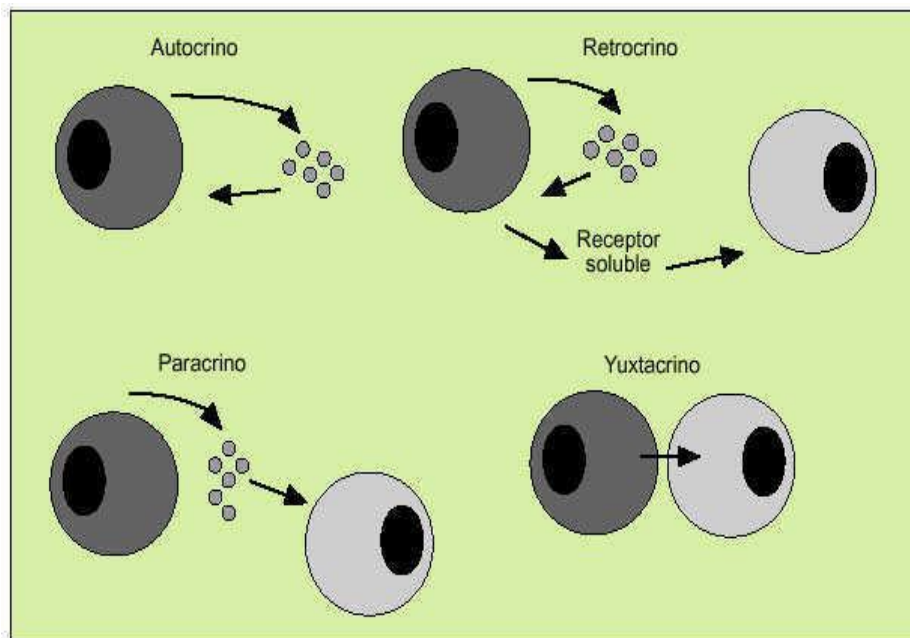


Figura 2. Función de las citocinas sobre las células. Las citocinas tienen la capacidad de funcionar de forma similar a las hormonas, autocrinas si modulan la actividad de la misma célula que la está produciendo y secretando o paracrinas al inducir la producción de citocinas o provocar una respuesta en células al estimular o inhibir varias funciones celulares como crecimiento, activación y diferenciación celular (Filella X. *et al.* 2002).

La respuesta inflamatoria es la manera en la cual un organismo se defiende de agentes externos que rompen con su homeostasis y consiste en la activación del sistema inmune después de una lesión ocasionada por daños físicos, químicos o por la presencia de virus o microorganismos.

En ese sentido, en macrófagos activados, la producción de citocinas es muy importante, ya que producen inflamación actuando como señales para el sistema inmune regulando la duración y gravedad de la respuesta frente al daño o infección y dependiendo de la citocina específica que se libera, su función puede ser activar o regular la respuesta del organismo ya que existen dos tipos de citocinas distinguibles con base en su participación en los procesos de infección y/o inflamación. Las

citocinas que están involucradas en los procesos inflamatorios reciben el nombre de citocinas proinflamatorias (Th1); por ejemplo, la interleucina (IL)-1, IL-2, IL-6, IL-7, el Interferón (IFN)- γ y el Factor de Necrosis Tumoral (TNF)- α y están principalmente relacionadas con los macrófagos activados clásicamente, y por otro lado, las citocinas que suprimen la actividad de las citocinas pro-inflamatorias son las citocinas anti-inflamatorias (Th2), entre las que destacan IL-4, IL-10, IL-13 y FTC β (Factor Transformador de Crecimiento β), las cuales se asocian a los macrófagos activados de forma alternativa (Parra, V. *et al.* 2020., Bermúdez-Morales. *et al.* 2005).

3. Óxido Nítrico (ON) secretado por macrófagos activados.

El óxido nítrico es un gas incoloro e inodoro que se forma a partir de la unión de dos átomos, Oxígeno (O) y Nitrógeno (N) (Díaz *et al.* 2009). En el organismo, es un radical libre que va a ser sintetizado a partir del aminoácido L-arginina y por la enzima Sintasa de Óxido Nítrico (NOS) (García A., *et al.* 2003) a consecuencia de estímulos de citocinas pro-inflamatorias como la Interleucina 1 (IL-1), IL-12, Interferón gamma (INF γ) y el Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α) (Adarmes H., 2009., Stempin C., & Cerbán, F. 2007).

La enzima óxido nítrico sintetasa posee tres isoformas, NOS-I, NOS-II y NOS-III. La NOS-I y la NOS-III son constitutivas dependientes del calcio ya que se requiere el incremento en la concentración intracelular de Ca² y pueden regular la síntesis de ON debido a regulaciones génicas, entre otros; sin embargo, NOS-II es inducible, ya que es independiente del calcio y calmodulina y es la que se va a producir debido a las citocinas pro-inflamatorias; esto es importante debido a que ésta isoforma es la que va a producir concentraciones más elevadas de ON con respecto a la NOS-I y la NOS-III (Adarmes H., 2009)

La isoforma inducible NOS II se encuentra principalmente en el citosol de células del sistema inmunitario como macrófagos y neutrófilos y van a sintetizar ON en respuesta a diversos estímulos inmunológicos, patógenos que van a romper con la homeostasis del organismo como el Lipopolisacárido bacteriano (LPS) e Interferón gamma (INF γ) (Perez-Neri I., 2015). En este sentido, los macrófagos activados clásicamente van a producir grandes cantidades de ON, molécula que es citotóxica para células tumorales y está implicada en la eliminación de bacterias, virus y protozoos ya que oxida los grupos sulfhidrilos de las proteínas, genera agotamiento del glutatión citosólico y es capaz de reaccionar con el anión superóxido para formar dióxido de

nitrógeno y un radical hidroxilo, moléculas fuertemente oxidantes y reactivas (Fig. 3) (Pérez A., 1997).

La vida media del ON en sistemas biológicos es muy corta, aproximadamente de 4 a 50 segundos; sin embargo, posteriormente se oxida y forma metabolitos estables: nitritos y después nitratos (Perez-Neri I., 2015)

Diversos autores mencionan que, una vez activados los macrófagos, pueden producir ON por tiempos prolongados; sin embargo, la excesiva producción de ON por parte de los macrófagos, está implicado en el mecanismo de inflamación aguda por diversas enfermedades, puede llegar a provocar importantes patologías y conducir al shock séptico (García A., *et al.* 2003).

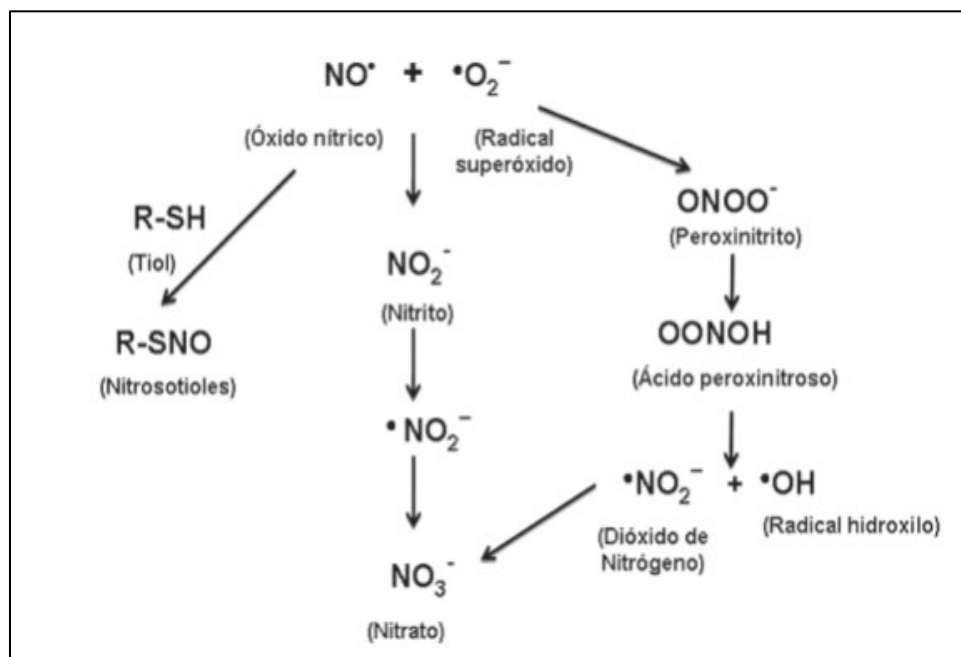


Figura 3. Ruta simplificada de la producción de metabolitos estables, nitrito y nitrato a partir del óxido nítrico. El NO y el radical superóxido reaccionan y forman el peroxinitrito, molécula altamente oxidante, el cual finalmente se descompone y forma los radicales dióxidos de nitrógeno y radical hidroxilo. Una ruta simplificada muestra la producción de nitrito y nitrato a partir del NO. El NO reacciona con grupos sulfhidrilo (R-SH) de las proteínas formando nitrosotioles, moléculas reactivas y oxidantes que provoca daño en células adyacentes y microorganismos patógenos (Cuellar *et al.* 2010).

4. Proteína CD16.

El antígeno CD16 es el receptor de baja afinidad de IgG (FcyRIII). En inmunología se denomina CD16 (del inglés cluster of differentiation 16) o FcyRIIIa una proteína

transmembranal que se encuentra únicamente en mamíferos y se encuentra en dos formas diferentes codificado por dos genes diferentes: FcγRIIIA (o III-2) y FcγRIIIB (o III-1). La heterogeneidad genética del CD16 genera otras moléculas ancladas en la membrana.

Se caracteriza por poseer un peso molecular de 50-80 kDa y su naturaleza bioquímica la coloca dentro de la familia de las inmunoglobulinas.

Su función biológica en la célula es actuar como componente del receptor de baja afinidad para Fc, FcγRIII, y mediar en la fagocitosis y citotoxicidad debida a células dependientes de anticuerpos. Se expresa específicamente en neutrófilos, células NK y macrófagos (Janeway, Jr *et al.* 2000).

5. Lipopolisacárido (LPS).

El Lipopolisacárido (LPS), que también se le conoce como endotoxina, es uno de los principales componentes de la membrana de las bacterias Gram negativas (Fig. 4) (Comalada M. (2002), que se considera en la actualidad un Patrón Molecular Asociado al Patógeno (PAMP) ya que funciona como un antígeno capaz de desencadenar la activación de la respuesta inmunológica al desempeñar un papel importante en la interacción patógeno-hospedero (Radulovic, K., *et al.* 2018).

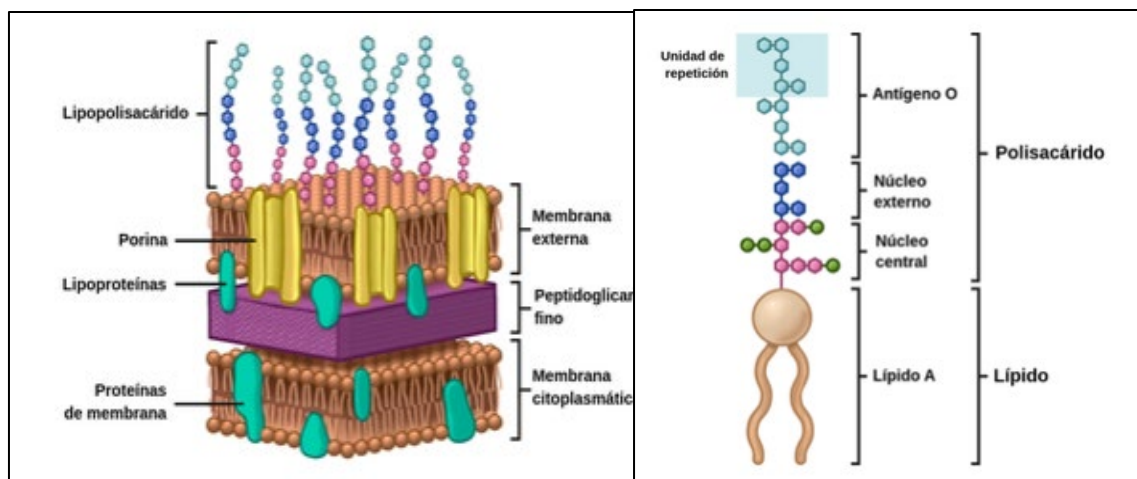


Figura 4. El Lipopolisacárido (LPS). Del lado izquierdo se muestra el Lipopolisacárido como un componente de la membrana de las bacterias Gram negativas. Del lado derecho se muestra la estructura del LPS y sus tres unidades; el Lípido A, el Antígeno O y el núcleo, el cual se divide en núcleo central y núcleo externo (Tomado y modificado de Labsther Theory, 2021)

Desde el punto de vista estructural, el LPS está formado por tres regiones distintas, una de ellas es lipídica y las otras dos son glicosídicas y estas regiones poseen funciones independientes y/o sinérgicas:

Una región central compuesta por polisacáridos repetitivos llamado núcleo o core, un dominio hidrofóbico formado por seis cadenas de ácidos grasos que también se denominan lípido A, y representa el componente biológicamente activo del LPS (éstas dos regiones se unen entre sí por el KDO (2-keto-3-deoxioctanato)) y este a su vez se une a una estructura de tipo antígeno-O (Ver Fig. 4) (Martínez J. (2018).

5.1 Actividad del LPS en la respuesta inmune y macrófagos activados.

El LPS posee su propio receptor de alta afinidad que pertenece a la familia *Tolllike receptor* (TLR). En la región citoplasmática, los TLRs son proteínas transmembranales de tipo I que presentan una alta similitud con los receptores de la IL-1 (IL-1R) porque ambos poseen dominios TIR (Toll/IL-1R homology) que están emparentados con las inmunoglobulinas; sin embargo, en la región extracelular, los TLRs tienen dominios ricos en leucina (LRR), importantes para la interacción proteína-proteína. Actualmente, se han descrito diez diferentes tipos de TLRs que se expresan en diferentes células del sistema inmunológico y el TLR4, es el receptor específico del LPS que se va a encargar de recibir la información de la naturaleza del antígeno y permitir a la célula responder contra una amenaza.

Para que el LPS desencadene una respuesta inmunológica (Ver Fig. 5), éste se une al LBP (LPS-binding protein) y forma el complejo LBP-LPS, facilitando que el LPS se una al receptor CD14; el CD14 transfiere el LPS al complejo encargado de su reconocimiento (TLR4/MD-2). Posteriormente TLR4 comienza una interacción con dominios TIR (MyD88) que van a mediar la transducción del LPS a través de diversas reacciones que van a activar el Factor de Transcripción Nuclear (NF- κ B) y éste se va a translocar al núcleo donde se va a unir a la región promotora de los genes de respuesta inflamatoria, donde finalmente se va a llevar a cabo la transcripción y expresión de Interferones y citocinas pro-inflamatorias, como TNF α , IL-6 e IL-1 β 17 (Comalada M. 2002, Radulovic, K., *et al.* 2018).

verdes, pardas y rojas, esto debido al tipo y cantidad de pigmentos que poseen (Ver Fig. 6) (Quitral R, 2012., Li, Y. *et al.* 2021).

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

Figura 6. Clasificación de las algas y sus pigmentos. Existen tres grandes grupos en los que se dividen las algas: Clorophyta, que son las comúnmente llamadas algas verdes, Phaeophyta, llamadas algas pardas y finalmente Rhodophyta, que corresponden al nombre común de algas rojas. Cada grupo posee diversos pigmentos que les dan su coloración característica, algunos de los cuales se observan en la segunda columna junto con ejemplos de especies pertenecientes a estos grupos (Quitral R. 2012).

Las algas son importantes a nivel biológico ya que son organismos capaces de producir oxígeno al realizar fotosíntesis, forman parte de la cadena alimenticia del mar y del ecosistema al generar condiciones para la vida de otros organismos (León D., *et al.* 2017).

Por otro lado, se consideran un recurso valioso debido a su utilización en diversos aspectos en la vida del hombre; por ejemplo, gastronómico al ser ingrediente de diversos alimentos y aportar nutrientes; cosmético al ser utilizado como hidrogeles; agropecuario al constituir un buen fertilizante para ciertos cultivos y a nivel químico-farmacéutico al contar con diversos compuestos bioactivos que tienen propiedades farmacológicas (Alvarez M. y Gallardo T., 1989, Quitral R. *et al.* 2012).

6.1 Algas Pardas.

El Phylum Phaeophyta de las comúnmente llamadas algas pardas se encuentran principalmente en ambientes acuáticos marinos, distribuidas en todos los océanos del mundo, exceptuando en el ártico, aunque también se pueden encontrar algunas especies de agua dulce.

La filogenia de las algas pardas se ha estudiado utilizando varias técnicas, incluyendo datos morfológicos, moleculares y genómicos por lo que en la actualidad se considera

que existen 20 Clases y comprende unos 265 géneros con unas 1500-2000 especies (Thomas D. N. 2002).

6.2 Género *Sargassum*.

Sargassum (F. Sargassaceae), del orden Fucales, subclase Cyclosporeae y clase Phaeophyceae, es un género de algas pardas que se encuentran por los océanos Atlántico, Pacífico e Índico, habitando principalmente ambientes tropicales y subtropicales donde forma densos bosques submarinos y arrecifes (Rushdi, M. *et al.*, 2020, Catarino, M., *et al.* 2023, .

En México se pueden encontrar especies de este género en las costas del Golfo de México, Mar Caribe, la Península de Baja California y en el litoral del Océano Pacífico. La base de datos AlgaeBase tiene registrados 874 nombres de especies para éste género en particular, de las cuales 340 están reconocidos taxonómicamente y al menos 62 se han estudiado en múltiples investigaciones por su diversidad de compuestos (Murillo A. *et al.* 2011) y metabolitos bioactivos entre los cuales se encuentran terpenos, oxilipinas, florotaninos, hidrocarburos volátiles como el alginato, laminarina y fucoidan y productos de origen biogenético mixtos (Echavarría Z. *et al.* 2009, Li, Y. *et al.* 2021) a los cuales se les atribuyen diversas actividades biológicas que en una primera instancia y a nivel biológico favorecen al alga como estrategias de sobrevivencia (como el calor, la contaminación, el estrés, la concentración de oxígeno y las radiaciones ultravioleta) pero también a nivel farmacológico se ha demostrado que ofrecen un amplio espectro de acción como lo son inhibidores de diferentes enzimas, antioxidantes, anticoagulantes, actividad antimicrobiana, citotóxica, antibacteriana, antidiabética, antiinflamatoria, inmunomoduladora y actividad antineoplásica (Ayyad S. *et al.* 2011, Echavarría Z. *et al.* 2009).

En general este género se considera que posee un talo diferenciado en un sostén de 10 a 200 cm de largo que puede ser lineal o tupido con varios ejes principales divididos en ramas que contienen estructuras foliares, vesículas y receptáculos (órgano reproductor) de diversas formas y longitudes (Ver Fig. 7). Con excepción de *S. natans* y *S. fluitans*, que se reproducen sólo por fragmentación, *Sargassum* las algas se reproducen sexualmente. La forma de las hojas puede ser simple, bífida o dividida varias veces, redondas, espatuladas, turbinadas, lanceoladas, ovoides o lineares. El pedicelo puede ser de longitud variable, cilíndrico o aplanado en secciones y liso. El margen de las hojas puede ser simple o doblado en el ápice, y puede ser liso,

ondulado, finamente dentado, profundamente dentado, o cualquier aspecto intermedio. La nervadura central puede ser corta y gruesa o más delgada y alcanzar el vértice o cualquier longitud intermedia. El ápice puede ser agudo, redondeado o truncado, simple o mostrar una depresión en forma de copa.

Un hecho interesante de este género es que, debido a los cambios en las condiciones ambientales, las estaciones, la edad y la etapa reproductiva, tiene la capacidad de presentar cambios morfológicos dentro de una misma especie (Catarino, M., *et al.* 2023, Rushdi, M. *et al.* 2020).



Figura 7. *Sargassum sanyaense* sp. *Sargassum* (sargazo) es un género de macroalgas planctónicas de la clase *Phaeophyceae* (algas pardas) en el orden Fucales Rushdi M. *et al.* 2020).

6.3 *Sargassum* y el Sistema Inmunológico.

En relación con las actividades inmunomoduladoras, diversos autores mencionan que varias especies del género *Sargassum* tienen efectos en células inmunes, ya que poseen compuestos bioactivos como COX-1, COX-2, 5-LOX, PLA2, hialuronidasas (Anusree Maneesh y Kajal Chakraborty, 2017) y fucoidan, que son capaces de inhibir o estimular directamente el sistema inmunológico (Queiroz K. *et al.* 2008., Peng Li *et al.* 2017).

ANTECEDENTES DIRECTOS

En el Laboratorio de Oncología Celular, L-4 PB, de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental, FES Zaragoza, UNAM, se han obtenido resultados interesantes a partir del extracto etanólico de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M. J. Wynne (Fig. 8), del cual se obtuvieron 20 fracciones, de las cuales se determinó exitosamente el nivel de actividad citostática para células tumorales CaLo e INBL y debido a ello, se ha decidido evaluar la fracción 6 para observar si posee algún efecto inmunomodulador en macrófagos activados de ratones de la cepa CD1.



Figura 8. *Sargassum buxifolium* sp. Imagen tomada de la tesis de Ávila Lopez Sergio Erick, 2016: Caracterización morfológica y aislamiento de algunos compuestos activos de *Sargassum buxifolium* s.p., en dos localidades de Veracruz durante épocas diferentes (secas y lluvias).

JUSTIFICACIÓN

La activación de macrófagos es un mecanismo importante del sistema inmunológico para protegernos ante diversas enfermedades; sin embargo, es importante controlar esta respuesta ya que, si no existe una autorregulación, la respuesta exacerbada de óxido nítrico y citocinas pueden producir lesiones en los órganos y shock séptico.

En años recientes, los descubrimientos en los usos y aplicaciones de los extractos de algas han crecido; sin embargo, las investigaciones sobre el efecto de *Sargassum buxifolium* en células del sistema inmune son un campo que no ha sido estudiado. Por esta razón, el presente estudio se enfocará en determinar el efecto inmunomodulador del extracto de esta especie de alga en macrófagos activados con Lipopolisacárido a través de la expresión de la proteína CD16 y cuantificación de Nitritos.

HIPÓTESIS

Se sabe que algunos miembros del género *Sargassum* poseen compuestos bioactivos estimulantes e inhibidores de Sistema Inmunológico, por lo cual, si se utiliza la fracción 6 del extracto de *Sargassum buxifolium* (*SabuCh-W*) en un modelo *in vitro* de macrófagos murinos activados de la cepa CD1, se podrá determinar si posee un efecto inmunomodulador.

OBJETIVOS

Objetivo General.

Determinar el efecto inmunomodulador en macrófagos murinos activados mediante el uso de la fracción 6 del extracto de *Sargassum buxifolium* (*SabuCh-W*).

Objetivos Particulares.

1. Obtener un modelo de macrófagos activados provenientes del peritoneo de ratones hembra de la cepa CD1.

2. Evaluar la producción de óxido nítrico mediante el método de Griess en los grupos de estudio.
3. Evaluar la expresión del receptor FcγRIII CD16 mediante citometría de flujo en los grupos de estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

- **Modelo Animal.**

Se utilizaron ratones hembra de 10 semanas de edad de la cepa CD1 adquiridas del Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Todos los ratones se mantuvieron en condiciones controladas siguiendo los estándares de cuidado animal, controlando la salud y minimizando el dolor y sufrimiento, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y el Reglamento para el ingreso al Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

- **Grupos experimentales.**

Se consideraron los siguientes grupos experimentales:

Grupo A (Residentes)	Grupo B (LPS)	
(+) SabuCh	(-) SabuCh	(+) SabuCh

Donde:

Grupo A: Ratones que no se les inyectó nada (Residentes).

Grupo B: Ratones que se les inyectó LPS (Activados).

En los que cada grupo tenía su control negativo y positivo al estímulo de la fracción 6 de SabuCh.

Todos los grupos de estudio fueron evaluados a las 4, 8 y 12 hrs.

- **Activación de macrófagos.**

Se generó la activación de macrófagos grupo C (LPS) siguiendo el Protocolo descrito por Raduolovic, K., *et al.* 2018, inyectando de forma intraperitoneal (IP) 2 µg/kg de peso de ratón de Lipopolisacárido (LPS) disuelto en PBS estéril a 0.2 µg/µl y se dejó actuar durante 3 días.

- **Extracción de macrófagos.**

Se sacrificaron los ratones por medio de la Cámara de CO₂ y se confirmó su muerte a través de dislocación cervical.

Posteriormente se fijaron los ratones con el dorso hacia abajo a una tabla de disección y con la ayuda de pinzas y tijeras de disección se realizó un corte a lo largo del abdomen cuidando de no romper la membrana peritoneal.

Una vez expuesto el peritoneo, se realizaron lavados inyectando 10 ml de solución salina inyectable y dando masajes durante 1 minuto, para después extraer la solución en tubos de 15 ml.

Finalmente se centrifugaron los tubos a 500 g durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y el botón celular se cultivó en 2 ml de RPMI 1640 durante 12 h en Incubadora a 37° C y 5% de CO₂ para permitir la adherencia de los macrófagos.

- **Aislamiento y conteo de macrófagos.**

Una vez pasadas 6 h y teniendo en cuenta de acuerdo con Mihai A., 2019, que, de las células extraídas, sólo el 30 - 40% son macrófagos, se desechó el medio y se realizaron lavados con PBS para eliminar las células no adherentes y obtener una población homogénea de macrófagos.

Después se realizó un conteo celular en Cámara de Neubauer y se colocaron 1×10^6 de macrófagos en cajas Petri con medio RPMI 1640 al 10% SFB.

- **Tratamiento con *SabuCh-W*.**

Una vez que se tenían los macrófagos aislados en cajas Petri, en oscuridad, se colocó el tratamiento de Medio RPMI 1640 al 10% SFB suplementado con la fracción 6 de *SabuCh-W* (Ver Anexos para observar el procedimiento a seguir para la preparación de Medio suplementado con *SabuCh-W*) a los correspondientes grupos de estudio para su posterior evaluación a 4, 8 y 12 hrs.

- **Evaluación de Óxido Nítrico a través de nitritos.**

El reactivo de Griess se preparó en base a la metodología descrita por Adames H., *et al.* 2009 (Ver Anexos para observar el procedimiento para preparar los Reactivos de Griess).

Se tomaron 60 µl del sobrenadante de las cajas Petri de los diferentes grupos, se añadieron a una placa de 96 pozos añadiendo en oscuridad 30 µl del Reactivo 1

(Sulfanilamida) y 30 μ l del Reactivo 2 (N-(1-Naftil)Etilendiamina) y se leyó en un Espectrofotómetro a 540 nm.

- **Evaluación del receptor Fc γ RIII CD16.**

Se desechó el sobrenadante de las cajas Petri y se les añadió 2 ml de Verseno, dejando actuar durante 10 minutos en la Incubadora de CO₂.

Pasado ese tiempo se despegaron los macrófagos de las cajas Petri y se llevaron a tubos Eppendorf de 2 ml, donde se centrifugaron a 500 g durante 5 minutos.

Una vez que se tuvo el botón celular, se desechó el sobrenadante y se añadieron 100 μ l de PBS filtrado y 1 μ l del anticuerpo Ab CD16 conjugado con FIT C, dejando incubar a temperatura ambiente durante 40 min en oscuridad.

Finalmente se centrifugó y desechó el sobrenadante para lavar y se resuspendió en 100 μ l de Paraformaldehído al 4% y 300 μ l de PBS filtrado, pasándolo a tubos FACS para su lectura en el citómetro.

RESULTADOS

Cuantificación de Nitritos.

La cuantificación de ON es difícil en medios biológicos debido a su corta vida media (de 6 a 10 segundos) y a sus bajas concentraciones. Sin embargo, el ensayo de Griess es uno de los métodos colorimétricos más generales para la detección de óxido nítrico *in vitro* ya que proporciona un enfoque indirecto para la detección de ON mediante la cuantificación de sus metabolitos estables: nitritos y nitratos.

La reacción de Griess se basa en la formación de un cromóforo por la reacción de sulfanilamida con nitrito en medio ácido, seguido de un acoplamiento con aminas bicíclicas tales como el N-1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro, formando un producto diazo de color rosado que va aumentando en intensidad conforme aumenta la concentración y exhibe una fuerte absorbancia a 540 nm (Goshi E. *et al.* 2019., Adarmes H. *et al.* 2019).

Se realizó una curva estándar de Nitritos (NaNO_2) en un rango de 0.5 a 90 μmoles . La concentración se expresó como $\mu\text{moles/L}$. El Coeficiente de determinación (R^2) se encuentra dentro del rango de 0 y 1, con un Valor de 0.9974; lo que demuestra que la curva se ajusta a la variabilidad de los datos y que, por lo tanto, es válida para la extrapolación de los datos obtenidos de absorbancia.

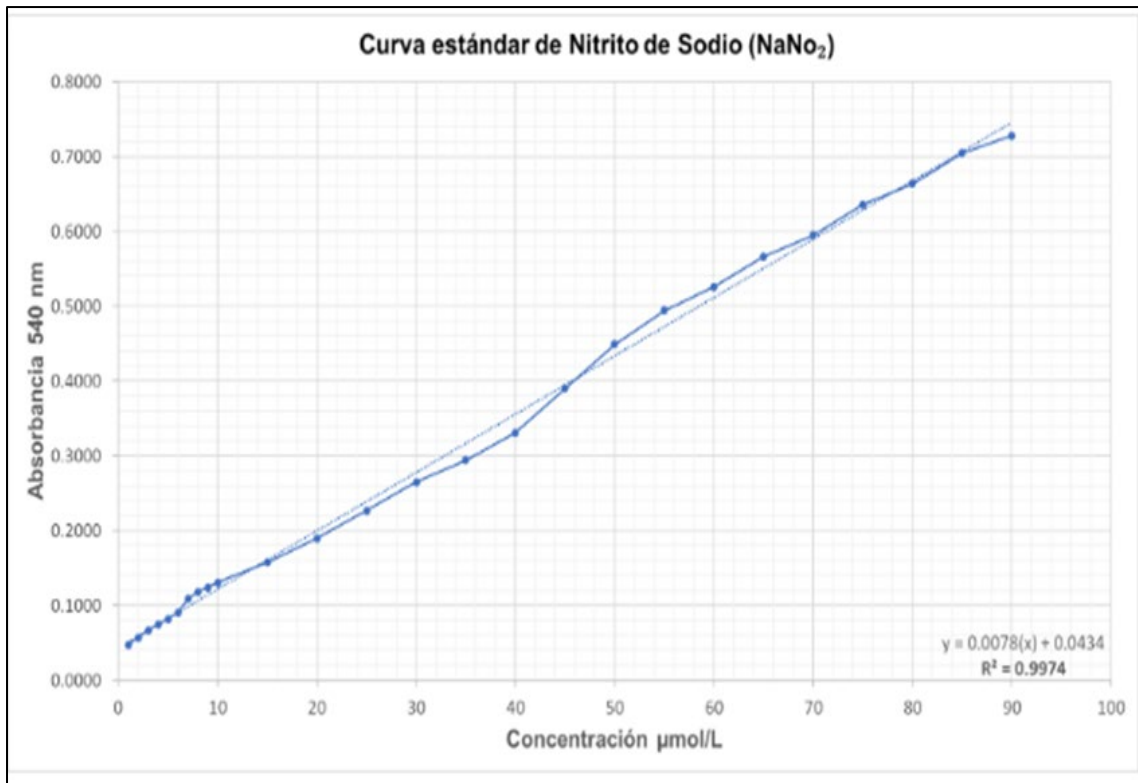


Figura 9. Curva estándar de Nitritos de Sodio (NaNO₂). Se realizó una curva estándar para evaluar la secreción de óxido nítrico a través de la cuantificación de su metabolito más estable: el nitrito. Se realizaron disoluciones de nitritos en concentraciones conocidas de 0.5 a 90 μmoles añadiendo los reactivos de Griess y se leyeron en un espectrofotómetro a 540 nm. Se recabaron los datos de Absorbancia (Abs) para realizar una gráfica de Abs y Concentración.

Secreción de Óxido Nítrico en Macrófagos Residentes.

Se evaluó en primera instancia la secreción de óxido nítrico a través de la cuantificación de Nitritos por el método de Griess en macrófagos residentes; es decir, que no fueron activados con LPS y que se podrían contemplar como el estado basal de los mismos al no añadirles ningún tratamiento o estímulo que provocara una respuesta. La Figura 10 muestra el nivel de Absorbancia que mostraron las muestras a las 4, 8 y 12 horas. En la gráfica se observa el promedio del nivel de Absorbancia detectado por el espectrofotómetro. Utilizando la curva estándar, se extrapolaron los datos con la curva de nitritos y se obtuvo que el nivel de nitritos detectado es de 15 μmol/L para las 4, 8 y 12 hrs; es decir, se mantienen en un mismo nivel conforme al tiempo.

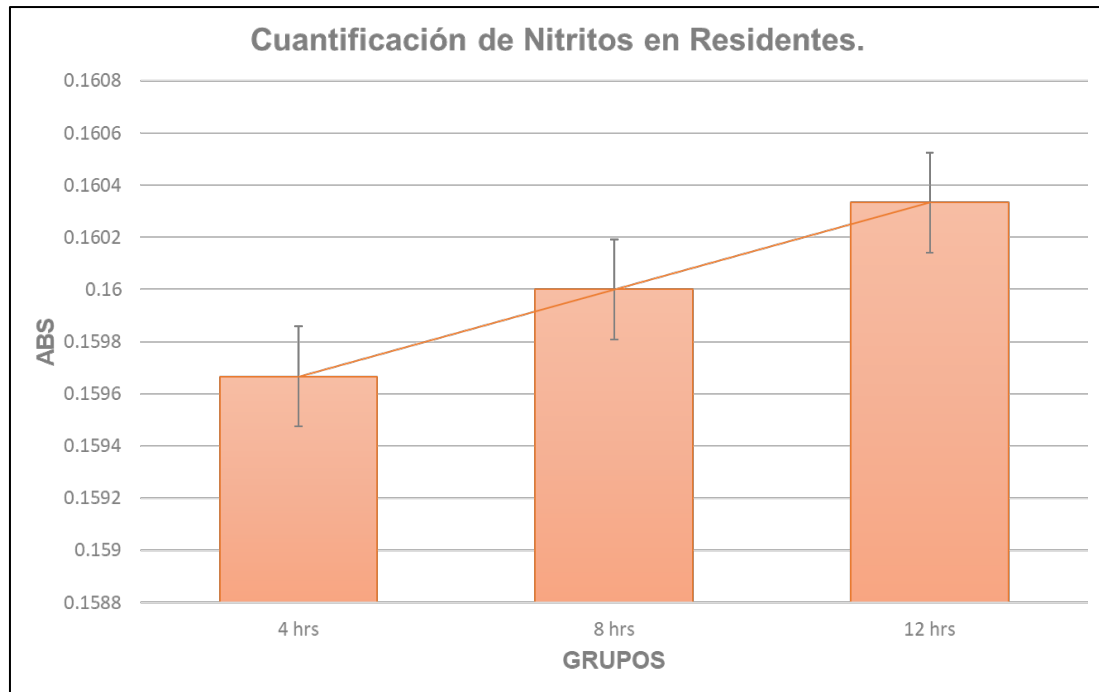


Figura 10. Cuantificación de nitritos en macrófagos residentes. Se cuantificaron los Nitritos a las 4, 8 y 12 hrs por medio del método de Griess utilizando 60 μ l del sobrenadante de medio donde se encontraban los macrófagos residentes y 30 μ l del reactivo 1 y 2 del ensayo de Griess.

Secreción de Óxido Nítrico en Macrófagos Residentes con *SabuCh-W*.

Se evaluó la secreción de óxido nítrico a través de la cuantificación de nitritos por el método de Griess en macrófagos residentes; es decir, que no fueron activados con LPS pero que una vez extraídos y aislados se les añadió medio RPMI 1640 al 10% SFB suplementado con la Fracción 6 de *Sargassum buxifolium* (*SabuCh-W*) durante 4, 8 y 12 hrs a una dilución de 1:1,194,540.

La Figura 11 muestra el nivel de Absorbancia que mostraron las muestras de este grupo a las 4, 8 y 12 horas. En la gráfica se observa el promedio del nivel de Absorbancia detectado por el espectrofotómetro. Utilizando la curva estándar, se extrapolaron los datos con la curva de nitritos y se obtuvo que el nivel de nitritos detectado a las 4 hrs fue de 42 μ mol/L; a las 8 hrs fue de 56 μ mol/L y a las 12 hrs fue de 66 μ mol/L; es decir, presentó un incremento en la secreción de óxido nítrico conforme al tiempo en cultivo.

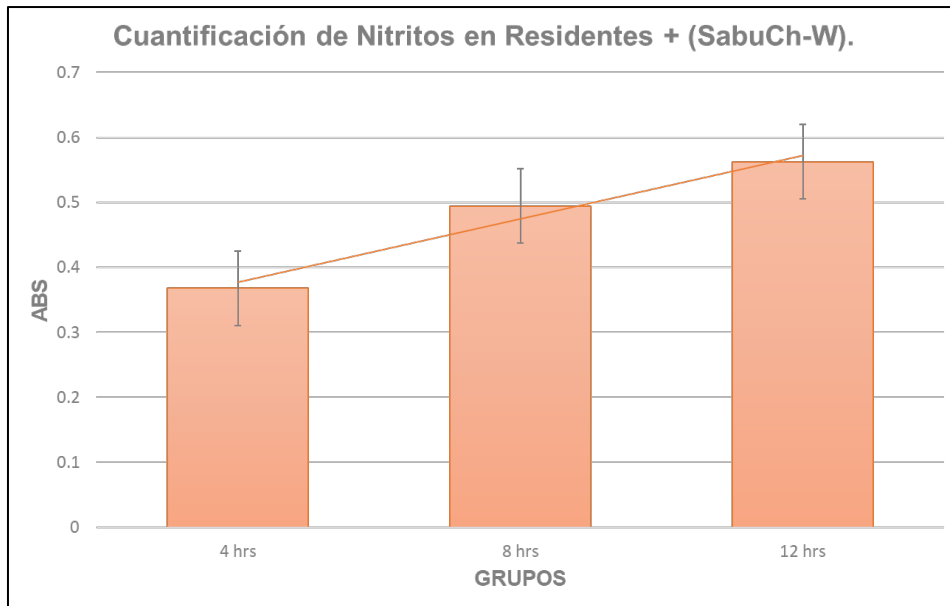


Figura 11. Cuantificación de nitritos en macrófagos residentes + *SabuCh-W*. Se cuantificaron los nitritos a las 4, 8 y 12 hrs por medio del método de Griess utilizando 60 μ l del sobrenadante de medio donde se encontraban los macrófagos residentes + *SabuCh-W* y 30 μ l del Reactivo 1 y 2 del ensayo de Griess.

Secreción de Óxido Nítrico en Macrófagos activados con LPS.

Se evaluó la secreción de óxido nítrico a través de la cuantificación de nitritos por el método de Griess en macrófagos activados de forma intraperitoneal con 2 μ g/kg de peso de ratón de Lipopolisacárido (LPS) disuelto en PBS estéril a 0.2 μ g/ μ l y una vez extraídos y aislados, se evaluaron a las 4, 8 y 12 hrs

La Figura 12 muestra el nivel de Absorbancia que mostraron las muestras de este grupo a las 4, 8 y 12 horas. En la gráfica se observa el promedio del nivel de Absorbancia detectado por el espectrofotómetro. Utilizando la curva estándar, se extrapolaron los datos con la curva de Nitritos y se obtuvo que el nivel de nitritos detectado a las 4 hrs fue de 30 μ mol/L; a las 8 hrs fue de 26 μ mol/L y a las 12 hrs fue de 25 μ mol/L; es decir, presentó un ligero descenso.

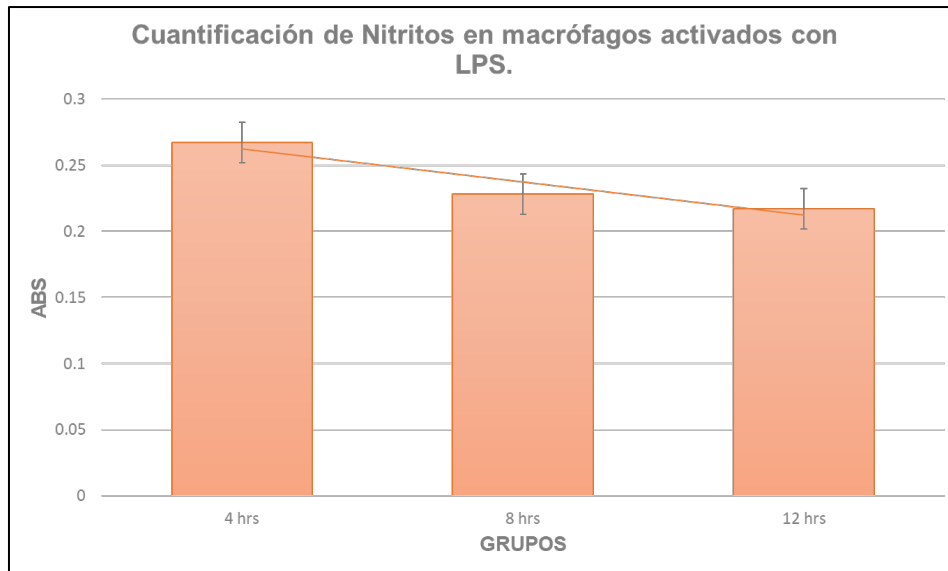


Figura 12. Cuantificación de nitritos en macrófagos activados con LPS. Se cuantificaron los nitritos a las 4, 8 y 12 hrs por medio del método de Griess utilizando 60 μ l del sobrenadante de medio donde se encontraban los macrófagos activados y 30 μ l del Reactivo 1 y 2 del ensayo de Griess.

Secreción de Óxido Nítrico en Macrófagos activados con LPS + *SabuCh-W*.

Se evaluó la secreción de óxido nítrico a través de la cuantificación de nitritos por el método de Griess en macrófagos activados de forma intraperitoneal con 2 μ g/kg de peso de ratón de Lipopolisacárido (LPS) disuelto en PBS estéril a 0.2 μ g/ μ l y una vez extraídos y aislados, se cultivaron en medio RPMI 1640 al 10% SFB suplementado con la Fracción 6 de *Sargassum buxifolium* (*SabuCh-W*) durante 4, 8 y 12 hrs a una dilución de 1:1,194,540.

La Figura 13 muestra el nivel de Absorbancia que mostraron las muestras de este grupo a las 4, 8 y 12 horas. En la gráfica se observa el promedio del nivel de Absorbancia detectado por el espectrofotómetro. Utilizando la curva estándar, se extrapolaron los datos con la curva de nitritos y se obtuvo que el nivel de nitritos detectado a las 4 hrs fue de 22 μ mol/L; a las 8 hrs fue de 38 μ mol/L y a las 12 hrs fue de 46 μ mol/L; es decir, fue en aumento conforme al tiempo en cultivo.

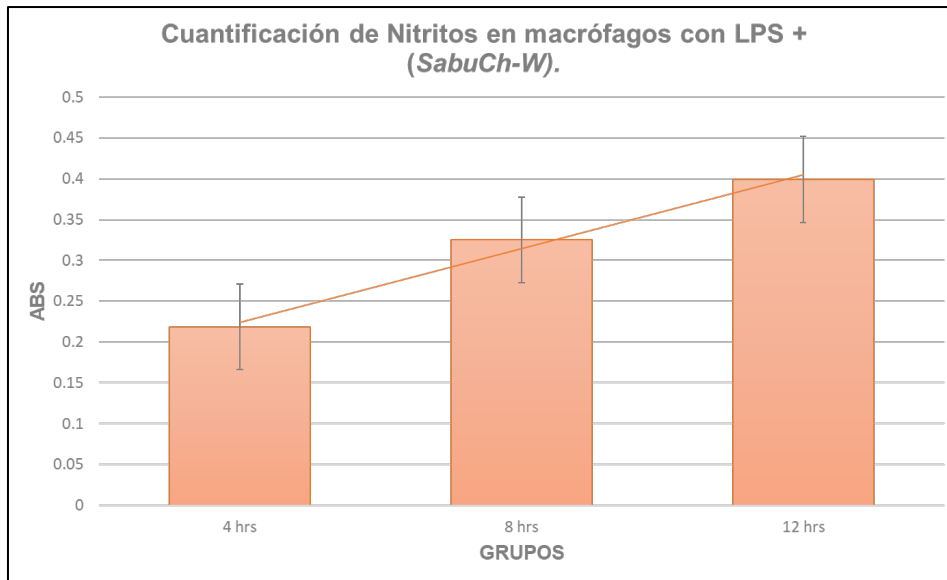


Figura 13. Cuantificación de nitritos en macrófagos activados con LPS + *SabuCh-W*. Se cuantificaron los nitritos a las 4, 8 y 12 hrs por medio del método de Griess utilizando 60 μ l del sobrenadante de medio donde se encontraban los macrófagos activados con *SabuCh-W* y 30 μ l del Reactivo 1 y 2 del ensayo de Griess.

Expresión de CD16 macrófagos Residentes con *SabuCh-W*.

Después de haber cuantificado los nitritos en los diferentes grupos y haber demostrado que la fracción 6 del extracto de *SabuCh-W* provoca una mayor secreción óxido nítrico en macrófagos murinos respecto a los grupos a los cuales no se les añadió, incluido el LPS, se procedió a analizar si el extracto regula la expresión de CD16. Para ello, los macrófagos residentes; es decir, que no fueron activados con LPS pero que una vez extraídos y aislados se les añadió medio RPMI 1640 al 10% SFB suplementado con la Fracción 6 de *Sargassum buxifolium* (*SabuCh-W*) durante 4, 8 y 12 hrs a una dilución de 1:1,194,540, se centrifugaron y se les añadió 1 μ l del anticuerpo Ab CD16 conjugado con FIT C, dejando incubar a temperatura ambiente durante 40 min en oscuridad. Posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4% y se pasaron a tubos FACS para su lectura en el citómetro.

Se analizó la expresión de CD16 en macrófagos residentes + *SabuCh* (Fig. 14). En el histograma se observa que el estado de activación a las 4 hrs (color rojo) tiene dos poblaciones que muestran diferente grado de activación y a las 8 (color verde) y 12 hrs (color azul) se mantienen en el mismo nivel, aunque es ligeramente mayor la expresión del marcador.

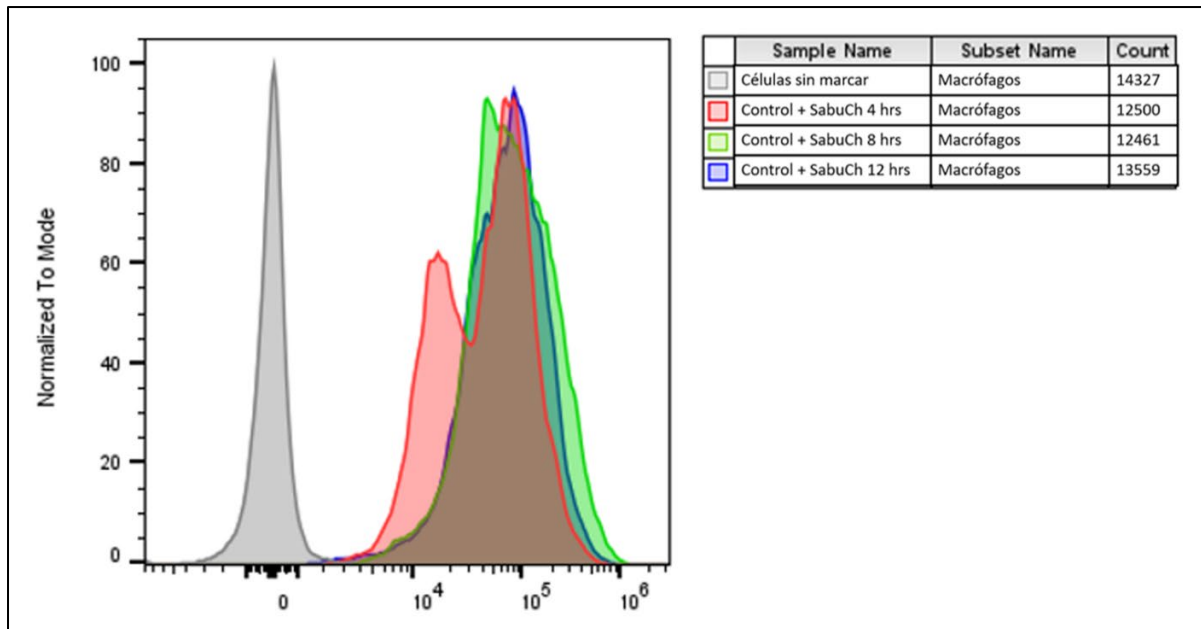


Figura 14. Expresión de CD16 en macrófagos residentes + *SabuCh-W*. Se analizó la expresión de CD16 en macrófagos residentes + *SabuCh-W* a las 4, 8 y 12 hrs.

Expresión de CD16 macrófagos Activados con LPS.

Se analizó la expresión de CD16 en macrófagos activados con 2 µg/kg de peso de ratón de Lipopolisacárido (LPS) disuelto en PBS estéril a 0.2 µg/µl. Para ello, se dejó actuar durante tres días y una vez extraídos y aislados, se cultivaron en medio RPMI 1640 al 10% SFB y se analizó la expresión de CD16 a las 4, 8 y 12 hrs añadiendo 1 µl del anticuerpo Ab CD16 conjugado con FIT C, dejando incubar a temperatura ambiente durante 40 min en oscuridad. Posteriormente se fijaron con Paraformaldehído al 4% y se pasaron a tubos FACS para su lectura en el citómetro. Se analizó la expresión de CD16 en macrófagos activados con LPS (Fig. 15). En el histograma se observa que el estado de activación a las 4 hrs (color rojo) 8 (color verde) y 12 hrs (color azul) se mantienen en el mismo nivel.

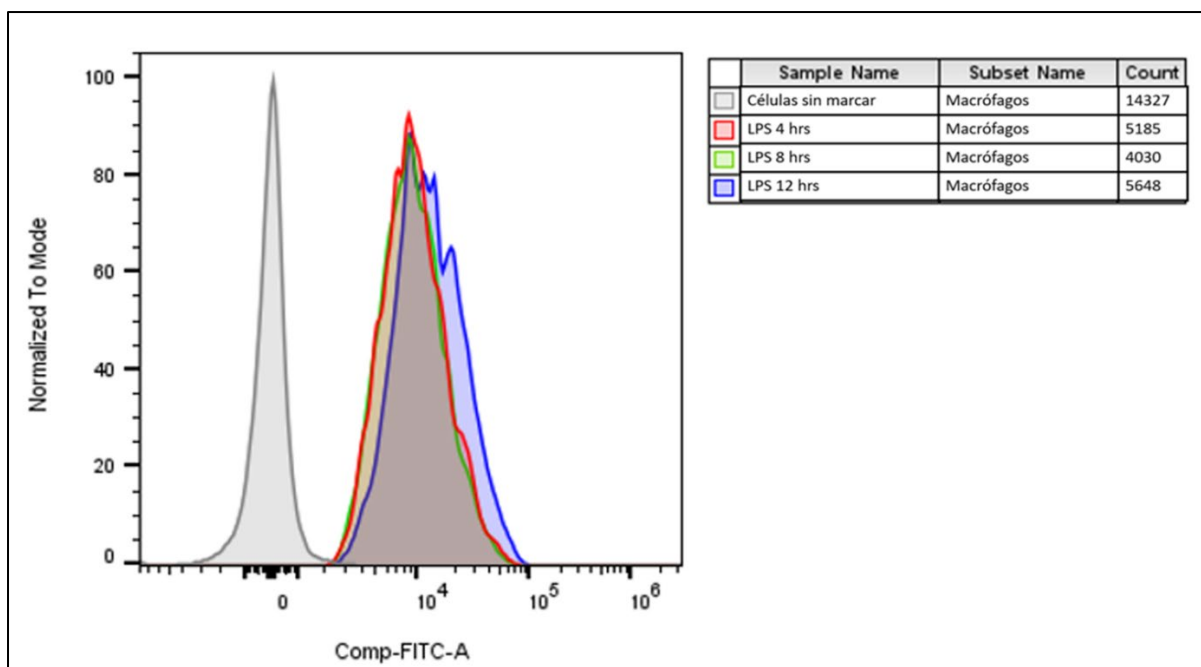


Figura 15. Expresión de CD16 macrófagos activados con LPS. Se analizó la expresión de CD16 en macrófagos activados a las 4, 8 y 12 hrs.

Expresión de CD16 macrófagos Activados con LPS + *SabuCh-W*.

Se analizó la expresión de CD16 en macrófagos activados con 2 µg/kg de peso de ratón de Lipopolisacárido (LPS) disuelto en PBS estéril a 0.2 µg/µl. Para ello, se dejó actuar durante tres días y una vez extraídos y aislados, se cultivaron en medio RPMI 1640 al 10% SFB suplementado con la Fracción 6 de *Sargassum buxifolium* (*SabuCh-W*) durante 4, 8 y 12 hrs a una dilución de 1:1,194,540, se centrifugaron y se les añadió 1 µl del anticuerpo Ab CD16 conjugado con FIT C, dejando incubar a temperatura ambiente durante 40 min en oscuridad. Posteriormente se fijaron con Paraformaldehído al 4% y se pasaron a tubos FACS para su lectura en el citómetro. Se analizó la expresión de CD16 en macrófagos activados con LPS + *SabuCh* (Fig. 16) En el histograma se observa que el estado de activación a las 4 hrs (color rojo) 8 (color verde) y 12 hrs (color azul) presenta un ligero descenso en su estado de activación.

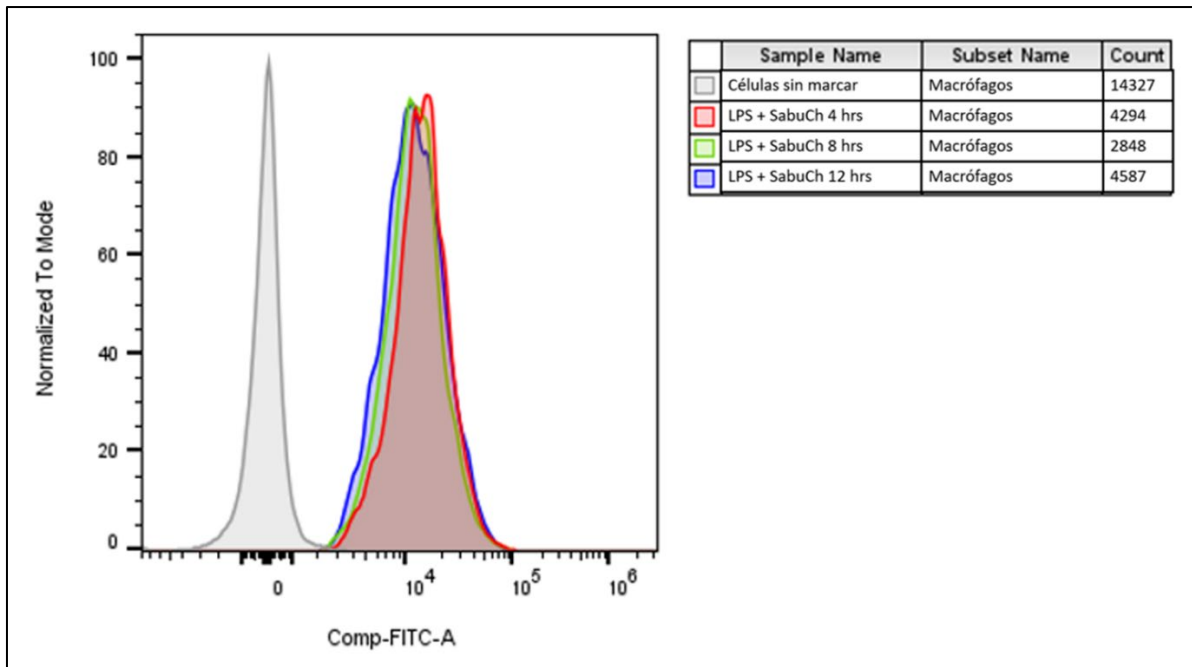


Figura 16. Expresión de CD16 macrófagos activados con LPS + *SabuCh-W*. Se analizó la expresión de CD16 en macrófagos activados + *SabuCh-W* a las 4, 8 y 12 hrs.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La activación del sistema inmunológico comienza con el reconocimiento celular de diferentes microorganismos o patógenos que rompen con la homeostasis del organismo; esto genera la activación de la célula y la síntesis de diversas proteínas, citocinas y especies reactivas de Oxígeno y Nitrógeno que son mediadores de las respuestas de las células inmunitarias (Courtney B. *et al.* 2019).

La activación de macrófagos es uno de los principales mecanismos de defensa del cuerpo ante agentes infecciosos, ya que son células especializadas en la detección, fagocitosis u destrucción de bacterias y otros organismos dañinos, además de poseer la capacidad de presentar antígenos; es decir, funcionan como APC, e inician el proceso inflamatorio mediante la liberación de citocinas que activan a otras células, por lo que son de importancia clave en el inicio y regulación de las respuestas inmunitarias (Carrillo & Cuellar, 2013).

En la actualidad se han realizado diversos estudios que han demostrado que los miembros del género *Sargassum* como *S. fulvellum*, *S. serratifolium*, entre otras, poseen una amplia variedad de compuestos bioactivos que presentan propiedades inmunomoduladoras, incluidos fucooidanos, fucosterol y florotaninos, que son responsables de regular la señalización inmunitaria y la actividad antiinflamatoria (Liu, J et al, 2020). Por ejemplo, un estudio realizado por Fitton *et al.* (2015) encontró que los fucooidanos extraídos de algas pardas inhibieron la producción de citocinas proinflamatorias, como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina-6 (IL-6), en células inmunes *in vitro*, lo que sugiere su capacidad para modular la respuesta inflamatoria y Kim *et al.* (2017) encontró que un polisacárido sulfatado de algas pardas aumentaba la actividad fagocítica de los macrófagos y la proliferación de linfocitos en cultivos celulares, lo que sugiere su capacidad para activar la respuesta inmune mediante la activación de células clave del sistema inmunológico; sin embargo, para *Sargassum buxifolium* y sus efectos en el sistema inmunológico, es un campo que comienza a ser estudiado.

El óxido nítrico en macrófagos es sintetizado en respuesta a la activación de estos al fenotipo M1; sin embargo, se desconocía si el extracto de *SabuCh-W* puede regular la secreción de óxido nítrico en macrófagos residentes (no activados) y activados con

LPS, el cual se considera un PAMP, provocando una activación del sistema inmunológico al simular un agente infeccioso.

Los resultados de este trabajo demuestran que los macrófagos residentes presentan un mayor estado de activación que se representa en una elevada secreción de óxido nítrico cuando se les añade el extracto de *SabuCh-W*, ya que en la cuantificación de nitritos se puede observar un aumento progresivo conforme al tiempo en cultivo y en comparación con el grupo de residentes sin *SabuCh-W*, los cuales se mantuvieron estables conforme al tiempo con una mínima cantidad secretada de óxido nítrico.

Por otro lado, los macrófagos activados con LPS que se les añadió el extracto de *SabuCh-W* presentan un mayor estado de activación, reflejado en el aumento de la cuantificación de nitritos conforme pasa el tiempo en comparación con los que sólo fueron activados, pero no se les añadió *SabuCh-W*, ya que estos presentan una ligera disminución; sin embargo, su cuantificación de nitritos demuestra que el estado de activación del grupo que activado con LPS, a pesar de que se considera a esta molécula como un potente estimulador del sistema inmune, es menor que los grupos del LPS + *SabuCh-W* y residentes + *SabuCh-W*.

Una vez confirmado que el extracto de *SabuCh-W* tiene un efecto en macrófagos al regular la secreción de óxido nítrico, se procedió a evaluar la expresión del receptor CD16, el cual es un receptor de membrana que, al expresarse de forma elevada, se relaciona directamente con el estado de activación de los macrófagos.

De esta forma, los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, en los histogramas se demuestra que la expresión del receptor CD16 es mucho mayor en macrófagos residentes que se les añadió *SabuCh-W* mostrando sus picos más altos en 10^5 , en relación a los grupos de LPS y LPS + *SabuCh-W*, que se mantuvieron aproximadamente en 10^4 . A pesar de que mostraron variaciones en el tiempo conforme al nivel de expresión del receptor, en general, los resultados obtenidos son paralelos entre la secreción de óxido nítrico y la expresión del receptor CD16 por lo que se relaciona que la Fracción 6 del extracto de *Sargassum buxifolium* es un potente activador del sistema inmunológico mucho más efectivo que el LPS.

De forma indirecta, estos resultados nos sugieren que el extracto de *SabuCh-W* contiene diferentes compuestos bioactivos y metabolitos que poseen propiedades inmunomoduladoras que son potencialmente aplicables para estimular la respuesta inmunitaria o controlar la actividad de las células inmunitarias y de igual forma, estos

compuestos también pueden afectar múltiples objetivos en los mecanismos inmunológico que son importantes para el sistema inmune.

En general, los resultados de este trabajo son un primer paso en descubrir los efectos de SabuCh-W en el sistema inmunológico, ya que demuestran que la Fracción 6 del extracto de *Sargassum buxifolium* tiene propiedades inmunoregulatoras; por lo que se recomienda hacer estudios más profundos del extracto del *SabuCh-W* y su mecanismo de acción para poder determinar el alcance de sus efectos sobre células inmunitarias.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo demuestran que el *SabuCh-W* provoca altos niveles de óxido nítrico en macrófagos residentes (no activados) en comparación con los activados con LPS. Esto se ve reflejado de forma paralela en el aumento de la expresión de CD16 en este grupo, aumentando de forma gradual a las 4, 8 y 12 hrs, por lo que se deduce que la Fracción 6 del extracto de *Sargassum buxifolium* es un potente activador del sistema inmunológico en un modelo de macrófagos murinos y esto es un primer paso para continuar con estudios para evaluar el potencialmente aplicable uso para estimular la respuesta inmunitaria.

PERSPECTIVAS

La fracción 6 del extracto de *Sargassum buxifolium* modula el sistema inmune al estimular la sobreactivación de estas células; sin embargo, se requiere profundizar en más estudios para confirmar los resultados obtenidos y confirmar su actividad inmunoreguladora. Por lo tanto, se proponen las siguientes perspectivas:

- Evaluar el efecto de *SabuCh-W* en los grupos de estudios a través de marcadores de citocinas Th1 y Th2 para confirmar profundizar en el estudio de la acción de *SabuCh-W* en el sistema inmunológico.
- Caracterizar y aislar los compuestos bioactivos de la Fracción 6 de *Sargassum buxifolium* para determinar las moléculas que presentan actividad inmunoreguladora.
- Evaluar el efecto de *SabuCh-W* en otras células del sistema inmunológico para determinar el alcance de sus efectos inmunoreguladores sobre células inmunitarias.

ANEXOS

- **Preparación de los Reactivos de Griess.**

El reactivo de Griess se prepara mezclando una solución de sulfanilamida (2% p/v en 5% HCl) con una solución de N-1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro (0,1% p/v en 5% de HCl).

Para ello, se preparó inicialmente el Reactivo 1 (Sulfanilamida) realizando una solución de HCL al 5% al mezclar 150 ml de agua miliQ y aforarla con 7.5 ml de HCL. Una vez obtenida esta solución se utilizó la formula:

$$\%P/V=(g \text{ soluto/ml disolución}) \times 100$$

Una vez sustituidos los valores de la formula y realizado los cálculos correspondientes, se disolvieron 1.3 g de Sulfanilamida en los 150 ml de HCL al 5% y el resultado fue el Reactivo 1.

Posteriormente, se preparó el Reactivo 2 (N-1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro) realizando una solución de HCL al 5% al mezclar 150 ml de agua miliQ y aforarla con 7.5 ml de HCL.

Una vez obtenida esta solución se utilizó la formula:

$$\%P/V=(g \text{ soluto/ml disolución}) \times 100$$

Con lo cual, se disolvieron 0.15 g de N-1-(naftil) etilendiamina en los 150 ml de HCL al 5% y el resultado fue el Reactivo 2.

Para utilizar el ensayo de Griess, en oscuridad se colocaron 60 μ l de la muestra a analizar (medio sobrenadante) en una placa de 90 pozos y se le añadieron 30 μ l del Reactivo 1 (Sulfanilamida) dejando actuar durante 10 minutos y posteriormente se añadieron 30 μ l del Reactivo 2 (N-1-(naftil) etilendiamina) y se dejó actuar duran 40 minutos en un agitador de bandeja.

Pasado ese tiempo se leyó en un Espectrofotómetro a 540 nm.

Cabe destacar que ambas soluciones se prepararon en oscuridad y se almacenaron a 4 °C protegidas de la luz en frascos ámbar para mantenerse estables.

- **Preparación del Medio RPMI 1640 suplementado con *SabuCh-W*.**

De la Tesis de Rubí Santiago (2012) obtuvo que la Fracción 6 fue la segunda en presentar mayor actividad citostática mostrada en el IC50 para la línea celular INBL a una dilución 1:1,194,540.

Para ello se realizó la dilución de la F6 del extracto de *SabuCh-W* a la dilución antes mencionada en Medio RPMI 1640 al 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) y se almacenó en tubos nuevos y estériles a 4 °C protegida de la luz.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adarmes H, JP Solís, A Müller, M Galleguillos. (2009). Determinación de nitrito como metabolito estable del óxido nítrico en el líquido sinovial de articulación metacarpofalángica equina. Arch Med Vet 41, 255-259
- Alvarez M. y Gallardo T., (1989). Una revisión sobre la biotecnología de las algas. Universidad Complutense, E-28040 Madrid. Recuperado el 22 de mayo de 2023, de: <https://revistas.ucm.es/index.php/BOCM/article/download/BOCM8989220009A/6559>
- Ayyad, SE, Ezmirly, ST, Basaif, SA, Alarif, WM, Badria, AF y Badria, FA (2011). Metabolitos antioxidantes, citotóxicos, antitumorales y protectores del daño al ADN del alga parda del mar rojo *Sargassum* sp. Investigación de farmacognosia , 3 (3), 160–165. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.85000>
- Anusree Maneesh y Kajal Chakraborty (2017). Unprecedented antioxidative and anti-inflammatory aryl polyketides from the brown seaweed *Sargassum wightii*, Food Research International, DOI: 10.1016/j.foodres.2017.07.006
- Barros C., Kimiko R., Machado A., Gerola L. y Salomao R. (2011). Citocinas y Dolor. Revista Brasileira de Anestesiología. Vol. 61, No 2, 137-142 Recuperado de: <https://www.scielo.br/j/rba/a/xZBcm3rwxnknt94Gz9yq5Lq/?format=pdf&lang=es>
- Bermúdez-Morales, Víctor Hugo, Peralta-Zaragoza, Oscar, & Madrid-Marina, Vicente. (2005). Terapia génica con citocinas contra cáncer cervicouterino. Salud Pública de México, 47(6), 458-468. Recuperado en 17 de mayo de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342005000600011&lng=es&tlng=es
- Callejas J., Aomar I., Moreno M., Muñoz L., López M. y Ceballos A. (2020). Tratamiento y evolución del síndrome de tormenta de citoquinas asociados a infección por SARS-CoV-2 en pacientes octogenarios. National Library of Medicine. doi: 10.1016/j.regg.2020.05.004. [8802011000200001&lng=es&tlng=es.](https://doi.org/10.1016/j.regg.2020.05.004)

- Catarino, M. D., Silva-Reis, R., Chouh, A., Silva, S., Braga, S. S., Silva, A. M. S., & Cardoso, S. M. (2023). Applications of Antioxidant Secondary Metabolites of *Sargassum* spp. *Marine drugs*, 21(3), 172. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.3390/md21030172>
- Comalada M. (2002). Decisiones en los macrófagos: proliferar, activarse o morir. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona.
- Courtney B. Crayane, Sabrin Albeituni, Kim E. Nichols and Randy Q. Cron (2019). The Immunology of Macrophage Activation Syndrome. *Revista Frontiers in Immunology*. Doi: 10.3389
- Cuellar P., Martha Solís O., Sánchez M., García R. y Arias S., (2010). El óxido nítrico: una molécula biológica llena de contrastes. Universidad de Guanajuato. Vol. 20 Número Especial 3. pp 29. https://www.researchgate.net/publication/260318065_El_oxido_nitrico_una_molecula_biologica_llena_de_contrastes/fulltext/037102a50cf29d312187ef21/El-oxido-nitrico-una-molecula-biologica-llena-de-contrastes.pdf.
- Díaz Díaz, Rosario Marcia; Mejía Medrano, Sandra Jimena; Huerta de Mora, Octavio Julio; Huerta Acha, Edwin Adolfo. (2009). Óxido Nítrico: La diversidad de sus efectos sistémicos. *Revista Científica Ciencia Médica*, vol. 12, núm. 1, pp. 35-38
- Echeverri, D. MD., Fontanilla M., QF, Buitrago L., MB. (2004). El macrófago en enfermedad vascular ¿El enemigo oculto? *Revista Colombiana de Cardiología*. Vol. 11 No. 3, 164-174. Recuperado el 04 de mayo de 2023, de <http://www.scielo.org.co/pdf/rcca/v11n3/v11n3a5.pdf>
- ECHAVARRÍA Z, Bibiana, FRANCO S, Andrea & MARTÍNEZ M, Alejandro. (2009). Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del Caribe Colombiano. *Vitae* , 16 (1), 126-131. Recuperado el 25 de mayo de 2023, de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042009000100015&lng=en&tlng=es.
- El-Haj, L., & Bestle, M. H. (2017). *Ugeskrift for laeger*, 179(44), V01170086.
- Filellaa, X., Molinaa, R. y Ballestaa AM (2002). Estructura y función de las citocinas. *Revista de Medicina Integral*. Vol. 39. Núm. 2. Páginas 63-71. Recuperado de: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-estructura-funcion-citocinas-13026682>

- Filippo D. (2014). Tesis: VARIACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ALGA CAFÉ *Sargassum horridum* (SETCHELL & N. L. GARDNER, 1924) DE LA BAHÍA DE LA PAZ, B.C.S., MÉXICO. INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL. CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS. Recuperado el 25 de septiembre de 2022, de: <https://repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/19990/1/difilippoh1.pdf>
- Fitton, J. H., Stringer, D. N., Karpiniec, S. S., & Therapondos, G. (2015). Peroxide scavenging activity of fucoidan from *Fucus vesiculosus* and *Fucus spiralis*. *Marine Drugs*, 13(2), 760-775.
- Frikha, F, Kammoun, M, Hammami, N, Mchirgui, RA, Belbahri, L, Gargouri, Y, Miled, N, & Ben-Rebah, F. (2011). Composición química y algunas actividades biológicas de algas marinas recolectadas en Túnez. *Ciencias marinas*, 37(2), 113-124. Recuperado en 08 de enero de 2024, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-3
- Gao, J., Liang, Y., & Wang, L. (2022). Shaping Polarization Of Tumor-Associated Macrophages In Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology*, 13, 888713. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.3389/fimmu.2022.888713>
- García-García, Annie May Ek, Cabrera-Becerril, Ernesto, Núñez-Resendiz, María Luisa, Dreckmann, Kurt M., & Senties, Abel. (2021). Actualización taxonómica de las algas pardas (Phaeophyceae, Ochrophyta) marinas bentónicas del Atlántico mexicano. *Acta botánica mexicana*, (128), e1968. Epub 28 de febrero de 2022. <https://doi.org/10.21829/abm128.2021.1968>
- García A., Fuentes R., Torres M., Fernández M, y Charróo. (2003). Revista Información Científica "Investigación y comunicación de excelencia en ciencias de la salud" Vol. 37, No. 1. Recuperado el 04 de mayo de 2023, de: <https://revinfcientifica.sld.cu/index.php/ric/article/view/1597#:~:text=El%20%C3%B3xido%20n%C3%ADtrico%2C%20considerado%20un,macr%C3%B3fagos%20y%20numerosas%20c%C3%A9lulas%20neurales>
- Gorocica P., Chávez R., Lascurain R., Espinosa B. y Zenteno E. (1999). Óxido nítrico, una molécula multifuncional. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex Volumen 12 - número 4*, Págs. 300-304.
- Goshi, E., Zhou, G., & He, Q. (2019). Nitric oxide detection methods in vitro and in vivo. *Medical gas research*, 9(4), 192–207. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.4103/2045-9912.273957>

- Gutiérrez R., González K., Valdés O., Hernández Y. & Acosta Y.(2016). Algas marinas como fuente de compuestos bioactivos en beneficio de la salud humana: un artículo de revisión. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*. Vol. XVIII Num. (3): 20-27. Recuperado el 08 de enero de 2024 de: <https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/view/331/208>.
- Hernández Loyo, N. A. (2021). Estado de hipercoagulabilidad y complicaciones tromboembólicas en el paciente con infección por SARS-CoV-2. *Revista Diversidad Científica*, 1(1), 15–24. DOI: <https://doi.org/10.36314/diversidad.v1i1>.
- Janeway, Jr et al (2000). *Inmunobiología*. Masson, SA. ISBN 84-458-1176-2.
- Kim, J. H., Kim, M. Y., Kim, J. Y., Kim, E. K., Choi, W. H., & Park, J. Y. (2017). Sulfated polysaccharides extracted from brown seaweed *Sargassum fulvellum* exert anti-adipogenic effects in vitro and in vivo. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 530-537.
- Labster Theory (2021). Pared celular gram negativa. Recuperada el 17 de mayo de 2023, de: <https://theory.labster.com/gram-negative-bacteria-es/>
- León D., Candelaria C.,Hernández P. y León H. (2017). Géneros de algas marinas tropicales de México: I. Algas verdes. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado el 22 de mayo de 2023, de: <http://www.librosoa.unam.mx/bitstream/handle/123456789/246/Libro%20Algas%20Verdes.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- León D. y Nuñez M. (2017). Géneros de algas marinas tropicales de México: II. Algas Pardas. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado el 22 de mayo de 2023, de: <http://www.librosoa.unam.mx/bitstream/handle/123456789/249/Libro%20Algas%20Pardas.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Li, Y., Zheng, Y., Zhang, Y., Yang, Y., Wang, P., Imre, B., Wong, A. C. Y., Hsieh, Y. S. Y., & Wang, D. (2021). Brown Algae Carbohydrates: Structures, Pharmaceutical Properties, and Research Challenges. *Marine drugs*, 19(11), 620. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.3390/md19110620>
- Liu, J., Luthuli, S., Wu, Q., Wu, M., Choi, J. I., & Tong, H. (2020). Pharmaceutical and Nutraceutical Potential Applications of *Sargassum fulvellum*. *BioMed research international*, 2020, 2417410. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1155/2020/2417410>

- Martínez J. (2018). Generalidades del lipopolisacárido como inductor de lesión en la enfermedad causada por bacterias gram negativas. Trabajo de grado. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales. Bogotá, Colombia.
- Martínez, M., Rodríguez, A. , & Cejas , H. (2001). Las células del sistema inmune accesorio . Revista De La Facultad De Ciencias Médicas De Córdoba, 58(1), 9–28. <https://doi.org/10.31053/1853.0605.v58.n1.37066>
- Mihai Stoian Andrei (2019). Métodos de transfección en macrófagos peritoneales de ratones ApoE K.O. Trabajo fin de grado en Biotecnología. Universidad Zaragoza.
- Montoya I, Montoua L. y Rojas S. (2022). Bournut Estudiantil por COVID-19. Un estudio en Universidades Colombianas. PANORAMA, vol. 16, núm. 30. DOI: <https://doi.org/10.15765/pnrm.v16i30.3131>. Recuperado el 21 de Octubre de 2023.
- Moreira Lopes, TC, Mosser, DM & Gonçalves, R. (2020). Polarización de macrófagos en inflamación intestinal y homeostasis intestinal. inflamación Res. 69 , 1163–1172 <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/s00011-020-01398-y>
- Murillo J., Muñoz M., Marín A., Ánguas B. y Contreras M. (2011). “(SIP 20111014) Estudio del Potencial de Aplicación Biomédica y Ambiental de Algas del Género Sargassum y Enteromorpha Colectadas en el Golfo de California” Instituto Politécnico Nacional. Secretaría de Investigación y Posgrado. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Recuperado de: http://www.sappi.ipn.mx/cgpi/archivos_anexo/20111014_10138.pdf
- Núñez Cuadros E, Galindo Zavala R, Díaz-Cordovés Rego G.(2020). Síndrome de activación macrofágica.Sociedad española de reumatología pediátrica. SSN 2171-8172.
- Nuñez E., Galindo R., Díaz-Cordovés G. (2020). Síndrome de activación macrofágica. Unidad de Reumatología Pediátrica. UGC Reumatología. Hospital Regional Universitario de Málaga. Málaga. Sociedad española de reumatología pediátrica. ISSN 2171-8172.
- Ochoa-Carrillo & Bravo-Cuellar (2013). Los macrófagos, ángeles o demonios. Gaceta mexicana de Oncología. GAMO Vol. 12 Núm. 1. Recuperado el 12 de enero de 2024 de: <https://www.elsevier.es/es-revista-gaceta-mexicana-oncologia-305-pdf-X1665920113933087>.

- Ochoa F. & Bravo A. (2013). Los macrófagos, ángeles o demonios. *Gaceta Mexicana de Oncología*. GAMO Vol. 12 Núm. 1, pp. 1-3. Recuperado el 09 de mayo de 2023, de: <https://www.gamo-smeo.com/temp/GAMO%20V12%20No%201%20enero-febrero%202013.pdf#page=5>
- Parra-Izquierdo, Viviana, Flórez-Sarmiento, Cristian, & Romero-Sánchez, Consuelo. (2020). Inducción de “tormenta de citocinas” en pacientes con SARS-CoV-2 y desarrollo de COVID-19. ¿Tiene el tracto gastrointestinal alguna relación en la gravedad?. *Revista colombiana de Gastroenterología* , 35 (Suplemento 1), 21-29. <https://doi.org/10.22516/25007440.539>
- Peng Li, Huayang Wang, Qianqian Shao, Beihua Kong y Xun Qu. (2017). Fucoïdan modulates cytokine production and migration of THP-1-derived macrophages via colony-stimulating factor-1. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6228>. Recuperado el 22 de septiembre de 2022, de: <https://www.spandidos-publications.com/mmr/15/4/2325>
- Perez-Neri I., (2015). Casi todo sobre el óxido nítrico. *Arch Neurocién (Mex) INNN* Vol. 20, 271-280. Recuperado el 04 de mayo de 2023, de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/arcneu/ane-2015/ane154g.pdf>
- Pérez Ruiz, Andrés, Rodríguez Calzadilla, Amado, Sanjurjo Gómez, Vivian M. y Padrón Chacón, Raúl. (1997). El papel del óxido nítrico en la hemodinámica, hemostasia e inflamación. *Revista Cubana de Estomatología*, 34(2), 84-86. Recuperado en 04 de mayo de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75071997000200007&lng=es&tlng=es.
- Queiroz, K. C., Medeiros, V. P., Queiroz, L. S., Abreu, L. R., Rocha, H. A., Ferreira, C. V., Jucá, M. B., Aoyama, H., & Leite, E. L. (2008). Inhibition of reverse transcriptase activity of HIV by polysaccharides of brown algae. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 62(5), 303–307. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2008.03.006>
- Quitral R, Vilma, Morales G, Carla, Sepúlveda L, Marcela, & Schwartz M, Marco. (2012). Propiedades nutritivas y saludables de algas marinas y su potencialidad como ingrediente funcional. *Revista chilena de nutrición* , 39 (4), 196-202. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182012000400014>

- Rada, Elsa, Marzal, Miguel, Aranzazu, Nacarid, y Convit, Jacinto. (2003). Incremento de óxido nítrico en el suero y sobrenadantes de cultivo de células mononucleares de pacientes con la enfermedad de Hansen en estado reaccional tipo II.. *Investigación Clínica*, 44(2), 129-136. Recuperado el 04 de mayo de 2023, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332003000200006&lng=es&tlng=es.
- Radulovic, K., Mak'Anyengo, R., Kaya, B., Steinert, A., & Niess, J. H. (2018). Injections of Lipopolysaccharide into Mice to Mimic Entrance of Microbial-derived Products After Intestinal Barrier Breach. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (135), 57610. <https://doi.org/10.3791/57610>
- Rojas N. (1995) El lipopolisacárido bacteriano: una potente endotoxina con múltiples actividades biológicas. *Revista costarricense de Ciencias Médicas*. 71-84 Recuperado el 04 de mayo de 2023, de: <http://hdl.handle.net/20.500.11764/3466>
- Rushdi, M. I., Abdel-Rahman, I. A. M., Saber, H., Attia, E. Z., Abdelraheem, W. M., Madkour, H. A., Hassan, H. M., Elmaidomy, A. H., & Abdelmohsen, U. R. (2020). Pharmacological and natural products diversity of the brown algae genus *Sargassum*. *RSC advances*, 10(42), 24951–24972. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1039/d0ra03576a>
- Saldana J. (s.f.). Macrófagos. Recuperado el 03 de mayo de 2023 de: <https://www.immunology.org/es/public-information/inmunolog%C3%ADa-bitesized/celulas/macrofagos>
- Santiago R. (2014). Determinación del ARNm para citocromo c en líneas celulares de cacu, cultivadas en presencia del extracto de *Sargassum buxifolium* (Chauvin) M.J. Wynne. *Catálogo de tesis TESIUNAM*. Recuperado el 08 de enero de 2024 de: <http://132.248.9.195/ptd2014/junio/0714780/Index.html>
- Saraswati, Giriwono, P. E., Iskandriati, D., Tan, C. P., & Andarwulan, N. (2019). *Sargassum* Seaweed as a Source of Anti-Inflammatory Substances and the Potential Insight of the Tropical Species: A Review. *Marine drugs*, 17(10), 590. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.3390/md17100590>
- Stempin C., & Cerbán, F. (2007). Macrófagos e inducción de arginasa como mecanismo de evasión de parásitos. *Medicina (Buenos Aires)*, 67(6), 737-746.

Recuperado en 03 de mayo de 2023, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802007000600015&lng=es&tlng=pt.

- Sun, Y., Li, J., Xie, X., Gu, F., Sui, Z., Zhang, K., & Yu, T. (2021). Macrophage-Osteoclast Associations: Origin, Polarization, and Subgroups. *Frontiers in immunology*, 12, 778078. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.3389/fimmu.2021.778078>
- Thomas D. N. (2002). *Seaweeds*. Smithsonian Institution Press in association with the Natural History Museum London.
- Tortora G. & Derrickson B. (2006). *Principios de anatomía y fisiología*. Madrid, España. Editorial Médica Panamericana, SA. de C.V.
- Wunderlich M., Stockman C., Devarajan M., Ravishankar N., Sexton C., Kumar S., Mizukawa y Mulloy B. (2016). Un modelo de xenoinjerto de síndrome de activación de macrófagos susceptible de tratamiento con anti-CD33 y anti-IL-6R. *JCI Insight*. 2016;1(15):e88181. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.88181>. Recuperado el 21 de Noviembre de 2023.