

UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE EVALUACION PROFESIONAL



“EFECTOS DE LA ASTAXANTINA EN LA HISTOMORFOLOGÍA HEPÁTICA DE RATONES SOMETIDOS A ESTRÉS CRÓNICO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE MEDICO CIRUJANO

PRESENTA:

M.P.S.S ARANTXA MEDINA BRAVO

DIRECTOR DE PROTOCOLO:

DR. EN C. RIGOBERTO OROS PANTOJA

REVISORES:

DRA. EN. C. ALEJANDRA DONAJI BENITEZ ARCINIEGA

DRA. EN. C. KEILA ISAAC OLIVE

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, 2022

“EFECTOS DE LA ASTAXANTINA EN LA HISTOMORFOLOGÍA HEPÁTICA DE
RATONES SOMETIDOS A ESTRÉS CRÓNICO”

INDICE

RESUMEN	7
1. MARCO TEORICO.....	10
1.1 INTRODUCCION	10
2. EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-ADRENAL.....	11
3. ESTRÉS.....	14
3.1 RADICALES LIBRES	17
3.2 ANTIOXIDANTES.....	19
3.3 ASTAXANTINA	20
4. HIGADO	26
4.1 ANATOMOFISIOLOGIA DEL HÍGADO	26
4.2 HISTOLOGIA.....	28
5. ENFERMEDAD HEPÁTICA POR ESTRÉS OXIDATIVO.....	31
6. CAMBIOS HISTOMORFOLOGICOS EN ENFERMEDAD HEPATICA POR ESTRÉS OXIDATIVO	33
7. EFECTO DE ANTIOXIDANTES EXÓGENOS EN ENFERMEDAD HEPÁTICA.....	33
8. EFECTO DE LA ASTAXANTINA EN LA ENFERMEDAD HEPATICA POR ESTRÉS OXIDATIVO	34
9. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
10. JUSTIFICACIÓN.....	37
11. HIPOTESIS	38
12. OBJETIVOS.....	39
12.1 Objetivo General	39
12.2 Objetivos Específicos.....	39
13. MÉTODO	39
13.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	39
13.3 UNIVERSO DE TRABAJO Y MUESTRA	40
13.4 INSTRUMENTO DE INVESTIGACIÓN.....	40
13.5 DESARROLLO DEL PROYECTO	41
13.6 LÍMITE DE TIEMPO Y ESPACIO.....	45

13.7 CRONOGRAMA	45
13.8 DISEÑO DE ANÁLISIS.....	46
14. IMPLICACIONES ÉTICAS.....	46
15. RESULTADOS	47
16. DISCUSIONES.....	59
17. CONCLUSIONES	61
18. RECOMENDACIONES	62
REFERENCIAS	63

RESUMEN

En la cotidianidad de la vida el estrés es una constante en el día a día de millones de personas, en su regulación participa el sistema nervioso simpático y el eje hipotálamo-hipofisis-adrenal coordinando la respuesta basal ante estímulos estresantes con la finalidad de mantener la homeostasis; una vez que se pierde el equilibrio antioxidante se desarrolla el estrés oxidativo, el cual, condiciona una producción excesiva de radicales libres que al interactuar con biomoléculas causan estragos importantes en la función y estructura celular, tal daño puede propiciar o exacerbar el desarrollo de enfermedades agudas o crónicas degenerativas. Se sabe que los antioxidantes exógenos pueden ser útiles para compensar la sobreproducción de radicales libres, revirtiendo o evitando los estragos del estrés oxidativo; siendo la astaxantina un potente antioxidante de la naturaleza se pretende demostrar que el suministrarla a ratones sometidos a estrés crónico dicho compuesto ofrezca un efecto hepatoprotector.

Hipótesis: El estrés crónico desencadena la liberación de radicales libres por medio del estrés oxidativo, causando daño molecular, estructural y funcional a nivel hepático. Por ende, la suplementación con astaxantina podría minimizar los efectos del estrés y presentar cambios favorecedores a nivel hepático en la histomorfológica en ratones sometidos a estrés crónico.

Objetivo: Demostrar histopatológicamente el efecto hepatoprotector de la astaxantina ante el estrés crónico.

Método: Durante un periodo de 12 meses, se emplearon 28 ratones CD1 distribuidos en cuatro grupos experimentales (n=7) 1.- controles sanos; 2.- sometidos a estrés crónico por restricción del movimiento (3 horas, dos veces por semana), 3.- estresados y suplementados con astaxantina, 4.- suplementados con astaxantina (4mg/kg). A fin de evaluar la histomorfológica hepática, se realizaron tinciones con H&E, reacción PAS y tricrómica de Masson. Para el análisis se evaluaron las características histomorfológicas en las muestras de cada grupo.

Resultados: Se demostró que el estrés provoca cambios histomorfológicos que pueden ser sugestivos de daño hepático y envejecimiento precoz. Se evidenciaron cambios por inflamación crónica como zonas de degeneración celular, procesos apoptóticos, infiltración leucocitaria, aumento de la concentración intracelular de glucógeno y fibrosis hepática en los grupos sometidos a estrés, mientras que los grupos suplementados con astaxantina muestran actividad regenerativa y conservan una arquitectura histológica fisiológica.

Conclusión: El estrés crónico provoca cambios sugestivos de daño hepático y envejecimiento precoz, mientras que la suplementación con astaxantina tiene

efectos hepatoprotectores tanto para las condiciones propias del envejecimiento como para el estrés crónico agregado.

ABSTRACT

Introduction: In everyday life, stress is a constant in the day-to-day life of millions of people, the sympathetic nervous system and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis participate in its regulation coordinating the baseline response to stimulus stressful in order to maintain homeostasis; once it is lost and antioxidant balance develops oxidative stress, which, conditions an excessive production of free radicals, when interacting with biomolecules, causes major havoc on cell function and structure, such damage can lead to or exacerbate the development of acute or chronic degenerative diseases. Exogenous antioxidants are known to be able to be useful to compensate for the overproduction of free radicals, reversing or avoiding the ravages of oxidative stress; astaxanthin being a powerful antioxidant of nature, it is intended to demonstrate that supplying it to mice subjected to chronic stress that compound offers a hepatoprotective effect.

Hypothesis: Chronic stress triggers the release of free radicals through oxidative stress, causing molecular, structural and functional damage at the liver. Therefore, supplementation with astaxanthin could minimize the effects of stress and present favorable changes at the liver level in the histomorphological in mice subjected to chronic stress.

Objective: To demonstrate histopathologically the hepatoprotective effect of astaxanthin in the face of chronic stress.

Method: During a period of 12 months, 28 CD1 mice were used distributed in four experimental groups (n=7) 1.- healthy controls; 2.-subjected to chronic stress due to restriction of movement (3 hours, twice a week), 3.- stressed and supplemented with astaxanthin(4mg/kg), 4.- supplemented with astaxanthin (4mg/kg). In order to evaluate the hepatic histomorphology, stains were performed with H&E, PAS reaction and Masson's trichrome. For the analysis, the histomorphological characteristics in the samples of each group were evaluated.

Results: It was shown that stress causes histological changes that may be suggestive of liver damage and premature aging. Changes due to chronic inflammation such as areas of cell degeneration, apoptotic processes, leukocyte infiltration, increased intracellular glycogen concentration and liver fibrosis were evident in stress groups, while groups supplemented with astaxanthin show regenerative activity and retain a physiological histological architecture.

Conclusion: Chronic stress causes changes suggestive of liver damage and early aging, while astaxanthin supplementation has hepatoprotective effects for both the conditions of aging and for aggregate chronic stress.

1. MARCO TEORICO

1.1 INTRODUCCION

El estrés es una de las respuestas fisiológicas más primitivas e indispensables para la supervivencia del ser humano, sobre todo ante situaciones de miedo, peligro o tensión. Está regulado por mecanismos neuroendocrinos complejos que permiten conservar la homeostasis, sin embargo, cuando se vuelve excesivo se pierde la misma, lo que provoca daño sistémico que se traduce en deficiencia funcional y enfermedad.

De manera aguda, el estrés desencadena respuestas fisiológicas (reacción de alarma o carga alostática) que son imprescindibles para los mecanismos de supervivencia, lo que permite una adaptación benéfica (eustres o allostasis), sin embargo, de manera crónica (distrés) el estrés se relaciona con el desarrollo y agudización de cientos de patologías que en el ámbito médico a menudo resultan subdiagnosticadas. La manifestación de efectos adversos puede ser variable y depende de la susceptibilidad de cada individuo.

A lo largo de la historia, el ser humano siempre ha estado expuesto a diferentes situaciones estresantes, las cuales evolucionaron tan deprisa como la globalización. En la actualidad el ritmo de vida exige una velocidad incompatible con las capacidades vitales para mantener un equilibrio ante el estrés. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, México ocupa el primer lugar a nivel mundial en estrés laboral, en donde el 75% de trabajadores mexicanos desarrollan Síndrome de Burnout. Aunado a la presión social, la falta de oportunidades, desempleo, inseguridad, delincuencia, corrupción, y demás problemas sociales, provocan síndromes ansiosos y depresivos que son la psicopatología más frecuente en la práctica clínica. Tan solo hace 20 años, el 14.8% de la población presentaba trastornos de ansiedad; sin embargo, en la actualidad se espera que este porcentaje se eleve de forma exponencial debido a problemáticas actuales como la pandemia por SARS-Cov2 y las recesiones económico-laborales subsecuentes. En este contexto, se espera una exacerbación de múltiples patologías somáticas, físicas, tanto agudas como crónicas, de allí la importancia de un adecuado entendimiento y abordaje en el control del estrés para minimizar sus efectos y secuelas.

2. EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-ADRENAL

El sistema nervioso autónomo, endocrino e inmune juegan un papel determinante en la regulación fisiológica ante el estrés. El Dr. Hans Selye es el fundador de la teoría del estrés, quien lo describió como “la respuesta no específica del cuerpo a cualquier demanda”, desde sus primeras descripciones el Dr. Selye refiere como hallazgo clínico característico la involución tímica y de ganglios linfáticos, acompañado de ulceración gástrica e hipertrofia suprarrenal, describiendo así la interacción de estos sistemas como respuesta ante el estrés. (6)

Actualmente se sabe que el estrés condiciona una mayor susceptibilidad a infecciones y sus respectivas complicaciones, secundario a las alteraciones en la señalización molecular y celular del sistema inmune, tales consecuencias son desde un incremento en el tiempo de curación de las heridas, hasta el desarrollo de tumores y una importante incompetencia del sistema inmune. (8)(9)

La regulación de la respuesta inicial ante el estrés está mediado por la activación del sistema simpático y del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal comenzando con la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) desde el núcleo paraventricular que actúa en las células corticotropas de la adenohipófisis estimulando la secreción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), cuyo órgano blanco es la corteza de las glándulas suprarrenales (fasciculada y reticular) induciendo la producción de glucocorticoides, principalmente el cortisol.(3)(12)

Fisiológicamente las catecolaminas tienen múltiples efectos entre los más estudiados es el aumento de la frecuencia cardíaca y respiratoria, modulan la vasoconstricción, la dilatación pupilar, favorecen la movilización de los ácidos grasos y la coagulación sanguínea como parte de la respuesta inicial ante el estrés. (3)(14)

Por otro lado, los glucocorticoides pueden resultar contraproducentes una vez que su secreción es constante durante un periodo crónico pues reducen la función de las células del sistema inmune, incrementan los niveles séricos de triglicéridos y colesterol, aumenta la presión arterial, la producción del ácido gástrico, la excreción a nivel renal de potasio y magnesio, a su vez inhiben la actividad de la vitamina D, también presentan un efecto hipoglucemiante secundario al aumento de la gluconeogénesis a nivel hepático y disminuyen la actividad de las hormonas sexuales, como consecuente afecta directamente la capacidad reproductiva del individuo. (30)

Los corticoesteroides son producidos en la glándula suprarrenal, la corteza es responsable de segregar mineralocorticoides principalmente la aldosterona y corticosterona los cuales regulan los niveles hidro salinos del organismo; los

glucocorticoides más representativos son el cortisol y la cortisona, responsables del metabolismo de los hidratos de carbono; por otro lado los andrógenos también son liberados en la corteza suprarrenal; mientras que la medula de la glándula suprarrenal libera las catecolaminas, las cuales son predominantes durante la respuesta aguda ante el estrés. (31)

2.1 CORTISOL

El cortisol es una hormona glucocorticoide producida en la corteza de la glándula suprarrenal, su síntesis y liberación está modulada por estímulos centrales (hormona adrenocorticotropa) y periféricos (sistema adrenérgico) como parte de la respuesta fisiológica al estrés agudo o crónico. (6)

Una vez en sangre el 75-80% está unido a una proteína transportadora (transcortina) y el resto se encuentra libre. Se metaboliza en el hígado y sus productos se excretan por vía renal y biliar. (17) (27)

Las funciones del cortisol se ejercen a través de mecanismos genómicos regulando la expresión de genes específicos a través de la interacción directa con el ADN y por mecanismos no genómicos a través de proteínas que actúan en los procesos de transcripción. (18)

Así mismo, actúa a nivel de diferentes funciones vitales relacionadas con el metabolismo energético, el control de la volemia, modulación inmunológica, crecimiento, mineralización ósea e incide en respuestas del sistema nervioso central y autónomo. (18)

En el humano la síntesis promedio de cortisol es de 5mg/m²/día, equivalente a 10 mg/m²/día, en situaciones de estrés la síntesis puede aumentar a 100 mg/m²/día. (13)

Tabla 1. EFECTOS FISIOLÓGICOS DEL CORTISOL

Metabolismo	<ul style="list-style-type: none">• Promueve gluconeogénesis hepática• Aumenta la resistencia periférica a la insulina• Aumenta la producción de ácidos grasos libres• Disminuye la formación de hueso• Disminuye la masa ósea• Efecto adipogénico de predominio visceral
--------------------	--

Cardiovascular y renal	<ul style="list-style-type: none"> • Promueve la retención hidrosalina
Sistema endocrino	<ul style="list-style-type: none"> • Disminuye la liberación de gonadotrofinas, hormona estimulante de la tiroides y hormona del crecimiento
Sistema nervioso	<ul style="list-style-type: none"> • Desencadena ansiedad y depresión
Tejido conectivo y piel	<ul style="list-style-type: none"> • Reduce la producción de colágeno y fibras musculares
Tracto gastrointestinal	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibe la absorción de calcio • Inhibe los mecanismos protectores de la mucosa gástrica
Hueso	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibe la función osteoblástica • Induce un balance negativo de calcio
Ojo	<ul style="list-style-type: none"> • Aumenta la presión intraocular

3. ESTRÉS

El Dr. Walter Cannon (1933) definió la homeostasis como “la sabiduría del cuerpo” y no erró al describir de tal forma a la serie de respuestas fisiológicas coordinadas para estabilizar o defender parámetros fisiológicos. (31)(30)

A su vez acuñó el término “alostasis” para reflejar el proceso dinámico en el cual los organismos ajustan distintos parámetros fisiológicos para adaptarse a circunstancias o entornos nuevos y cambiantes, es decir la alostasis describe los mecanismos que mantienen la estabilidad a través del cambio. (12)

Bruce McKeen propuso el término de “carga alostática” para describir la carga sobre el cerebro y el cuerpo que ocurre después de una experiencia estresante que ocurre durante un periodo que sobre pasa la capacidad de la alostasis. (30)

Según el Dr. Hans Selye el estrés es un estado constante pues no se pueden eliminar todos los factores estresantes de la vida, sin embargo, es posible controlarlo para mantener la salud. Hans describió el Síndrome de Estrés o Síndrome de Adaptación General (GAS), en el cual describe signos y síntomas característicos en las tres fases del estrés: alarma, resistencia y agotamiento; que permiten identificar los cambios fisiológicos dependiendo del tiempo y la exposición al fenómeno o elemento estresor. (17)

Fase de Alarma

Inicia en el momento en el que se percibe algo estresante y el cuerpo responde activando el sistema simpático como una respuesta de lucha o huida, predomina el efecto de las catecolaminas, como consecuencia de exponer al cuerpo en repetidas ocasiones a esta fase se presentan úlceras gástricas, involución tímica, de ganglios linfáticos y bazo; es una respuesta aguda. (6)

Fase de Resistencia

Una vez que se reconoce que el estrés continúa, el cuerpo activa mecanismos metabólicos para mantener la homeostasis (alostasis), la liberación hormonal de catecolaminas es menor pero constante por otro lado las concentraciones de cortisol son elevadas. (6)

Fase de agotamiento

En esta fase se agotan las capacidades adaptativas del organismo se pierde el equilibrio y alostasis, lo cual aumenta el estrés oxidativo, consecuentemente la carga alostática, entre múltiples alteraciones orgánicas, el sistema inmune se encuentra debilitado por lo que el cuerpo se vuelve más susceptible a la enfermedad y muerte. (6)

Pueden describirse diferentes tipos de estrés, por ejemplo el estrés físico se presenta bajo circunstancias en las que el cuerpo sobre pasa los límites fisiológicos de forma aguda o crónica, activando así sistemas alostáticos para mantener las demandas físicas a las que se expone el organismo, sin embargo las consecuencias pueden ir desde lesiones musculares hasta desgastes articulares de mayor gravedad, la respuesta inicial ante el estrés físico está regulado principalmente por la secreción de las catecolaminas, particularmente de la noradrenalina. (10)

El estrés psicológico está condicionado por eventos que alteran el estado emocional y mental manteniendo alerta los sentidos de tal forma que se percibe con exageración los estímulos externos, lo que lleva a tener un comportamiento excesivo ante situaciones que no representarían un verdadero riesgo vital de lucha o huida; sin embargo, ante un importante estrés psicológico se manifiestan alteraciones de sistemas vegetativos, acompañados de modificaciones en la conducta, pérdida de la atención, alteraciones en la memoria y en el juicio racional, afectando así el comportamiento social y la interacción interpersonal. Se ha estudiado y demostrado que el estrés psicológico puede desencadenar mecanismos que influyen en la patogenia de la muerte súbita. (7) (9)

Las secuelas que condiciona el estrés psicológico son alteraciones a nivel neurológico, desencadenadas por apoptosis neuronal, que implica dificultades en el proceso de aprendizaje, disminución de la atención, alteraciones en el sueño, memoria, juicio, así como mayor predisposición o bien el desarrollo de síndromes psiquiátricos y enfermedades neurodegenerativas (19) (18) (22), a nivel cardiovascular se presentan aumento de las resistencias vasculares, alteración de la frecuencia cardíaca, aumento de la permeabilidad endotelial, hipertensión arterial y desarrollo de enfermedades cardíacas (16); por otro lado, a nivel respiratorio se observa un aumento de la secreción mucosa, hiperreactividad bronquial, así como mayor actividad de macrófagos y mastocitos que favorece el desarrollo de fibrosis (14) (15); a nivel reproductivo altera ejes hormonales gonadales, con una secundaria disminución de la libido y la fertilidad (21), así mismo se ha documentado cambios adversos en la morfología y calidad de los espermatozoides; en las mujeres es más precoz el desarrollo de alteraciones ováricas desencadenadas por el estrés psicológico, precipitando el desarrollo de síndrome de ovario poliquístico, preeclampsia, abortos espontáneos y mayor predisposición para presentar endometriosis y cáncer. El sistema inmune se ve afectado directamente por el estrés psicológico al disminuir su respuesta nata, facilitando el desarrollo de enfermedades infecciosas y por microorganismos oportunistas, retrasando la producción de anticuerpos o por el contrario exacerbando enfermedades autoinmunes (17); a nivel del sistema tegumentario se presentan modificaciones en diferentes niveles de la dermis y epidermis que repercuten en la capacidad

protectora de la piel y de su capacidad regenerativa, aumento en la predisposición para enfermedades fotosensibles, cáncer o enfermedades autoinmunes (23). Los cambios gastrointestinales que se observan por dicho estrés son aumento de la acidez estomacal que puede evolucionar a úlcera gástrica y cáncer gástrico o esofágico, se presenta una disminución de la liberación de hormonas a nivel intestinal limitando la adecuada absorción de nutrientes y modificando la peristalsis, presencia de constipación, aumento en la permeabilidad intestinal que favorece la proliferación bacteriana y existe una constante inflamación gastroduodenal con una consecuencia en colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn, (23)(24); a nivel hepático se observa un incremento del flujo sanguíneo secundario al aumento de las resistencias vasculares, menor capacidad de metabolizar sustancias, aumento en la producción de bilis y mayor depósito de ácidos grasos, así como inflamación crónica que contribuye en su disfunción tanto estructural como funcional (41)(42).

Un efecto importante del estrés es la inflamación y se define como la reacción del sistema vascular ante la lesión local de un tejido, que resulta de una respuesta del sistema inmune por la infección de un microorganismo, la inflamación de forma aguda se manifiesta en el sitio de lesión con dolor, calor y aumento del volumen; de forma crónica y debido a la exposición constante del agente inflamatorio existe una adaptación metabólica que tienen como producto especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres, cuya producción es compensada por un complejo sistema antioxidante, sin embargo, en un estado crónico y ya en fase de agotamiento al excederse la producción de radicales libres se genera daño a diferentes niveles del organismo, modificando la estructura y función a diferentes niveles biológicos, relacionándose con envejecimiento prematuro, exacerbando y desencadenando enfermedades crónicas degenerativas, promoviendo un alto índice de mortalidad (10).

El estrés oxidativo es un estado de desequilibrio en el balance entre pro-oxidantes y antioxidantes de un organismo biológico, es decir se presenta una vez que los niveles de oxidantes sobre pasan la capacidad antioxidante. Los elementos oxidantes son producto de distintas vías metabólicas y si bien tienen efectos benéficos bajo circunstancias fisiológicas una vez que su producción se ve exacerbada por factores psicológicos, físicos, químicos o metabólicos tienden a alterar las vías de señalización y lesionar biomoléculas a través de procesos de oxidación-reducción causando daños que pueden ser irreversibles; clínicamente se presentan múltiples complicaciones de enfermedades subyacentes o el desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas o cáncer (17)(23)(40)(41).

3.1 RADICALES LIBRES

Se conoce como radical libre al átomo o molécula con uno o más electrones no apareados en el último orbital, que es capaz de reaccionar con múltiples moléculas a través de su oxidación (28) (43).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son una fuente endógena de radicales libres que son producidas como parte del metabolismo celular y de la respuesta ante distintos estímulos ambientales como el estrés físico, la radiación, la contaminación ambiental, la intoxicación química y múltiples enfermedades. Es posible clasificar a las ERO en radicales libres y no radicales, las primeras son las moléculas que contienen uno o más electrones desapareados, en el caso contrario las formas no radicales se forman cuando dos radicales libres comparten sus electrones desapareados. Las principales especies reactivas según su importancia fisiológica son el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($\cdot OH$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). A su vez existen especies reactivas de nitrógeno y oxígeno (ERNO) como el anhídrido nitroso (N_2O_3) y el peroxinitrito ($ONOO^-$) 5 con un importante papel al oxidar proteínas (28). A diferencia de las ERO, las ERN tienen un tiempo de vida media más largo lo que las hace más dañinas (67).

La función de las especies reactivas de oxígeno radica en una serie de mecanismos de defensa del sistema inmunitario, actuando como bactericida y participando en la activación de vías de señalización celular; por otro lado, su presencia en altas concentraciones condiciona un aumento en la capacidad de oxidar biomoléculas como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. (23)

TABLA 2. ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO Y SUS PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS

Radical	Nombre	Características
O_2^-	Superóxido	Es muy reactivo en medio hidrofóbico, pero no puede atravesar libremente las membranas biológicas, en condiciones fisiológicas puede transformarse en peróxido de hidrógeno ¹⁹
$\cdot OH$	Hidroxilo	Es el más reactivo y se le ha relacionado con el daño sufrido directamente en ADN, proteínas y lípidos
H_2O_2	Peróxido de Hidrógeno	No es un radical, pero puede generarlos rápidamente al estar en contacto con iones metálicos, como el Hierro y el Cobre ^{10, 20}
$ONOO^-$	Peroxinitrito	Se forma a partir de la reacción del radical superóxido con el ácido nítrico. Se le ha relacionado directamente con la patología de varios trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer ²¹
1O_2	Oxígeno simple	Se forma como producto de la reacción del glutatión reducido y el radical superóxido, y durante la lipoperoxidación ¹¹ . Juega un papel importante en procesos de mutagénesis, carcinogénesis, envejecimiento y trastornos degenerativos

Se han identificado diferentes fuentes exógenas de radicales libres como el humo de cigarro, exposición al ozono, hiperoxia, radiación ionizante, iones de metales pesados (hierro, cobre, cadmio, mercurio, níquel, plomo y arsénico).

Una sobreproducción de radicales libres condiciona alteración de la estructura y función de las biomoléculas, desencadenando diferentes enfermedades y aumentando la mortalidad; por tal motivo es fundamental la regulación del estado redox; el cual se integra por antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos cuyo fin es evitar el desarrollo del estrés oxidativo (32)(33).

3.2 ANTIOXIDANTES

Un antioxidante es aquella sustancia que disminuye de manera significativa la toxicidad y los efectos adversos de sustancias oxidantes derivadas del oxígeno y el nitrógeno (32).

Son múltiples los mecanismos antioxidantes del organismo y constituyen un sistema complejo compuesto por macromoléculas, enzimas, co-sustratos antioxidantes, antioxidantes endógenos, antioxidantes exógenos y sistemas de control en la síntesis de proteínas (24). Su función radica en unirse a los radicales libres para transformarlos en radicales menos tóxicos o bien redistribuirlos a sitios donde causan menor daño o es posible su eliminación.

Entre los principales antioxidantes se encuentran las proteínas que al unirse a metales como la transferrina y la albumina evitan la acumulación de hierro libre, por otro lado, la ceruloplasmina está encargada de captar cerca del 90% del cobre extracelular inactivando así el radical su peróxido (29).

Los antioxidantes endógenos son moléculas nucleofílicas que ofrecen electrones a las especies reactivas para evitar que estas ataquen a las macromoléculas ejemplos de estos antioxidantes son: el glutatión, el NADPH, la albúmina, el ácido úrico, la coenzima Q, la bilirrubina y la melatonina (27).

Los antioxidantes exógenos son aquellos que provienen de la dieta, tales como la vitamina E (α - tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico), el β -caroteno (provitamina A), el cobre, el selenio, el zinc, el manganeso, los polifenoles, los licopenos, los ácidos egálicos, los flavonoides, la quercetina, la hesperidina y las catequinas (25)(26).

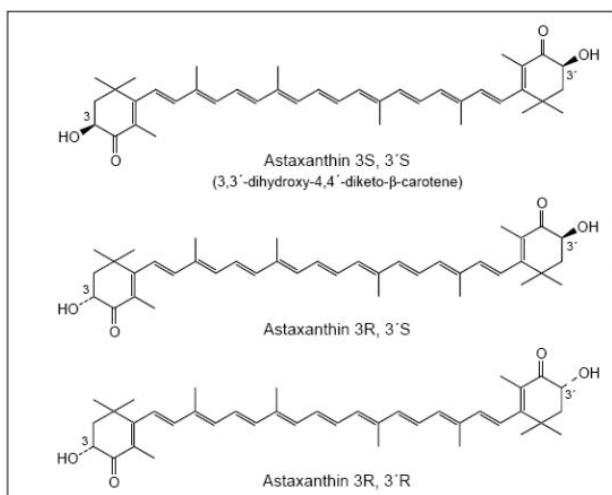
Por otro lado los antioxidantes enzimáticos están constituidos principalmente por las superóxido dismutasas que catalizan el cambio del radical superóxido a peróxido de hidrogeno, como la catalasa que presenta una amplia distribución y renovación siendo su actividad principal en los peroxisomas donde se cataliza la conversión de peróxido de hidrogeno en agua y oxigeno molecular; finalmente las glutatión per oxidasas que son responsables de catalizar la reacción a través de la cual el glutatión reducido reacciona con peróxidos para transformarlos en agua y alcohol (27).

El glutatión es un antioxidante endógeno no enzimático que tiene un efecto protector a nivel celular contra el daño oxidativo de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, presenta una actividad sinérgica con otros antioxidantes como la

vitamina C, vitamina E y las superóxido-dismutasas, se encarga de captar radicales hidroxilo y de oxígeno simple y reduce la concentración de peróxido; por otro lado el α -tocoferol (Vitamina E) que se encuentra presente en las membranas celulares y en las lipoproteínas plasmáticas se caracteriza por presentar en su estructura un grupo $-OH$ del que puede removerse con facilidad el hidrógeno, sustituye así a otros oxidantes y detiene la lipoperoxidación debido a su mayor afinidad por los radicales peróxido, la Vitamina C es responsable de eliminar los radicales libres de los compartimientos hidrofílicos de la célula, de la matriz extracelular y del sistema circulatorio. (27)

3.3 ASTAXANTINA

La astaxantina es un carotenoide que pertenece al grupo de las xantofilas, es producida por especies de algas como *Haematococcus pluvialis* (es la principal fuente de obtención), *Chlorella xofingiensis* y *Chlorococcum* y por la levadura *Phaffia rhodozyma* (34). Es un nutriente liposoluble que cuenta con una estructura molecular que le permite tener una localización transmembrana, lo que facilita la



eliminación de ROS y otros radicales libres mediante la donación de un electrón o bien a través de la unión con el radical libre formando una especie menos reactiva tanto en la parte interna como externa de la membrana celular, siendo así el antioxidante más completo para neutralizar los oxidantes (34)(35).

Es metabolizada a nivel hepático por el citocromo p450 1A1 / 2 hepático, en 3-hidroxi-4-oxo-β-ionol y 3-hidroxi-4-β-ionona y eliminada por vía renal. Su absorción es compatible con el sistema flip-flop, teniendo una absorción más lenta que su eliminación (vía renal). Petri y Lundebej estudiaron la distribución de astaxantina en ratas después de 2 semanas de administración y encontraron un acumulo principalmente en hígado, bazo, riñón, ojo, glándula suprarrenal

FIGURA 1. Isómeros de astaxantina. Fuente: Hagen, Siegmund y Breune, (2002) (32)

y piel (32).

Estudios de Stewart y cols. prueban que la dosis más alta de 6,000 mg/kg/día no condujo a la muerte aguda en ratas; mientras que Katsumata y Vega no encontraron ningún efecto adverso en la suplementación de 1000 mg/kg/día

durante 13 semanas en ratas; mientras que Edwards et al analizaron datos experimentales clínicos y resumieron la toxicidad de la astaxantina y su carcinogenicidad no demostraron carcinogenicidad en el ciclo de vida de la rata, aunque. Existen estudios que prueban que la astaxantina puede causar pigmentación en la piel de los animales en una concentración superior al tratamiento no tiene efectos adversos sobre las plaquetas, la coagulación y la fibrinólisis. (83)

Diferentes concentraciones de astaxantina en personas sanas mejoran los niveles de lípidos en sangre y la condición de la piel sin efectos secundarios significativos. (84)

La astaxantina cuenta con una importante capacidad antioxidante, antiinflamatoria, hipoglucemiante (37), mejora la producción de insulina (58), es un estimulante del sistema inmune, cuenta con un efecto hipotensor y antineoplásica, además de su actividad protectora a nivel neuronal, cardiaco, óptico, cutáneo y renal, disminuye la apoptosis neuronal mejorando los déficits cognitivos, disminuye los efectos secundarios del metabolismo del ejercicio y favorece la recuperación, facilita el metabolismo de los lípidos, consecuentemente tiene efecto anti esclerótico, aumenta la fuerza y previene el foto envejecimiento (36).

El efecto antioxidante de la astaxantina radica en su potente efecto como captador de radicales libres y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, siendo 11 veces más potente que el beta-caroteno y 550 veces más grande que el alfa-tocoferol (36).

Asimismo, sus propiedades polares (tiene dos grupos cetónicos en cada anillo) le permite colocarse en un lugar estratégico en la membrana celular, preservando tanto la parte interior como la superficie externa de la membrana, dando rigidez, modificando su permeabilidad y aumentando su potencial antioxidante debido a sus interacciones con la membrana lipídica. (36) Se ha demostrado que la astaxantina es más efectiva que la vitamina E en la protección de las mitocondrias de las células hepáticas de ratas contra la peroxidación lipídica (36). La astaxantina atenúa la producción intracelular de O₂- restaurando la red antioxidante de superóxido dismutasa y catalasa, revirtiendo así la toxicidad inducida por lipopolisacáridos y la producción de especies reactivas de oxígeno. (87)

La capacidad anticancerígena de la astaxantina se ha demostrado en múltiples tipos de cáncer como el cáncer oral, (88) el de vejiga (89), el carcinoma hepatocelular (90) (91), de colon (92)(93) y la leucemia, sus efectos terapéuticos se atribuyen a las vías apoptóticas, de inflamación, anti proliferativas y de unión celular en las que participa (87).

La actividad biológica de la astaxantina después de la ingestión depende de su tasa de absorción que puede estar relacionada con el nivel de enzimas en el tracto

intestinal. (85) Algunos autores explican que puede deberse a la estimulación de la secreción de bilis del hígado y la colesterol lipasa después de la administración oral, acelerando la hidrólisis y la absorción de éster de astaxantina. (85)

Múltiples estudios han centrado su atención en demostrar los efectos benéficos que tiene a diferentes niveles orgánicos la suplementación de astaxantina, a continuación, se describen algunos de ellos en la siguiente tabla.

ESTUDIOS CLÍNICOS EN LOS QUE SE INVESTIGA LA SEGURIDAD, BIODISPONIBILIDAD Y EFECTOS DE LA ASTAXANTINA			
ESTUDIO	POBLACION (n= número de personas)	POBLACION (n= número de personas)	EFECTOS DE LA ASTAXANTINA
Iwamoto et al, 2000.	Voluntarios (n= 24).	Diferentes dosis: 1.8, 3.6, 14.4, 21.6 mg/día, 2 semanas.	Reducción de la oxidación de LDL.
Osterlie et al, 2000.	Voluntarios, hombres de mediana edad (n=3).	Una sola dosis de astaxantina de 100mg.	Presencia de astaxantina, isómeros E/Z y R/S, en las lipoproteínas plasmáticas (quilomicrones VLDL).
Miyazawa et al, 2011.	Japoneses de mediana edad y senior (n=30).	3 mg/día de astaxantina, 4 y 12 semanas.	Presencia de astaxantina en los eritrocitos.
Miyazawa et al, 2011.	Japoneses de mediana edad y senior (n=30).	1 y 3 mg/día de astaxantina, 4 y 12 semanas.	Presencia de astaxantina en plasma.
Mercke-Odeberg et al, 2003.	Voluntarios, hombres sanos (n=32).	Una sola dosis de astaxantina de 40 mg.	Biodisponibilidad oral mejorada con una formulación a base de lípidos.
Spiller y Dewell, 2003.	Adultos sanos (n=35).	6 mg/día (3 - 2 mg/pastillas/día) durante 8 semanas.	Seguridad demostrada en evaluación de medidas de presión arterial y bioquímica.
Coral-Hinostroza et al, 2005.	Hombres adultos sanos (n=3).	10 mg y 100 mg, una sola dosis o 4 semanas.	Isómero Z es absorbido selectivamente Cmax 0.28 mg/L a las 11.5 horas en dosis altas y 0.08 mg/L en dosis bajas Semivida de

			eliminación 52 (SD 40) horas.
Karppi et al, 2007.	Hombres finlandeses sanos no fumadores (n=40).	8 mg/día, 12 semanas.	Absorción intestinal adecuada con cápsulas Reducción de los niveles en plasma de ácidos grasos 12 y 15 hidroxí.
Parisi et al, 2008.	Personas de edad no avanzada relacionadas con la degeneración macular (n=27).	4 mg/día, 12 meses.	Mejora la disfunción central de la retina con la edad relacionada a la degeneración macular cuando se administra con otros antioxidantes.
Miyawaki et al, 2008.	Hombres sanos (n=20).	6 mg/día, 10 días.	Decrece el tiempo de tránsito de la sangre (mejora de la reología sanguínea).
Rufer et al, 2008.	Hombres sanos (n=28).	5 mg salmón fresco (salvaje vs. Piscifactoría), 4 semanas.	Mejor biodisponibilidad con el salmón de piscifactoría, pero ésta se hace equivalente en el día 28 Isómero (3S, 3'S) mayor en plasma comparado con la proporción de isómeros en el salmón salvaje.
Uchiyama y Okada, 2008.	Voluntarios sanos con riesgo de síndrome metabólico(n=17).	8 mg dos veces al día durante 3 meses.	Disminución significativa de HbA1c y TNF-alfa Incremento significativo de adiponectina.
Park et al, 2010.	Mujeres sanas (n=14).	0, 2, 8 mg/día, 8 semanas.	Disminución en plasma de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) después de 4 semanas. Disminución de Proteína C reactiva (CRP) después de 4 semanas para los que tomaron 2 mg/día.
Yoshida et al, 2010.	Hombres y mujeres con	0, 6, 12, 18 mg/día, 12	Disminución significativa de

	hipertrigliceridemia (n=61).	semanas.	triglicéridos y aumento del colesterol HDL. Aumento significativo de la adiponectina.
Choi et al, 2011.	Hombres y mujeres con sobrepeso y obesos (n=23).	5 mg o 20 mg/día, durante 3 semanas.	Descenso significativo de los biomarcadores de estrés oxidativo (MDA, ISOP, SOD y TAC).
Piermarocchi et al, 2011.	Personas de edad no avanzada relacionadas con la degeneración macular (n=145).	4 mg/día, 2 años.	Estabilización o mejoría en la agudeza visual, sensibilidad al contraste y función visual.
Nakamura et al, 2004	Voluntarios sanos mayores de 40 años.	4 o 12 mg diarios, 28 días.	Mejora de la agudeza visual lejana, el tiempo de adaptación significativamente más corto. Sin cambios en la refracción, frecuencia de parpadeo o reflejo de la pupila.
Sawaki et al, 2002	Voluntarios sanos n=18 (para el estudio de visión) Voluntarios sanos n=16 (para el estudio de ejercicio)	Astaxantina extraída de <i>H. pluvialis</i> 6 mg astaxantina por día, 4 semanas (para ambos estudios)	Mejora el "campo de visión de fondo" y la fusión crítica de parpadeo. No hay efectos sobre la agudeza visual estática ni cinética. Mejora el "campo de visión de fondo" y la fusión crítica de parpadeo. No hay efectos sobre la agudeza visual estática ni cinética. Bajó significativamente la concentración en suero del ácido láctico, en hombres voluntarios adultos, en 2 min después de correr 1200m.

Nagaki et al, 2006	Sujetos que sufren fatiga visual, n=31	Astaxantina extraída de <i>H. pluvialis</i> 6 mg astaxantina por día, 4 semanas.	Mejora la fatiga visual debida a la visualización de pantallas en los trabajadores.
Comhaire et al, 2005	Hombres de 20 parejas no fértiles con niveles de los valores de referencia del esperma por debajo de lo recomendado por WHO.	Astaxantina: 16 mg/día, 3 meses.	Disminución de ROS. Secreción de inhibina B por las células Sertoli. Los dos parámetros anteriores indican el posible efecto de la astaxantina en parámetros del esperma y en la fertilidad.
Kupcinskis et al, 2008	Pacientes con dispepsia (n=44).	3 grupos: placebo, 16 mg astaxantina y 40 mg de astaxantina, 4 semanas.	Gran reducción de los síntomas de reflujo en la semana 4 con 40 mg de astaxantina.

Roldán, P. L., & Mach, N. (2012). Effect of consumption of astaxanthin in health. *Rev Esp Nutr Comunitaria*, 18(3), 164–177.

4. HIGADO

4.1 ANATOMOFISIOLOGIA DEL HÍGADO

El hígado es un órgano con características glandulares, con un peso aproximado de 1 500 g. Está localizado en el hipocondrio derecho, debajo del diafragma, protegido por la parrilla costal y rodeado por la capsula de Glisson y peritoneo visceral; el sostén y fijación se lo da la vena cava inferior, el ligamento redondo y los repliegues peritoneales (38). Cuenta con cuatro caras; la cara posterior en contacto con el riñón derecho; la cara anterosuperior que se encuentra separada del diafragma por parte de la cavidad peritoneal dividida en dos lóbulos (izquierdo y derecho) por el ligamento falciforme; la cara posteroinferior: parcialmente cubierta por peritoneo y adyacente al duodeno, páncreas y colon derecho, los surcos dividen esta cara en cuatro lóbulos; en esta cara se observa el lóbulo cuadrado el cual se encuentra delimitado por el surco umbilical a la izquierda, el lecho vesicular a la derecha y el hilio del hígado por detrás(36).

Funcionalmente existen dos lóbulos, el izquierdo y derecho los cuales son independientes respecto a su vascularización portal, arterial y drenaje biliar, se encuentran separados por la cisura total portal principal, la vena porta inferior se divide en rama derecha e izquierda. El lóbulo derecho cuenta con el sector anterior (segmentos V y VII) y el sector posterior (segmentos VI y VII), mientras que el lóbulo izquierdo se conforma por el sector medial (segmentos III y IV) y el sector lateral que es el segmento II (22).

Su irrigación depende de dos sistemas: vena porta y arteria hepática; la primera se encarga del 75% del aporte sanguíneo, drena sangre del estómago, intestino, páncreas y bazo, está formada por la unión de las venas mesentérica superior y esplénica; la arteria hepática que es una rama de la hepática común, del tronco celiaco representa el 25% del aporte del hígado (39).

Existe una vía biliar principal y una accesoria, la primera está conformada por los conductos hepático derecho e izquierdo, el hepático común y el colédoco, a su vez por los canalículos biliares que drenan la bilis ductal y canalicular que se unen a la salida del hígado para formar el conducto hepático común, al que se une el conducto cístico para formar el colédoco con sus cuatro porciones: supraduodenal, retroduodenal, intrapancreático e intraduodenal (22).

La vía biliar accesoria consta de la vesícula biliar y el conducto cístico.

El hígado es un órgano glandular que desempeña diferentes funciones reguladoras; hemodinámicamente actúa como reservorio al recibir el 40% del gasto cardiaco, es el responsable de filtrar y depurar la sangre procedente del territorio portal y el alto flujo linfático del organismo (39).

Produce la mayor cantidad de proteínas plasmáticas del organismo, por ejemplo la *albumina* que mantiene la presión coloidosmótica del plasma; *las lipoproteínas* principalmente las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), en menor cantidad produce lipoproteínas de baja densidad (HDL) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL); *las glucoproteínas* responsables del transporte de hierro; *la protrombina* y *el fibrinógeno* y *globulinas no inmunitarias como la α y β* que tienen función transportadora y reguladora de presión coloidosmótica. (39)

El hígado almacena la vitamina A, metaboliza la vitamina D convirtiendo la vitamina D3 en 25-hidroxicolecalciferol y la vitamina K que es importante para la síntesis hepática de factores de la cascada de coagulación.

El metabolismo de los lípidos consiste en el depósito y producción de energía por beta oxidación de ácidos grasos obteniendo ATP de Acetil-CoA; a su vez la conversión de glúcidos y proteínas en ácidos grasos, formación de lipoproteínas y finalmente formación de colesterol y fosfolípidos (27).

El hígado es el órgano regulador de los aminoácidos circulantes y forma el 90% de las proteínas plasmáticas: albumina, α -feto proteína, α 1-AT, ceruloplasmina, fibrinógeno, transferrina, C3, C4, α 1-antiquimiotripsina, haptoglobina PCR, amiloide sérico A, ferritina (27).

Es responsable del metabolismo y degradación de fármacos, hormonas, toxinas y otras sustancias exógenas; la secreción biliar para la emulsificación y solubilización lipídica, implícitamente también de la excreción de pigmentos biliares y neutralización del Ph ácido duodenal. El hígado del adulto secreta en promedio 1 litro de bilis por día (98) (25).

Así mismo del catabolismo de hormonas peptídicas, tiroideas, esteroides gonadales y suprarrenales, síntesis de factores de coagulación (fibrinógeno (I), globulina aceleradora (v) y los factores vitamina-K dependientes (protrombina-II, VII, IX, X), almacenamiento de vitaminas y metales (Vitamina A, D, B12, ferritina) (25) (26)(27).

Los hepatocitos son los encargados de la glucogenólisis/gluconeogénesis, almacenando almacenar el glucógeno que representa el 1% del peso del hígado, una vez saturado el almacenamiento de glucógeno se forman ácidos grasos a partir de la glucosa, así el hígado es el responsable de regular la concentración de glucosa sérica (98).

El hígado posee una inervación simpática y parasimpática, las fibras simpáticas producen un aumento de las resistencias vasculares, la disminución del volumen sanguíneo hepático y un rápido incremento de las concentraciones séricas de glucosa (98); mientras que las fibras parasimpáticas promueven la captación de la glucosa y su utilización.

4.2 HISTOLOGIA

Los componentes estructurales del hígado son: el *parenquima* que son cordones de hepatocitos separados por capilares sinusoidales; el *estroma de tejido conjuntivo* se continúa por la cápsula de Glisson, vasos sanguíneos, nervios, vasos linfáticos y conductos biliares; los *capilares sinusoidales* que componen el conducto vascular entre los cordones de hepatocitos, *espacios perisinusoidales* que se encuentran entre el endotelio sinusoidal y los hepatocitos (29).

El hepatocito tiene una forma poligonal con medidas de 25 a 40 μm con un citoplasma eosinofílico y un núcleo central redondo u ovalado que en ocasiones en pacientes jóvenes o ciertas patologías puede contener glucógeno, en el hepatocito adulto contienen el doble de la cantidad de ADN normal, la membrana celular forma canalículos biliares con el hepatocito adyacente mediante uniones especializadas. Su citoplasma contiene el retículo endoplásmico y glucógeno (29). Su vida media es de 5 meses y tienen una capacidad de regeneración considerable. Los hepatocitos presentan abundantes peroxisomas, los cuales en sus procesos (98).

El lobulillo hepático es la unidad microscópica básica del hígado; tiene una medida aproximada de 2mm x 0.7 mm (98). Transversalmente se aprecia como un hexágono, con pilas de cordones de hepatocitos anastomosados que irradian desde la vena central hasta la periferia hasta los vértices donde se localizan las triadas portales, las cuales están compuestas por los vasos interlobulillares es decir una rama de la arteria hepática, una vena porta y un conducto biliar (98).

Por otro lado, el acino es la unidad estructural que proporciona la mejor correlación entre la perfusión sanguínea, la actividad metabólica y la patología hepática (98). Dicha estructura tiene forma romboidal, está centrado por un espacio porta con las venas centrolobulillares en la periferia. Cada acino está dividido en tres zonas: Zona I, II y III (la zona 1 es la más cercana a las triadas

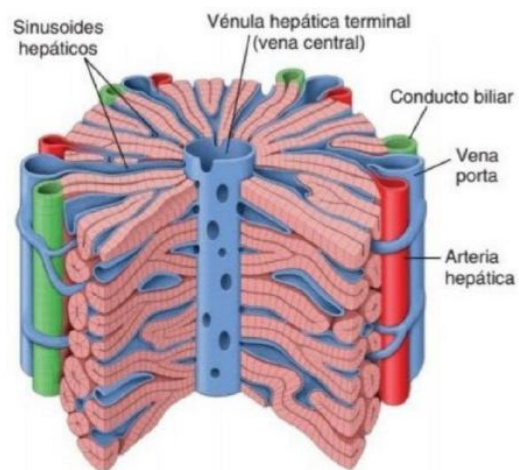
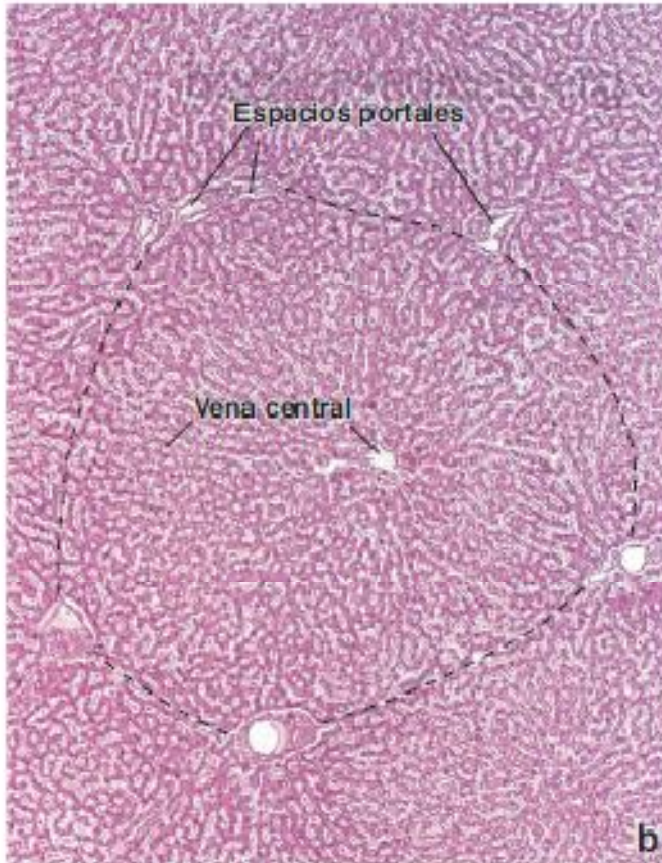


FIGURA 2. Lobulillo hepático clásico Ross, M. H., & Pawlina, W. (2013). *Histología: Texto y atlas color con biología celular y molecular* (6a. ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.

portales, por lo cual son las primeras en recibir oxígeno, nutrimentos y toxinas, contiene hepatocitos con mayor número de mitocondrias, la zona 2 y 3 tienen mayor susceptibilidad a la necrosis isquémica (98)(30).

Las vías biliares se localizan entre los hepatocitos y drenan en los conductos biliares que se encuentran en los espacios portales, los cuales transportan la bilis



desde los canales de Hering hasta los ductos biliares que se anastomosan para formar los ductos mayores hepáticos derecho e izquierdo, que confluyen formando en el hilio (29).

Mientras que los sinusoides son los canales de la red vascular donde fluye la sangre de forma centrípeta es decir desde los espacios porta hasta la vénula hepática o centrolobulillar, se encuentran revestidos por células Kupffer y linfocitos T o NK, su revestimiento endotelial es una lámina fenestrada que facilita el intercambio entre la sangre; los hepatocitos en el espacio perisinusoidal o de Disse es rico en colágeno tipo 3 y contiene las

células de Ito las cuales desempeñan un papel importante en el control del flujo sanguíneo sinusoidal, fibrogénesis y almacenamiento de vitamina A en forma de ésteres retinílicos dentro de las inclusiones lipídicas citoplasmáticas. (29) (98)

FIGURA 3. Microfotografía de hígado humano teñido con H&E Ross, M. H., & Pawlina, W. (2013). *Histología: Texto y atlas color con biología celular y molecular* (6a. ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.

El espacio porta son canales ramificados que se originan en el

hilio que contienen conductos biliares, una rama de la arteria hepática, rama de la vena porta, vasos linfáticos, fibras nerviosas y células inflamatorias. El tejido de soporte contiene principalmente colágeno tipo 1(98).

ANATOMIA E HISTOPATOLOGÍA COMPARATIVA DEL HÍGADO ENTRE EL HUMANO Y EL RATÓN

	CARACTERÍSTICA	RATON	HUMANO
Anatomía	<ul style="list-style-type: none"> Ubicación macroscópica Peso 	<ul style="list-style-type: none"> Subdiafragmática que abarca todo el abdomen craneal Lóbulos 4: medial, izquierdo (más grande), derecho (bisechado), caudado Vesícula biliar que sobresale del istmo central del lóbulo medial Indistinto 2g 	<ul style="list-style-type: none"> Cuadrante abdominal superior derecho 4: derecho (más grande), izquierdo, caudado, Cuadrado Vesícula localizada debajo del lóbulo R Prominente 1.5 kg
Tejido	<ul style="list-style-type: none"> Placas hepáticas Triada portal Tejido conectivo fibroso Estructura sinusoidal Canalículos biliares 	<ul style="list-style-type: none"> Menos aparente, generalmente más prominente en zonas 1 y 2 Triadas pequeñas que no son muy aparentes No prominente en salud o enfermedad, condiciones especiales. Fenestradas y discontinuas No son fácilmente detectables en un hígado normal 	<ul style="list-style-type: none"> Aparente Son visibles No está presente en hígado sano, principalmente se observa en cirrosis Igual Igual
Células	<ul style="list-style-type: none"> Hepatocitos bi y multinucleares Citoplasma claro Células de Kupffer Células de ITO Peso 	<ul style="list-style-type: none"> Se observan comúnmente, especialmente en la edad avanzada Es más evidente en hepatocitos centrolobulillares Frecuente, se observan mejor con inmunohistoquímica Presente en sinusoides 2 g 	<ul style="list-style-type: none"> Puede observarse en el 25% de las células Poco frecuente 15% del total de las células hepáticas Igual 1.5 Kg aproximadamente

5. ENFERMEDAD HEPÁTICA POR ESTRÉS OXIDATIVO

La etiología de la patología hepática se encuentra directamente relacionada con el estrés oxidativo y como tal con la consecuente apoptosis de hepatocitos (60).

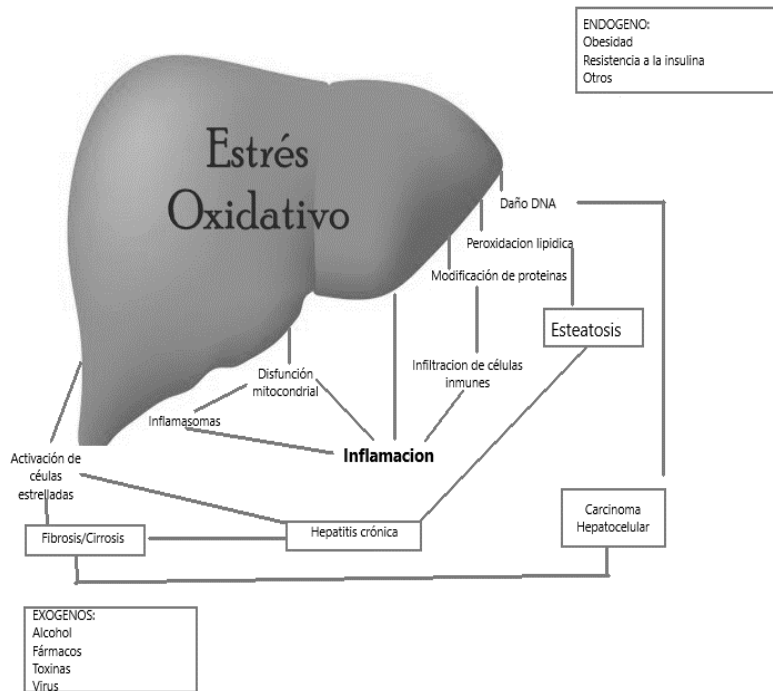
El espectro de las enfermedades hepáticas incluye esteatosis hepática, hipertensión portal, hepatitis, cirrosis, hasta carcinoma hepatocelular; estos cambios se dan ante dos fenómenos importantes: el estrés oxidativo y la inflamación. Por ejemplo, el daño hepático inducido por alcohol u otra sustancia química hepatotóxica se vincula con una producción excesiva de ROS (49) (52).

Una vez formados los metabolitos de deshecho son reconocidos por los receptores de células depuradoras como las células de Kupffer, células endoteliales y estrelladas que estimulan la regulación positiva de las citocinas y quimiocinas proinflamatorias que activan a las células T, NK y a las células estrelladas hepáticas desencadenando una respuesta inflamatoria y una subsecuente inducción de fibrosis del tejido hepático por el depósito excesivo de matriz extracelular, principalmente colágeno tipo I. (62)(80).

La lesión por daño oxidativo a nivel de las membranas microsomales y lisosomales disminuye los niveles de glutatión sulfhidrilo y glutatión-s-transferasa condicionando una disminución de la capacidad antioxidante fisiológica (62) y así, el daño por estrés oxidativo conduce a la muerte celular; condicionando

una reconstrucción estructural en miofibroblastos, la activación de las metaloproteinasas de la matriz, la fibrosis hepática y cirrosis (61).

Por otro lado, la beta-oxidación que ha sido alterada por el mismo estrés oxidativo constituye un componente crucial en la patogenia de enfermedad hepática al favorecer la acumulación de ácidos grasos dentro de los hepatocitos (41). Un exceso



(28)

FIGURA 4. Lesión por estrés oxidativo

de agentes oxidantes está involucrado en la peroxidación lipídica, al modificar la permeabilidad mitocondrial altera su función y disminuye el flujo de los electrones de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que modifica la expresión y con ello la síntesis de proteínas, disminución del contenido mitocondrial y deterioro de la beta oxidación mitocondrial (48).

Tras el estrés oxidativo se presenta una lesión hepática que puede ser secundaria a una lesión por toxinas, trastorno del sistema inmunitario, infecciones virales que dan inicio o exacerban diversas enfermedades hepáticas (49).

Las células estrelladas son las responsables de la fibrogenesis hepática secundaria a una lesión, el estrés oxidativo media la activación en la que se sintetiza una matriz fibrótica rica en colágeno tipo I. (81)

6. CAMBIOS HISTOMORFOLOGICOS EN ENFERMEDAD HEPATICA POR ESTRÉS OXIDATIVO

Los cambios histomorfológicos característicos de la enfermedad hepática por estrés oxidativo se caracteriza por infiltración leucocitaria, esteatosis, congestión vascular, vacuolización de hepatocitos y necrosis (28). Las células de Kupffer son la principal fuente de especies reactivas de oxígeno, en ellas se expresa el complejo NADPH oxidasa. Finalmente, las especies reactivas de nitrógeno son producidas principalmente gracias a la acción de la sintasa de óxido nítrico inducible, que es expresada en todas las células hepáticas (67).

Debido al estrés oxidativo a nivel molecular, los factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas, cambios en la organización y composición de la membrana celular, desempeñan un papel patológico importante (67).

La peroxidación de lípidos es el principal efecto de los radicales libres sobre los lípidos que constituyen las membranas celulares; produce electrófilos como el MDA o el 4-HNE; los cuales pueden modificar proteínas esenciales, lo que trae como resultado la pérdida de la función de esta proteína y la homeostasis celular. La fibrosis hepática puede ser considerada como una respuesta celular integrada y altamente dinámica del daño hepático crónico por estrés oxidativo. (67)

7. EFECTO DE ANTIOXIDANTES EXÓGENOS EN ENFERMEDAD HEPÁTICA

Se ha sugerido en estudios de la enfermedad hepática en sus diferentes estadios la implementación de terapia con vitamina E y otros antioxidantes, acompañado de cambios en los hábitos dietéticos orientado a la reducción de peso y el incremento de la actividad física (33) (34).

Así mismo se ha descrito que los suplementos de antioxidantes exógenos (betacaroteno, vitamina A, vitamina C, vitamina E y selenio) aumentan significativamente la actividad de la gammaglutamiltranspeptidasa. Por lo que las pruebas sobre si los suplementos de antioxidantes son eficaces para el tratamiento de las enfermedades hepáticas son contradictorias (66).

Se han estudiado moléculas antioxidantes que actualmente han mostrado un efecto hepatoprotector en ensayos preclínicos y clínicos como tratamientos adyuvantes de la enfermedad hepática (67).

Sin embargo, no existe suficiente evidencia sobre el uso de antioxidantes exógenos en la enfermedad hepática.

8. EFECTO DE LA ASTAXANTINA EN LA ENFERMEDAD HEPATICA POR ESTRÉS OXIDATIVO

La terapia antioxidante se encuentra dirigida a la prevención y el tratamiento de enfermedades hepáticas limitando el inicio y progresión del daño hepático secundario al estrés oxidativo.

Se demostró que la astaxantina previene y revierte la resistencia a la insulina y la esteatohepatitis disminuyendo la captación de lípidos en el hígado (29).

Así mismo, la astaxantina inhibe la peroxidación de lípidos de 100 a 500 veces más intensamente que la vitamina E (*in vitro*) (37); además, suprime la regulación de genes fibrogénicos en las células estrelladas hepáticas al bloquear la señalización TGF- β / Smad3. El tratamiento con astaxantina suprimió la expresión de estos genes lipogénicos (36)(37). Además, la astaxantina disminuyó la expresión de citocinas proinflamatorias, incluidas *Tnf*, *Il6* e *Il1b* en mayor medida que la vitamina E (36)(37). Por tanto, la astaxantina redujo la infiltración y activación de las células de Kupffer para atenuar la inflamación hepática en ratones.

Estudios demuestran su efecto preventivo y terapéutico sobre la fibrosis hepática, el hígado graso no alcohólico, el cáncer hepático y el daño inducido por fármacos e isquemia; su efectividad radica en sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, y la regulación de múltiples vías de señalización (82).

9. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estrés crónico es una constante en la vida de millones de personas, secundario a las exigencias del mundo globalizado que implica un constante estímulo estresante el cual, al sobrepasar la homeostasis de los sistemas compensadores desencadena el estrés oxidativo; consecuentemente dicho estrés provoca daños estructurales y funcionales a nivel de las biomoléculas y el ADN, teniendo como resultado la alteración de vías de señalización y un aumento en la liberación de citosinas proinflamatorias (8)(12).

Para que las manifestaciones clínicas por estrés oxidativo sean evidentes será necesario la cronicidad del estrés y la pérdida del equilibrio entre oxidantes y antioxidantes; el umbral para superar la homeostasis puede verse modificado por variables ambientales y personales, siendo subdiagnosticado el estrés durante mucho tiempo, sin embargo, un diagnóstico tardío condicionará un deterioro orgánico que puede ser reversible en el mejor de los casos o crónico degenerativo (36).

La astaxantina es el antioxidante más potente de la naturaleza y una excelente alternativa para el tratamiento del estrés crónico, debido a que reduce el daño causado por las moléculas oxidativas, protegiendo a las biomoléculas y frenando el desarrollo subsecuente del estrés oxidativo (36).

Las enfermedades hepáticas son un reto importante para la salud pública debido a la alta incidencia de desarrollo de complicaciones por las mismas, en México la enfermedad hepática ocupa el séptimo lugar como causa de mortalidad en hombres y mujeres según el INEGI en 2020 (77).

Independientemente de la etiología de la enfermedad hepática se ha demostrado que el estrés oxidativo juega un papel importante en la fisiopatología y desarrollo de esta. Sin embargo, no existe suficiente bibliografía que describa el efecto de la suplementación dietética con astaxantina como parte del tratamiento para contrarrestar los efectos dañinos del estrés oxidativo sobre el hígado (28)(67).

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de la astaxantina sobre la histomorfología hepática de ratones sometidos a estrés crónico?

10. JUSTIFICACIÓN

El estrés crónico es una constante en un gran porcentaje de la población mundial y si bien, es imposible eliminar completamente las causas del estrés, es imperativo comprenderlo, estudiarlo y desarrollar mejores abordajes terapéuticos del mismo (14)(13).

Los malos hábitos dietéticos, el consumo de fármacos de manera indiscriminada, el abuso de bebidas alcohólicas, la infección por virus y el estrés psicológico son predisponentes de enfermedad hepática (86). El estrés oxidativo se ha considerado un factor desencadenante del desarrollo y evolución de dicha patología, por lo que el uso de antioxidantes exógenos en el tratamiento de tales enfermedades forma parte crucial del tratamiento (92)(19).

Se ha hablado del uso de la vitamina E como coadyuvante en el tratamiento de enfermedades hepáticas, sin embargo, no se cuenta con suficientes estudios del uso de la astaxantina, la cual es 100 veces más potente que la vitamina E y con mayores efectos reguladores de distintos sistemas fisiológicos (94).

En este estudio se pretende demostrar el efecto hepatoprotector de la astaxantina en modelos experimentales expuestos al estrés psicológico crónico, sabiendo que múltiples estudios respaldan las actividades biológicas y protectoras de la astaxantina (95)(96). Se espera evidenciar dicho efecto a través de los cambios histomorfológicos en los modelos suplementados con astaxantina.

11. HIPOTESIS

El estrés crónico desencadena la liberación de radicales libres por medio del estrés oxidativo, causando daño molecular, estructural y funcional a nivel hepático. Por ende, la suplementación con astaxantina podría minimizar los efectos del estrés psicológico y presentar cambios favorecedores a nivel hepático en la histomorfología en ratones sometidos a estrés crónico.

12. OBJETIVOS

12.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar los efectos de la suplementación con astaxantina sobre la morfohistología hepática de ratones sometidos a estrés psicológico crónico.

12.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Correlacionar los efectos del estrés crónico con indicadores morfohistológicos de daño hepático.
2. Evaluar la capacidad hepatoprotectora de la astaxantina en relación con el estrés crónico.

13. MÉTODO

13.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Ensayo experimental aleatorizado

13.2 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN TEÓRICA	DEFINICIÓN OPERACIONAL	NIVEL DE MEDICIÓN	INDICADOR
SEXO	Cualitativa	Condición orgánica que distingue a los machos de las hembras.	Macho	Categórica	Macho o hembra
EDAD	Cuantitativa	Vocablo que permite hacer mención del tiempo que ha transcurrido desde el nacimiento de un ser vivo.	Ratones con 9 a 10 semanas de edad	Continua	Semanas - meses

SUPLEMENTACIÓN CON ASTAXANTINA	Cuantitativa	Moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas.	Dosis de antioxidante suplementada en ratones en determinado tiempo	De razón	Miligramos por kilogramo
ESTRÉS CRÓNICO	Cualitativa	Estimulo repetido, continuo y por un periodo largo de tiempo con capacidad de alterar la homeostasis.	Estimulo ocasionado por la manipulación del ratón	Nominal	Presente o Ausente
CAMBIOS MORFO HISTOLÓGICOS A NIVEL RENAL	Cualitativa	Proceso mediante el que existe una modificación de la normalidad	Cambios que implican alteraciones de la morfología e histología respecto a la condición normal del hígado	Nominal	Presente o Ausente

13.3 UNIVERSO DE TRABAJO Y MUESTRA

Se emplearon 28 ratones macho, los cuales se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos experimentales (n=7) de la siguiente forma:

1. Control
2. Estrés crónico
3. Estrés crónico y suplementación de astaxantina
4. Esquema de suplementación de astaxantina

13.4 INSTRUMENTO DE INVESTIGACIÓN

Para el presente estudio se utilizaron ratones macho cd1 de 9-10 semanas de edad con un peso de 30-35 gramos, obtenidos del Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) campus Xochimilco.

13.5 DESARROLLO DEL PROYECTO

Manejo de animales de experimentación:

Los animales se mantuvieron en jaulas de acrílico con agua y alimento a libre demanda, con ciclos de luz-obscuridad de 12 horas por 12 horas, acorde a los lineamientos bioéticos internacionales y de la NORMA Oficial Mexicana NOM-062- ZOO-1999. Para dar seguimiento, los ratones fueron rotulados y clasificados en grupos de trabajo.

MODELO DE ESTRÉS POR RESTRICCIÓN DE MOVIMIENTO

Los ratones fueron enclaustrados en tubos de acrílico de 1 pulgada de diámetro por 3 de longitud, con adecuada ventilación, los cuales permitían el movimiento rotacional de los animales, pero sin ocasionar inmovilización. El procedimiento se realizó por 3 horas, dos veces por semana, durante un periodo de 12 meses. Antes y después del periodo de estrés, los animales se mantuvieron en las mismas condiciones que los animales control. Para evitar influencias del ciclo circadiano, los procedimientos se realizaron en un horario de 9 a 12 horas.

ESQUEMA DE SUPLEMENTACIÓN CON ASTAXANTINA

Se administró vía oral, dosis de micro perlas al 2% de astaxantina a razón de 4 mg/kg de peso, dos veces por semana. Dado que la astaxantina es liposoluble, la hidrosolubilidad se realizó mediante homogenización del compuesto en Tween-20 al 2%, posteriormente fue diluido y homogenizado nuevamente en 2 ml de agua. El fármaco se administró por vía oral mediante la sujeción de los animales, cuidando ante todo evitar el estrés por manipulación. El esquema de suplementación se inició a partir de las 10 semanas de edad de los animales, hasta concluir el proyecto.

EUTANASIA

Al concluir los 12 meses de seguimiento, se realizó eutanasia de los animales mediante cámara de dióxido de carbono (CO₂), empleando una presión de 20 mmHg y un flujo de 2 a 2.5 litros/minuto, para un desplazamiento final de O₂ del 20% por minuto. Este método está avalado por la Asociación Americana de Medicina Veterinaria ya que disminuye el efecto estresante en el roedor.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Posterior a la eutanasia, se realizó un corte longitudinal sobre la línea alba de los músculos abdominales anteriores, posterior a exanguinar se disecaron los órganos abdominales para extraer el hígado de cada animal y se colocaron en una caja de Petri con 1 mililitro de solución salina.

FIJACIÓN

Los órganos fueron montados en cassetes histológicos previamente rotulados, después se fijaron en formol tamponado al 10%; empleando la siguiente formulación:

- 100 ml de formol/ formaldehído (37-40% solución concentrada)
- 900 ml de agua destilada
- 4g/L NaHPO₄ (fosfato de sodio monobásico)
- 6.5g/L Na₂HPO₄ (fosfato de sodio dibásico)

INCLUSIÓN EN PARAFINA

Una vez transcurridas 48 horas de fijación, las muestras fueron incluidas en parafina con punto de fusión de 58°C. La técnica empleada fue la siguiente:

Deshidratación:

A fin de extraer el agua del tejido, las muestras se sumergieron en concentraciones crecientes de alcohol etílico de la siguiente manera:

Etanol 50° (30'), etanol 70° (30'), etanol 80° (30'), etanol 90° (30'), etanol 96° (30'), etanol 100° I (30'), etanol 100° II (30').

Diafanización:

El líquido diafanizador que se utilizó es xileno, se sumergió en 2 baños de xileno: Xileno I (1.5 horas), xileno II (1.5 horas).

Inclusión y formación del bloque de parafina:

La parafina se calentó en horno eléctrico a 60°C. Se sumergió el tejido en 2 baños de parafina líquida y posteriormente se incluyó en el tercer baño:

Parafina I (1.5 horas), parafina II (1.5 horas), parafina III para la inclusión.

Con una previa orientación del tejido, la formación del bloque se realizó por medio de moldes metálicos para inclusión. Los moldes fueron llenados con parafina líquida (60°C), después fueron solidificados mediante platina fría; finalmente las muestras fueron desmontadas y almacenadas hasta su uso.

PREPARACIÓN DE LOS PORTAOBJETOS CON SUSTANCIA ADHERENTE

Se realizó una solución de gelatina al 0.5% en agua destilada. La solución se homogenizó en platina de agitación a 60° C, después fue filtrada sobre un vaso de Koplík, en donde las laminillas fueron sumergidas por 10 minutos y finalmente se dejaron secar a temperatura ambiente en un escurridor.

OBTENCIÓN DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS

Para realizar las secciones histológicas, se empleó un micrótopo manual- mecánico tipo Minot, de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- Se sujetó el bloque de parafina con los brazaletes del micrótopo y se alineó al sistema de sujeción de la navaja. Se desgastó la superficie del bloque hasta llegar a la muestra deseada, ajustando el espesor del corte a 3 micras.
- Activando la manivela del micrótopo manualmente, se realizaron cortes seriados (en cinta) del tejido.
- Las secciones obtenidas fueron depositadas en baño de flotación a 40°C. Posteriormente fueron adheridos a los portaobjetos. Posteriormente se colocaron en un horno a 60°C durante 15 minutos.

TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA (H&E)

El procedimiento de tinción se describe a continuación:

Desparafinación

Las secciones histológicas fueron sumergidas secuencialmente en una batería de desparafinación e hidratación, durante 10 minutos en cada reactivo de la siguiente manera:

Xileno I, xileno II, etanol 100° I, etanol 100° II, etanol 96°, etanol 80°, etanol 70°, agua destilada, PBS. Una vez hidratada la muestra, se procedió a realizar las tinciones específicas.

Tinción con H&E

Inmersión de la muestra en colorante hematoxilina de Harris (3'), lavado con agua corriente (5'), lavado con agua destilada (5'), inmersión de la muestra en colorante eosina (30"), lavado con PBS (10").

Deshidratación

Se sumergieron las laminillas en baños crecientes de alcohol etílico, durante 10' en cada reactivo: Etanol 80°, etanol 96°, etanol 100° I, etanol 100° II.

Diafanización

Posteriormente se realizó la diafanización de manera secuencial: xileno I (10'), xileno II (10').

Montaje

Una vez concluida la tinción, se procedió al montaje de las laminillas aplicando resina sintética sobre el portaobjetos y encima un cubreobjetos. Finalmente, la muestra fue secada en horno 10 minutos a 70° C.

TINCIÓN DE PAS (PERIODIC ACID SCHIFF)

La desparafinación e hidratación de muestras, se realizó de igual forma que para la tinción con H&E hasta el punto previo de la coloración.

Tinción de PAS

Inmersión de las muestras en ácido Peryódico (5-10'), lavado en agua destilada I (10'), lavado en agua destilada II (10'), reactivo de Schiff (10-15'), lavado en agua destilada III (10'), lavado en agua destilada IV (10'), hematoxilina (3'), lavado en agua corriente (10'), lavado en agua destilada V (10'), lavado en agua destilada VI (10').

Tras realizar la tinción, la deshidratación, diafanización y montaje de la muestra se realizó de igual manera que para la tinción con H&E.

Tinción Tricrómica de Masson

La desparafinación e hidratación de muestras, se realizó de igual forma que para las tinciones con H&E y PAS hasta el punto previo de la coloración.

Tinción

Inmersión en solución de Bouin en estufa a 56-60 °(1 hora), lavado en agua destilada I (3'), lavado en agua destilada II (3'), lavado en agua destilada III (3'), hematoxilina férrica de Weigert (5'), lavado en agua corriente (5'), lavado en agua destilada IV (3'), solución de Briebrich-Scarlet fucsina ácida (5'), lavado en agua destilada V (2'), solución de ácido fosfotungstico acuoso 5% (15'), solución verde luz al 2% (10'), lavado en agua destilada VI (30'), ácido acético al 1% en agua destilada (3').

Tras realizar la tinción, la deshidratación, diafanización y montaje de la muestra se realizó de igual manera que para las tinciones con H&E y PAS.

Análisis histopatológico de hígado

La arquitectura hepática se visualizó al realizar un corte sagital del hígado y orientado cada mitad del órgano en los bloques de parafina en microscopio de campo claro Carl-Zeiss Axiostar con una magnificación de 400x. Las imágenes fueron capturadas en formato Tiff con el mismo balance blanco mediante cámara Cooled- CCD Tucsen® de 5 MP, a través del software IScapture® V.3.7.8.2.

13.6 LÍMITE DE TIEMPO Y ESPACIO

El estudio se realizó en la Facultad de Medicina Paseo Tollocan esquina Jesús Carranza s/n, Col. Moderna de La Cruz, C. P. 50180 Toluca de Lerdo, Estado de México, en un periodo de 12 meses de agosto 2020 a agosto 2021.

13.7 CRONOGRAMA

MES	1 -12	13	14	15	16
ACTIVIDADES					
RECOLECCIÓN BIBLIOGRÁFICA	✓				
MODELO DE INDUCCIÓN DE ESTRÉS	✓				

CUIDADOS GENERALES (ASEO DE CAJAS ACRÍLICAS, RECAMBIO DE AGUA, ALIMENTACIÓN)	✓		
PROCESAMIENTO DE MUESTRAS		✓	
ANÁLISIS DE RESULTADOS			✓
DISCUSIÓN DE RESULTADOS			✓
ELABORACIÓN DEL TRABAJO FINAL			✓

13.8 Diseño de análisis

El estudio realizado fue de tipo experimental, descriptivo y cualitativo.

Se analizaron las características histopatológicas más importantes de cada grupo experimental.

14. IMPLICACIONES ÉTICAS

El manejo de los animales se realizó acorde a las recomendaciones de la guía de National Institutes of Health para el trabajo con animales de experimentación. El proyecto fue aprobado previamente por la comisión de bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México y con apego a la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

15. RESULTADOS

Es importante mencionar que el protocolo se interrumpió al cabo de un año debido a que los ratones sometidos a estrés comenzaron a morir por paros cardio respiratorios súbitos, una condición que no correspondía ni era esperada para la edad de los ratones, por lo que es de suma importancia poder contar con la comparativa histomorfológica del grupo de control en la tinción de H&E logrando observar un hígado que conserva la morfología esperada; con una vena centrolobulillar rodeada de trabéculas de hepatocitos poliédricos bien organizados con un citoplasma eosinofílico, núcleos centrales y algunos binucleados, presentando también depósitos de glucógeno y sinusoides con un calibre normal y pocas inclusiones lipídicas, los canalículos biliares se encuentran revestidos por células endoteliales (100).

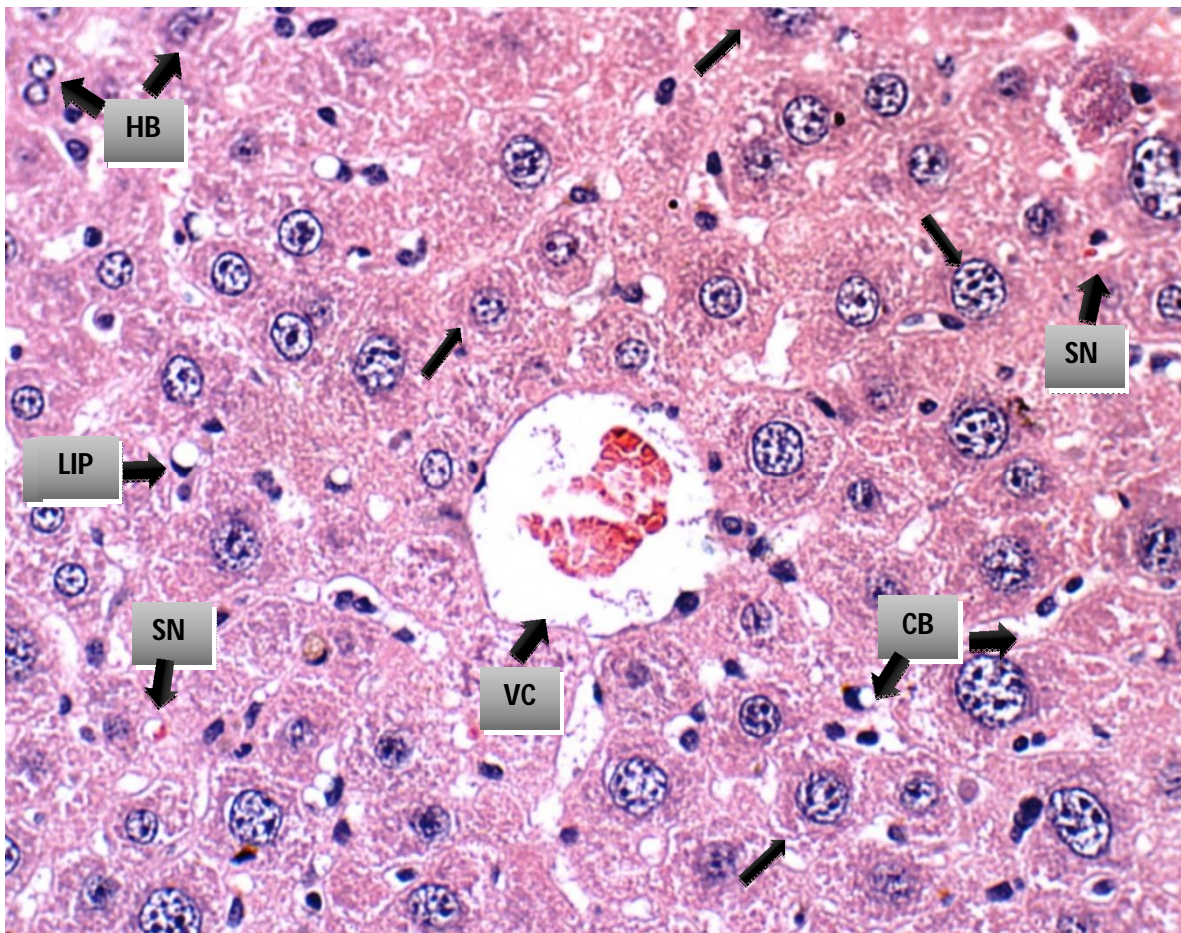


FIGURA 5. HÍGADO DE RATÓN CONTROL TINCIÓN H&E. La microfotografía muestra estructuras normales del hígado. Vena centrolobulillar (VC), cordones de hepatocitos que

conservan una arquitectura normal, hepatocitos binucleados (HB), sinusoides (SN) y canalículos biliares (CB) de un calibre normal, con pocas inclusiones lipídicas (LIP). Se aprecia en general hepatocitos con características normales, con un citoplasma eosinófilo y núcleos centrales, no se aprecian depósitos lipídicos.

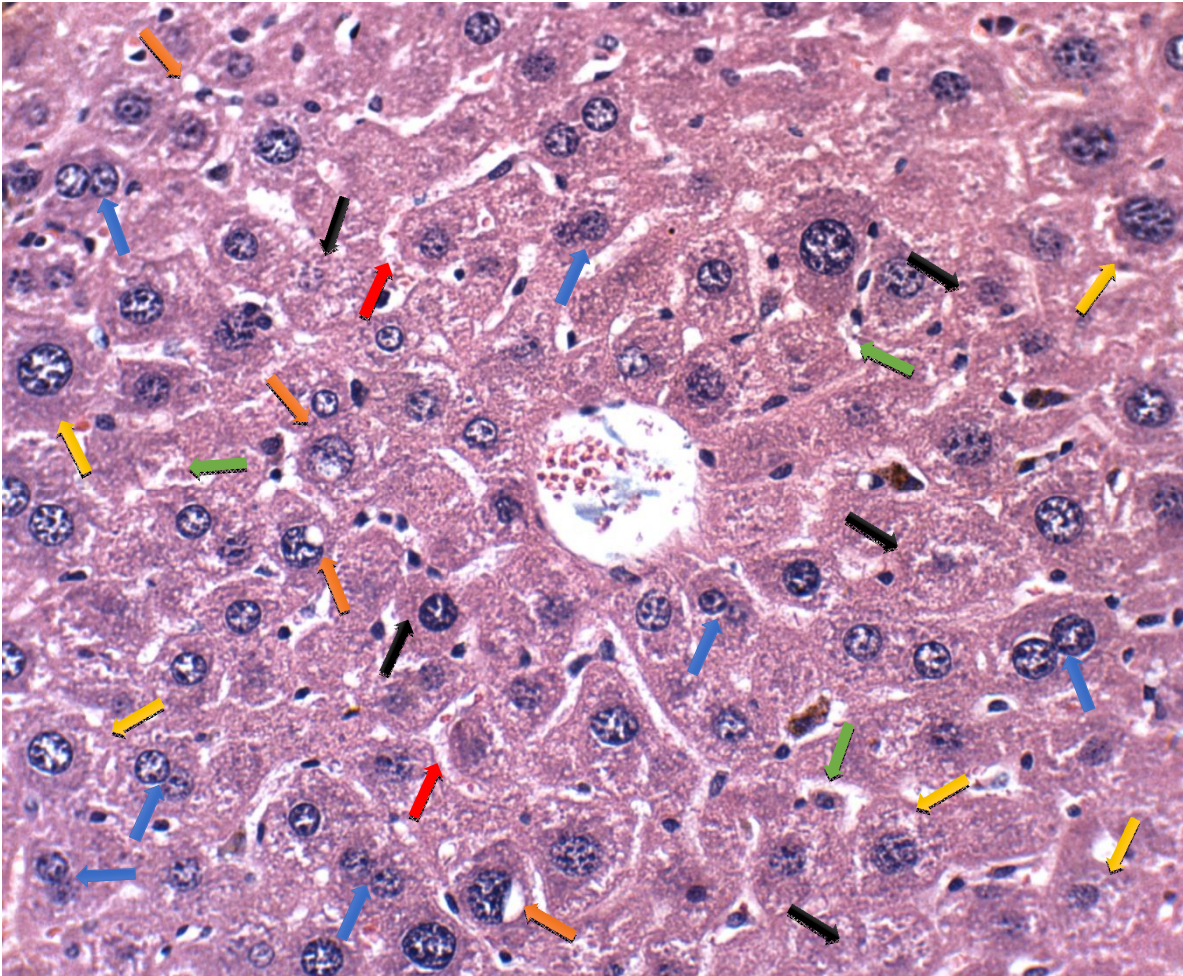


FIGURA 6. HÍGADO DE RATÓN SOMETIDO A ESTRÉS H&E. A diferencia de la morfología que conserva el ratón de control, el ratón sometido a estrés muestra cambios en la estructura histológica; un menor número de hepatocitos, zonas de degeneración celular (por las flechas negras) caracterizado por células con núcleo picnótico y células anucleadas, es importante el infiltrado leucocitario, acompañado de células abalonadas es decir que no conservan su estructura poliédrica característica, más bien tienen forma circular, describen un proceso de degeneración hidrópica la cual precede a la necrosis lítica (flechas amarillas), existe mayor cantidad de hepatocitos binucleados (flechas azules) proceso que pretende compensar la degeneración celular y que es característico en hígados adultos, mayor presencia de inclusiones lipídicas en los hepatocitos (flechas anaranjadas),

sinusoides hepáticos de mayor calibre que representan una congestión vascular importante (flechas rojas), conductos biliares tortuosos con depósitos de bilis (flechas verdes). A simple vista la microfotografía muestra un color predominantemente basófilo, lo cual implica un aumento en el depósito de glucógeno hepático y de lisis celular, los cambios descritos en esta muestra histológica son característicos de un proceso de envejecimiento, inflamación crónica y lesión hepática.

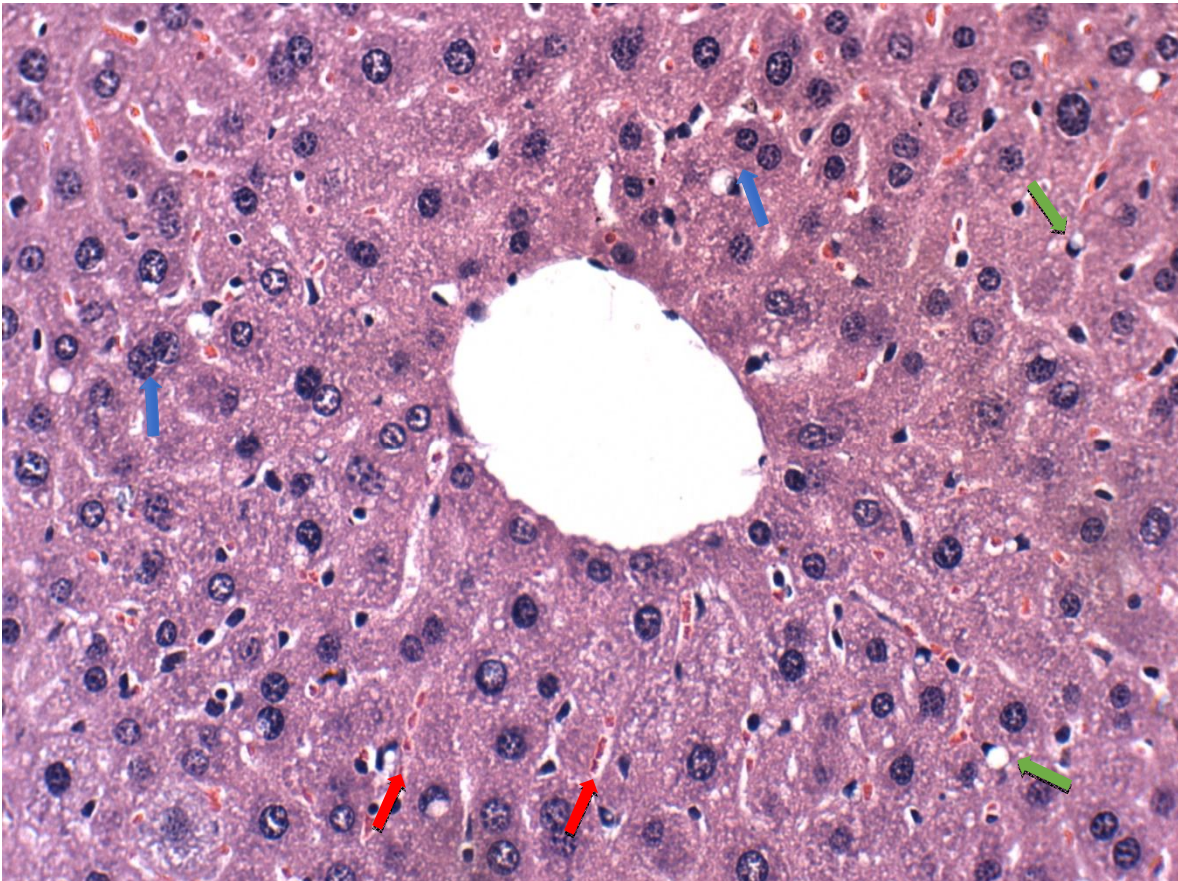


FIGURA 7. HIGADO DE RATÓN SOMETIDO A ESTRÉS Y SUPLEMENTADO CON ASTAXANTINA H&E. En comparación con la microfotografía del ratón estresado, el hígado del ratón estresado y suplementado con astaxantina conserva una histomorfología celular normal, con cambios que corresponden a un estado de compensación ante el estímulo estresante, existen hepatocitos binucleados (flechas azules) en mayor cantidad que en el hígado del ratón estresado, si bien existen células con núcleo picnótico, no se observan zonas degenerativas, se observa un importante infiltrado leucocitario y existe un mayor número celular con trabéculas de hepatocitos bien delimitadas, los sinusoides (flechas rojas) y canalículos biliares (flechas verdes) conservan un calibre normal, existe un leve depósito de lípidos, sin

embargo el acúmulo de glucógeno es importante y similar al del hígado del ratón estresado.

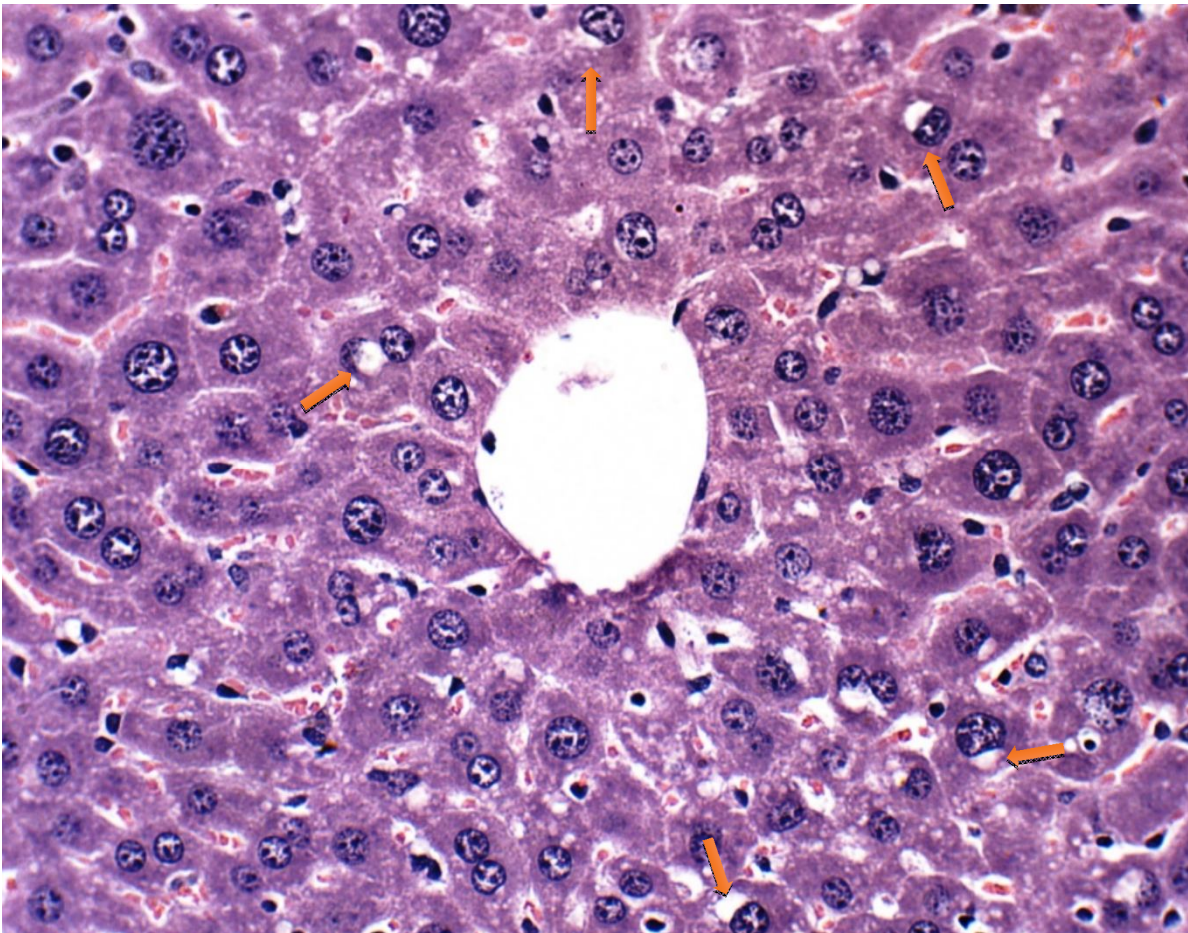


FIGURA 8. HÍGADO DE RATÓN SUPLEMENTADO CON ASTAXANTINA H&E. En esta muestra histológica es posible notar que ante la suplementación con astaxantina el hígado del ratón presenta un aumento en el número de celular, múltiples hepatocitos binucleados, datos que nos describen un proceso de multiplicación celular, así mismo el citoplasma de los hepatocitos presenta depósitos importantes de glucógeno que los hace tener una apariencia basófila, los canalículos biliares respetan un calibre fisiológico y se observa una dilatación de los sinusoides, sin embargo existe un depósito de lípidos (flechas anaranjadas) mayor que en el hígado del ratón estresado y suplementado con astaxantina.

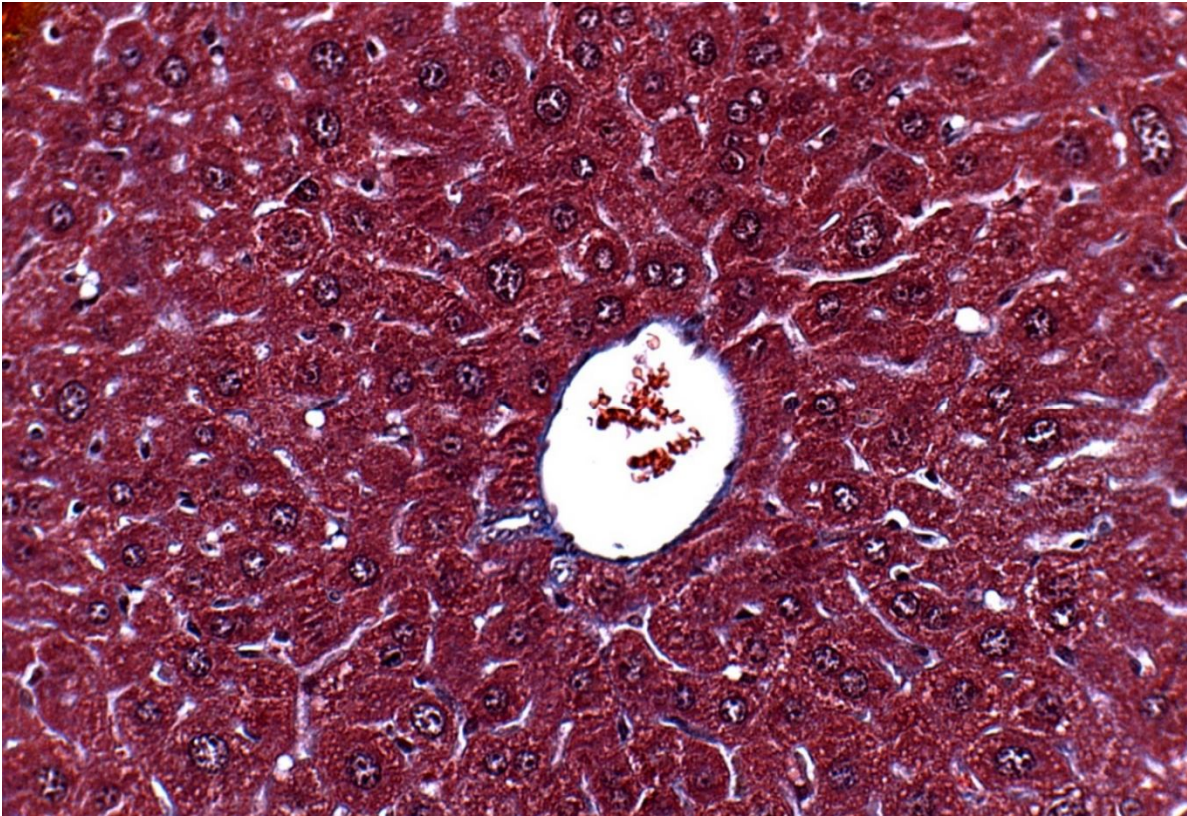


FIGURA 9. HIGADO DE RATÓN CONTROL REACCIÓN TRICROMICA DE MASSON. En la presente microfotografía con la tinción de MASSON es viable identificar el colágeno presente en las túnicas vasculares de los sinusoides al adquirir un color azul, así como en la vena centrolobulillar (VC) en el ratón control se aprecia una distribución normal del colágeno que delimita el trayecto vascular.

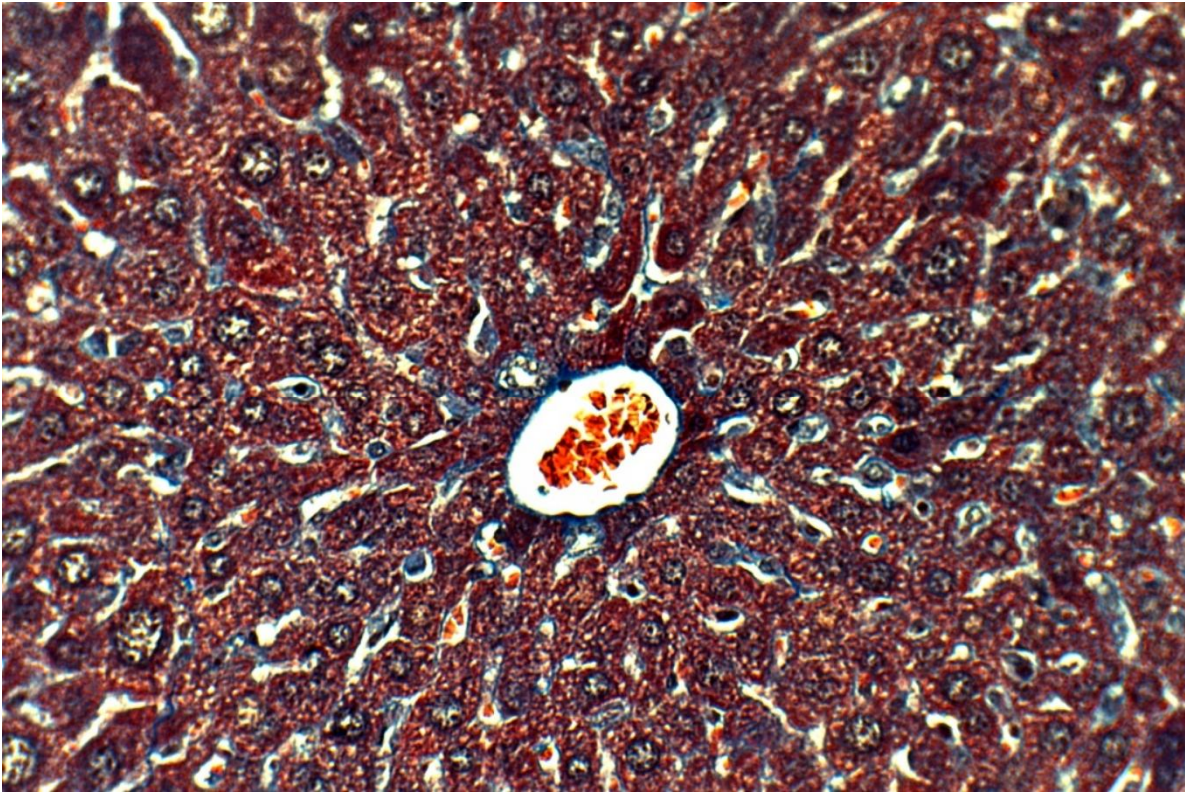


FIGURA 10. HÍGADO DE RATÓN SOMETIDO A ESTRÉS REACCIÓN TRICROMICA DE MASSON. En la presente microfotografía del ratón sometido a estrés es posible evidenciar el aumento en la concentración de colágeno en los sinusoides, el aumento del depósito de colágeno a nivel intracelular es consecuencia de un proceso inflamatorio crónico, al reemplazar con colágeno zonas del parénquima celular se presenta una disfunción hepática secundaria a la fibrosis.

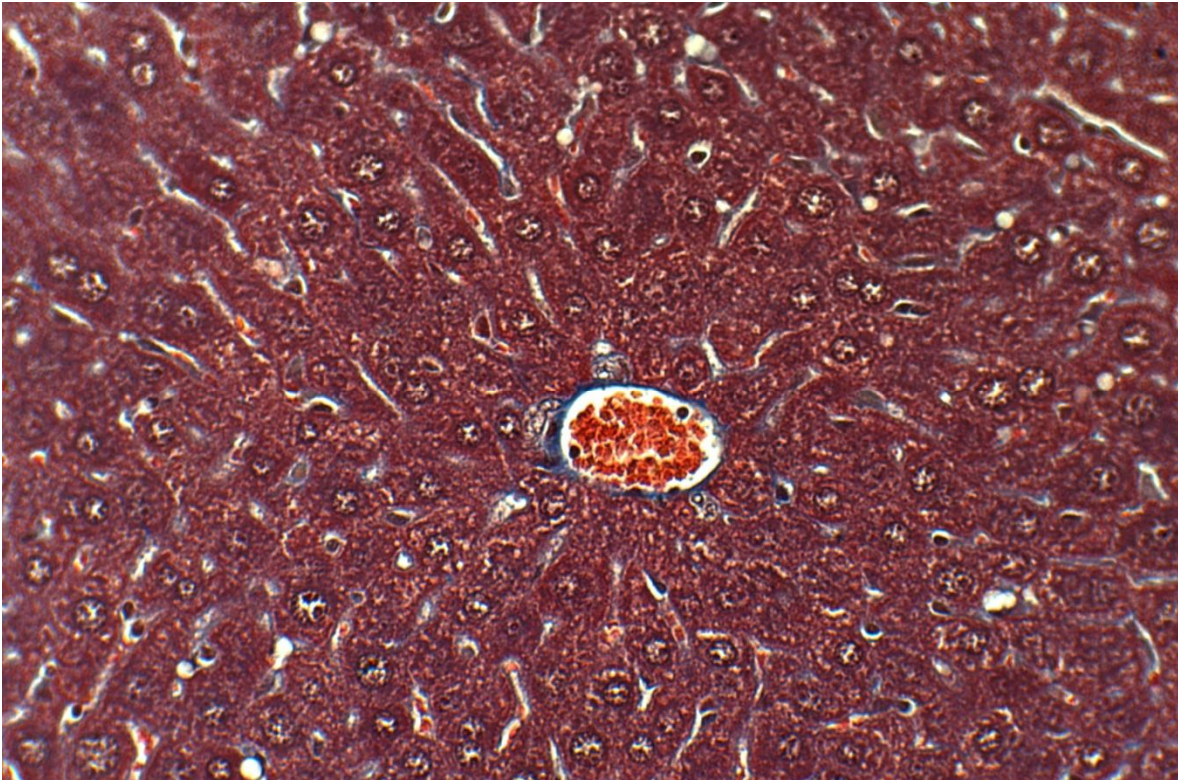


FIGURA 9. HÍGADO DE RATÓN SOMETIDO A ESTRÉS Y SUPLEMENTADO CON ASTAXANTINA REACCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON. En la muestra histológica del ratón sometido a estrés y suplementado con astaxantina la concentración de colágeno se limita a las zonas fisiológicas de las tunicas vasculares, respetando la morfohistología normal, sin acumulo intracelular, la microfotografía se asemeja al tejido hepático del ratón de control.

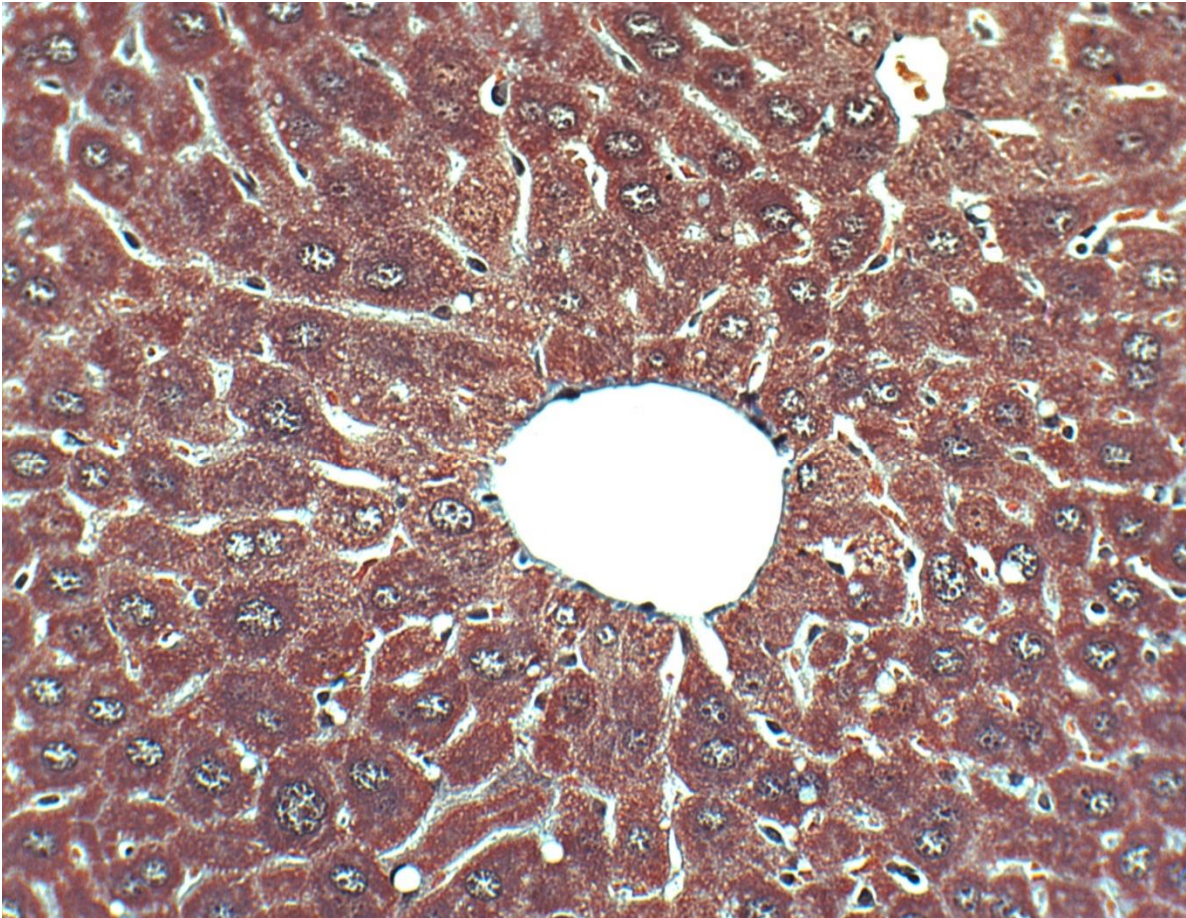


FIGURA 10. HÍGADO DE RATÓN SUPLEMENTADO CON ASTAXANTINA REACCIÓN TRICÓMICA DE MASSON. En el ratón suplementado con astaxantina sin estrés el depósito de colágeno a nivel perisinusoidal es menor que en el ratón con estrés y suplementado con astaxantina, a pesar de que se mantiene la arquitectura normal, se aprecia un depósito de colágeno de tipo intracelular en mayor cantidad que en el ratón control.

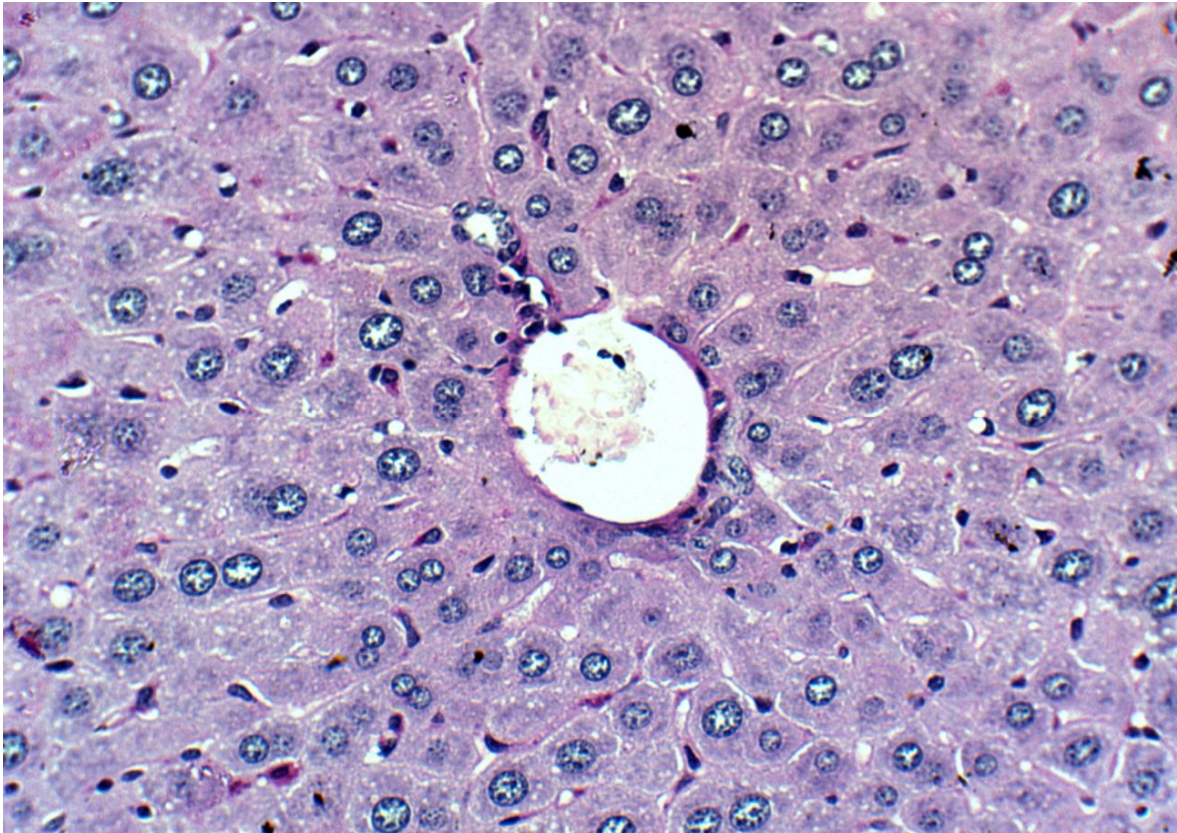


FIGURA 11. HIGADO DE RATÓN CONTROL REACCIÓN PAS. En esta tinción es posible identificar los depósitos de glucógeno, en el control existe un mínimo acumulo intracelular con una distribución homogénea.

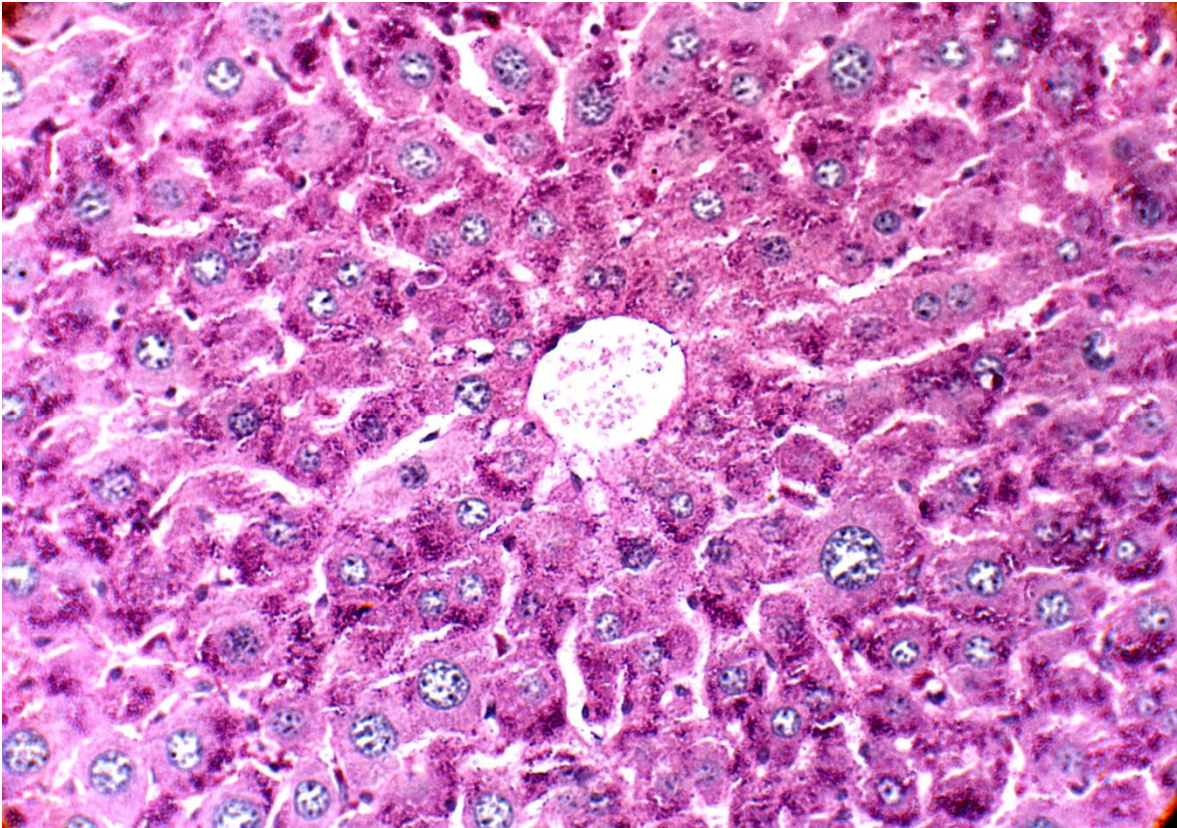


FIGURA 12. HÍGADO DE RATÓN SOMETIDO A ESTRÉS REACCIÓN PAS. En el ratón que fue estresado es posible visualizar una mayor cantidad de glucógeno en el citoplasma de los hepatocitos que se encuentran en la periferia de la vena centrolobulillar.

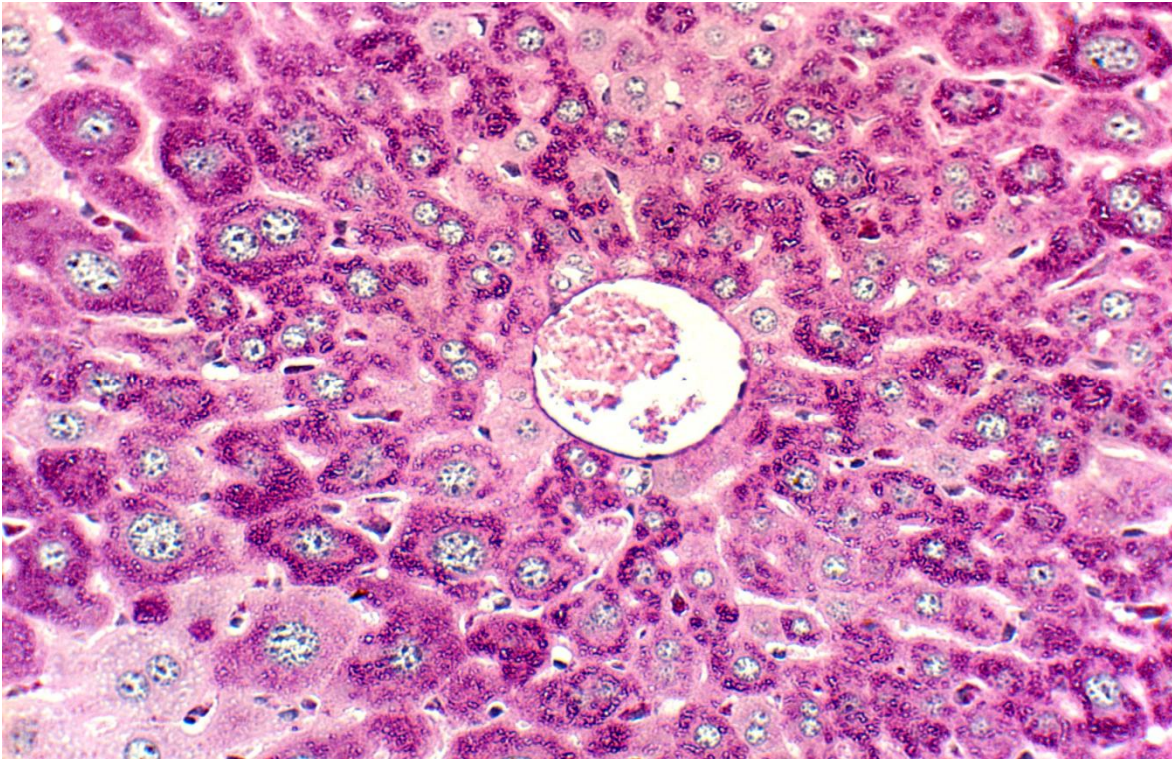


FIGURA 13. HÍGADO DE RATÓN SOMETIDO A ESTRÉS Y SUPLEMENTADO CON ASTAXANTINA REACCIÓN PAS. En esta microfotografía es posible identificar que al igual que en el ratón que fue estresado aún con la suplementación de astaxantina se presenta un depósito importante de glucógeno en el espacio intracelular.

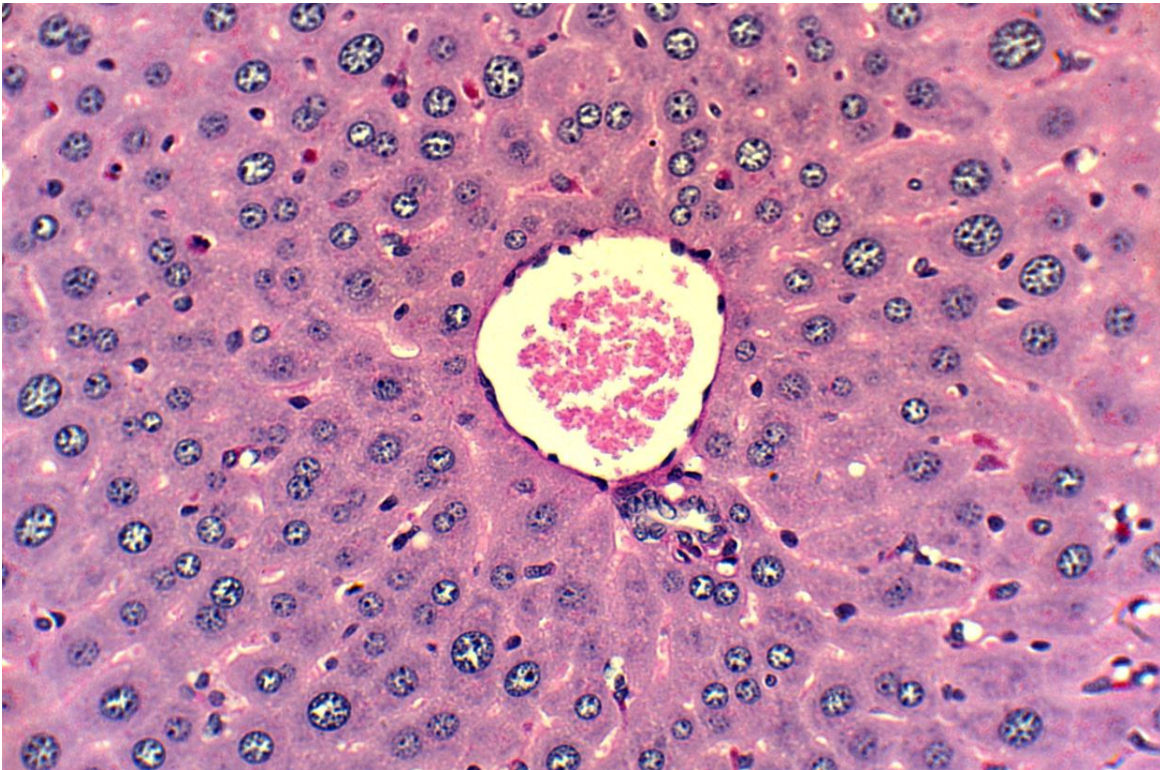


FIGURA 14. HÍGADO DE RATÓN SUPLEMENTADO CON ASTAXANTINA REACCIÓN PAS. A diferencia de las muestras de ratones estresados, el ratón únicamente suplementado con astaxantina presenta una estructura normal y un acumulo de glucógeno mínimo, similar al del ratón de control.

16.DISCUSIONES

El estrés es una condición fisiológica, el doctor Hans Selye lo estipulaba que el estrés está presente en un individuo durante todo el periodo de exposición a una demanda no específica, proceso en el que se encuentra involucrado una respuesta del sistema nervioso simpático y del sistema adrenocortical para conservar la homeostasis (100)(101). Las respuestas ante el estrés están determinadas por el tipo y frecuencia del factor estresante, una vez que la respuesta deja de ser aguda y la cronicidad del estímulo estresante persiste se desarrolla un estado alostático, periodo de adaptación en el que existe un desequilibrio de los mediadores primarios caracterizados por hipertensión arterial crónica, alteraciones en los ciclos circadianos, depresión del sistema nervioso central e inmunológico y un estado inflamatorio crónico (6). Una vez que el estrés lleva al punto de agotamiento prevalece el estrés oxidativo el cual es un fenómeno causado por el desequilibrio del sistema antioxidante, las especies reactivas que se liberan desencadenan múltiples procesos degenerativos; el estrés oxidativo y la liberación exacerbada de radicales libres está asociado con envejecimiento precoz, inflamación crónica, cáncer y enfermedades crónicas degenerativas (7)(8).

El estrés crónico está íntimamente ligado a la regulación mediante glucocorticoides, que si bien favorecen el estado alostático también condicionan lesiones a diferentes niveles orgánicos, aumentando la resistencia a la insulina, gluconeogénesis, y el depósito de lípidos en el hígado, limitando la respuesta del sistema inmune y alterando la secreción de hormonas sexuales (104).

El estrés al que se expusieron los ratones de la investigación desencadenó una muerte prematura en cuatro de ellos por lo que fue necesario interrumpir el estudio, tras observar los cambios histológicos en el tejido cardíaco fue evidente la insuficiencia cardíaca que desarrollaron. En el tejido hepático de los ratones estresados en las microfotografías obtenidas de la tinción de H&E existen cambios característicos de envejecimiento, tales son: aumento en el número de hepatocitos binucleados, zonas de degeneración celular y presencia de fibrosis (106), de igual forma existe un depósito de lípidos intracelular que corresponde a un efecto mediado por el aumento en la producción de glucocorticoides (105); en los ratones estresados y suplementados con astaxantina las modificaciones histológicas son mínimas, se conserva la arquitectura característica del lobulillo hepático y no existen zonas de degeneración celular como en la microfotografía del hígado del ratón estresado, por el contrario existe un aumento en la celularidad hepática y de la concentración de glucógeno lo que puede interpretarse como una respuesta adaptativa y protectora, por otro lado los ratones únicamente suplementados con astaxantina a

diferencia del hígado del ratón control presenta mayores inclusiones lípidicas, las cuales no cumplen con criterios para hígado graso, por lo que tal depósito corresponde a un mecanismo compensatorio y de protección hepática.

La reacción tricrómica de Masson permite visualizar la concentración de colágeno tipo I en los tejidos; en las microfotografías del hígado del ratón estresado el aumento de colágeno en el parénquima hepático y perisinusoidal es importante, tal fibrosis es un signo de vejez e inflamación crónica que activa la diferenciación celular de las células estrelladas para inducir inflamación y producción de colágeno (81)(108)(105), tal fibrosis implica una disfunción hepática y consecuentemente puede evolucionar a una enfermedad; por otro lado el hígado del ratón sometido a estrés y suplementado con astaxantina no desarrolló dicha fibrosis por lo que se confirma la capacidad hepatoprotectora de la astaxantina ante el estrés crónico, estudios demuestran que la suplementación de astaxantina mejoran significativamente las lesiones de la fibrosis hepática (108), en el caso de este estudio la astaxantina la evitó.

Finalmente, las microfotografías con reacción PAS del hígado del ratón estresado muestran una mayor concentración de glucógeno a nivel intracelular, del mismo modo el hígado del ratón estresado y suplementado con astaxantina mantiene una cantidad similar de glucógeno intracelular, esto puede ser consecuencia del estímulo de los glucocorticoides frente al estrés crónico como parte del proceso compensatorio de glucogénesis ante una demandante actividad metabólica (103).

Es por los datos previamente descritos que se confirma el efecto hepatoprotector a la astaxantina ante el estrés crónico.

17. CONCLUSIONES

El estrés crónico puede desencadenar cambios histomorfológicos a nivel hepático que corresponden a lesiones características de inflamación crónica, la fibrosis y necrosis celular que induce el estrés crónico puede condicionar una disfunción importante e irreversible.

El efecto hepatoprotector demostrado de la astaxantina radica en la capacidad de disminuir los efectos adversos de la sobreproducción de radicales libres, influyendo positivamente en la presión arterial, la respuesta inmunitaria, la modulación en la liberación de glucocorticoides y citocinas proinflamatorias; el efecto antioxidante de la astaxantina en el hígado estimula la multiplicación celular, la glucogénesis, limita la inflamación, evita la lisis celular, la sobreproducción de colágeno y con ello subsecuente fibrosis y disfunción hepática en los ratones sometidos a estrés crónico y suplementados con astaxantina.

18. RECOMENDACIONES

Se sugiere no sobreestimar la capacidad degenerativa que implica la exposición ante el estrés crónico. Por lo que es necesario desarrollar las alternativas necesarias para disminuir el estrés crónico.

Realizar estudios complementarios de biología molecular para enriquecer la información sobre la capacidad antioxidante y protectora de la astaxantina en el tejido hepático ante distintos estímulos estresores.

REFERENCIAS

1. Pereira, C. P. M., Souza, A. C. R., Vasconcelos, A. R., Prado, P. S., & Name, J. J. (2021). Antioxidant and anti-inflammatory mechanisms of action of astaxanthin in cardiovascular diseases (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 47(1), 37–48
2. Capdevila, N., & Segundo, M. J. (2005). Estrés. *Offarm*, 24(8), 96–104.
3. Schnaas, F. (2017). Avances en el diagnóstico y tratamiento. *Neurología, Neurocirugía y Psiquiatría*, 45(1), 22–25. Retrieved from
4. Mexicanos, los más estresados del mundo por su trabajo Últimas Noticias Forbes México <https://www.forbes.com.mx/mexicanos-los-mas-estresados-del-mundo-por-su-trabajo/> Accessed: 2021-07-16
5. Panax ginseng, ophiopogon japoniscus, an schisandra chinensis, se usan para tratar tradicionalmente enfermedades cardiacas, c hoelen, cinnamoni cortex, atractylodis rizoma y Gluccyrrhaizae radix que son usadas para tratar el edema, bronquitis crónica y congestion carfiacao insuficiencia renal crónica. 2006 The Author(s).
6. De Camargo B. Estrés, Síndrome General de Adaptación o Reacción General de Alarma. *Rev Méd Cient [Internet]*. 8 de agosto de 2010
7. Stewart TJ, Tong W, Whitfeld MJ. The associations between psychological stress and psoriasis: a systematic review. *Int J Dermatol*. 2018 Nov;57(11):1275-1282. doi: 10.1111/ijd.13956. Epub 2018 Mar 8. PMID: 29516474.
8. Mauranges A. Symptômes et caractéristiques du burn out [Symptoms and characteristics of burnout]. *Soins*. 2018 Nov;63(830):28-32. French. doi: 10.1016/j.soin.2018.09.006. PMID: 30449467
9. Pignalberi C, Ricci R, Santini M. Stress psicologico e morte improvvisa [Psychological stress and sudden death]. *Ital Heart J Suppl*. 2002 Oct;3(10):1011-21. Italian. PMID: 1247882
10. Naranjo Pereira, María Luisa (2009). UNA REVISIÓN TEÓRICA SOBRE EL ESTRÉS Y ALGUNOS ASPECTOS RELEVANTES DE ÉSTE EN EL ÁMBITO EDUCATIVO. *Revista Educación*, 33 (2), 171-190. [Fecha de Consulta 30 de Septiembre de 2021]. ISSN: 0379-7082.
11. Licinio J. Advances in research on stress and behavior: special issue, 2020. *Mol Psychiatry*. 2020 May;25(5):916-917. doi: 10.1038/s41380-020-0741-5. PMID: 32355250.
12. Thomas Münzel, Giovanni G. Camici, Christoph Maack, Nicole R. Bonetti, Valentin Fuster, Jason C. Kovacic, Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series, *Journal of the American College of Cardiology*, Volume 70, Issue 2, 2017, Pages 212-229, ISSN 0735-1097

13. ALONSO, N., GRANADA, M. L., LUCAS, A., SALINAS, I., & SANMARTI, A. (2003). Enfermedad de Addison. Tratamiento sustitutivo con glucocorticoides y su monitorización. *Endocrinología y Nutrición*, 50(12), 390–395. Gonçalves F, Aizpiri J, Barbado JA, Cañones P, Fernández A, Rodríguez JJ, et al. Síndrome de burn-out en el médico general. *Medicina General*. 2002;43:278-83.
14. Gonçalves F, Aizpiri J, Barbado JA, Cañones P, Fernández A, Rodríguez JJ, et al. Síndrome de burn-out en el médico general. *Medicina General*. 2002;43:278-83.
15. Santus, P., Corsico, A., Solidoro, P., Braidó, F., Di Marco, F. y Scichilone, N. (2014). Estrés oxidativo y sistema respiratorio: reevaluación farmacológica y clínica de N-acetilcisteína. *EPOC*, 11 (6), 705–717.
16. Ciencewicki, J., Trivedi, S. y Kleeberger, SR (2008). Oxidantes y patogenia de enfermedades pulmonares. *Revista de alergia e inmunología clínica*, 122 (3), 456–470.
17. Gómez, B., & Escobar, A. (2006). Artemisa Estrés y sistema inmune, 7(1), 1–9.
18. Romero Romero EE, Young J, Salado-Castillo R. FISIOLÓGÍA DEL ESTRÉS Y SU INTEGRACIÓN AL SISTEMA NERVIOSO Y ENDOCRINO. *Rev Méd Cient [Internet]*. 24 de mayo de 2021 [citado 27 de agosto de 2022];32(1):61-70.¿
19. Kim, GH, Kim, JE, Rhie, SJ y Yoon, S. (2015). El papel del estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas. *Neurobiología experimental*, 24 (4), 325–340.
20. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*. 2006 Jun;97(6):1634-58. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x. PMID: 16805774.
21. Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B. J., Shaman, A., & Gupta, S. (2012). The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 10, 49.
22. Duval, Fabrice, González, Félix, & Rabia, Hassen. (2010). Neurobiología del estrés. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, 48(4), 307-318.
23. Bickers DR, Athar M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J Invest Dermatol*. 2006 Dec;126(12):2565-75. doi: 10.1038/sj.jid.5700340. PMID: 17108903.
24. Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S. y Crowe, SE (2014). Estrés oxidativo: factor esencial en la patogenia de las enfermedades de la mucosa gastrointestinal. *Revisiones fisiológicas*, 94 (2), 329–354.
25. Bouayed, J. y Bohn, T. (2010). Antioxidantes exógenos: espadas de doble filo en estado redox celular: efectos beneficiosos para la salud en dosis

- fisiológicas versus efectos nocivos en dosis altas. *Medicina oxidativa y longevidad celular*, 3 (4), 228-237.
26. Bouayed J, Bohn T. Exogenous antioxidants--Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev*. 2010 Jul-Aug;3(4):228-37. doi: 10.4161/oxim.3.4.12858. PMID: 20972369; PMCID: PMC2952083
 27. Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2016). Guyton y Hall: Compendio de fisiología médica (13a ed. --). Barcelona: Elsevier. Capítulo 67.
 28. Aguilar, TAF, Navarro, BCH y Pérez, JAM (2016). Antioxidantes endógenos: una revisión de su papel en el estrés oxidativo. Un regulador maestro del estrés oxidativo: el factor de transcripción Nrf2. doi: 10.5772 / 65715
 29. Krishna M. Anatomía microscópica del hígado. *Clin Liver Dis (Hoboken)*. 2014;2(Suppl 5):109-112. Published 2014 Jan 13. doi:10.1002/cld.287
 30. Brown DR, Gough LA, Deb SK, Sparks SA, McNaughton LR. Astaxanthin in exercise metabolism, performance and recovery: a review. *Front Nutr*. 2017;4:76. doi:10.3389/fnut.2017.00076
 31. Ramsay DS, Woods SC. Clarifying the roles of homeostasis and allostasis in physiological regulation. *Psychol Rev*. 2014;121(2):225-247. doi:10.1037/a0035942
 32. González-torres, M. C., & Ortiz-muñiz, M. B. R. (2000). Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Bioquímica*, 25(1), 3–9.
 33. González-Torres, María Cristina y Betancourt-Rule, Miguel y Ortiz-Muñiz, Rocío (2000). Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*, 25 (1), 3-9. [Fecha de Consulta 30 de Septiembre de 2021]. ISSN: 0185-5751. Disponible en:
 34. Ni Y, Nagashimada M, Zhuge F, Zhan L, Nagata N, Tsutsui A, Nakanuma Y, Kaneko S, Ota T *Sci Rep*. 25 de noviembre de 2015; 5 (): 17192.
 35. Ambati, RR, Phang, SM, Ravi, S. y Aswathanarayana, RG (2014). Astaxantina: fuentes, extracción, estabilidad, actividades biológicas y sus aplicaciones comerciales: una revisión. *Drogas marinas*, 12 (1), 128-152.
 36. Roldán, P. L., & Mach, N. (2012). Effect of consumption of astaxanthin in health. *Rev Esp Nutr Comunitaria*, 18(3), 164–177.
 37. Higuera-Ciapara I, Félix-Valenzuela L, Goycoolea FM. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2006;46(2):185-96. doi: 10.1080/10408690590957188. PMID: 16431409
 38. Chang MX, Xiong F. Astaxanthin and its Effects in Inflammatory Responses and Inflammation-Associated Diseases: Recent Advances and Future Directions. *Molecules*. 2020 Nov 16;25(22):5342. doi: 10.3390/molecules25225342. PMID: 33207669; PMCID: PMC7696511.
 39. Sibulesky, L. (2013), Anatomía normal del hígado. *Anatomía normal del hígado*, 2: S61Ş-S63Ş.

40. Manterola, C., del Sol, M., Ottone, N., & Otzen, T. (2017). Anatomía Quirúrgica y Radiológica del Hígado. Fundamentos para las Resecciones Hepáticas Radiological and Surgical Anatomy of the Liver and Fundamentals of the Various Options Liver Resections. In *Int. J. Morphol* (Vol. 35, Issue 4).
41. Pereira CP, Souza AC, Vasconcelos AR, Prado PS and Name JJ: Antioxidant and anti-inflammatory mechanisms of action of astaxanthin in cardiovascular diseases (Review). *Int J Mol Med* 47: 37-48, 2021
42. González-torres, M. C., & Ortiz-muñiz, M. B. R. (2000). Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Bioquímica*, 25(1), 3–9.
43. Quintanar Escorza, M. A., & Calderón Salinas, J. V. (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*, 28(3), 89–101.
44. Petri , D & Lundebye , AK (2007) Distribución tisular de astaxantina en ratas después de la exposición a niveles graduales en el alimento . *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 145 , 202 - 209 .
45. Kistler , A , Liechti , H , Pichard , L y col. (2002) Metabolismo y propiedades inductoras de CYP de la astaxantina en el hombre y en los hepatocitos humanos primarios . *Arch Toxicol* 75 , 665 - 675 .
46. Treuting, P. M., & Dintzis, S. M. (2012). *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas*. Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas.
47. Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2014;20(25):8082-8091. doi:10.3748/wjg.v20.i25.8082
48. Li S, Tan HY, Wang N, et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int J Mol Sci*. 2015;16(11):26087-26124. Published 2015 Nov 2. doi:10.3390/ijms161125942
49. Zhu, R., Wang, Y., Zhang, L., & Guo, Q. (2012). Oxidative stress and liver disease. *Hepatology Research*, 42(8), 741–749.
50. Liu, X.; Shibata, T.; Hisaka, S.; Osawa, T. Astaxanthin inhibits reactive oxygen species-mediated cellular toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells via mitochondria-targeted protective mechanism. *Brain Res*. 2009, 1254, 18–27.
51. Andrea González, Camila Huerta-Salgado, Josué Orozco-Aguilar, Francisco Aguirre, Franco Tacchi, Felipe Simon, Claudio Cabello-Verrugio , " Papel del estrés oxidativo en las disfunciones hepáticas y extrahepáticas durante la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) ", *Medicina oxidativa y Longevidad celular* , vol. 2020 , ID de artículo 1617805 , 16 páginas , 2020 .
52. Ibtissem, BA, Hajer, BS, Ahmed, H., Awatef, E., Choumous, K., Ons, B., Mounir, ZK y Najiba, Z. (2017). Estrés oxidativo y cambios histopatológicos

- inducidos por metiltiofanato, un fungicida sistémico, en sangre, hígado y riñón de ratas adultas. *Ciencias de la salud africanas*, 17 (1), 154–163.
53. Li, S., Tan, H. Y., Wang, N., Zhang, Z. J., Lao, L., Wong, C. W., & Feng, Y. (2015). The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26087–26124
 54. Judith, D., Sánchez, G., & Enlace, P. De. (1936). Respuesta al estrés actualidades en el eje psico-neuro-inmuno-endocrino en enfermedades agudas y crónicas.
 55. Mullol I Miret, J., Pujols, L., & Picado, C. (1996). Mecanismos de acción de los glucocorticoides. Aplicación al tratamiento de la inflamación respiratoria. *Archivos de Bronconeumología*, 32(10), 527–534.
 56. Cordoba Nancy, Acero Nadine, Luisa, D., Jimenez, A. J., & Serna, J. J. A. (2015). Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *UGCiencia*, 21(0), 73–82.
 57. Bojórquez Ramos, M. (2014). Enfermedad por hígado graso no alcohólico en pediatría. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 52(5), 110-110s114.
 58. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de la Federación*. 6 Dic 1999.
 59. Zablah, G., & Salem, K. De. (2016). Benefits From Antioxidants in Non Alcoholic. 10(2), 37–49. Bojórquez Ramos, M. (2014). Enfermedad por hígado graso no alcohólico en pediatría. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 52(5), 110-110s114.
 60. F. Higuera-de la Tijera, A. Servín-Caamaño, A. N.-E. (2018). Gastroenterología de México Sesión de trabajos libres orales. *Revista De Gastroenterología De México*, 83(Supl 2), 9–13.
 61. Ni Y, Nagashimada M, Zhuge F, Zhan L, Nagata N, Tsutsui A, Nakanuma Y, Kaneko S, Ota T. Astaxanthin prevents and reverses diet-induced insulin resistance and steatohepatitis in mice: A comparison with vitamin E. *Sci Rep*. 2015 Nov 25;5:17192. doi: 10.1038/srep17192. PMID: 26603489; PMCID: PMC4658633.
 62. Cusi K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology* **142**, 711–725 e716 (2012).
 63. Matsuzawa N. et al. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology* **46**, 1392–1403 (2007)
 64. Matsuzawa, N., Takamura, T., Kurita, S., Misu, H., Ota, T., Ando, H., Yokoyama, M., Honda, M., Zen, Y., Nakanuma, Y., Miyamoto, K.-i. y Kaneko, S. (2007), el estrés oxidativo inducido por lípidos causa esteatohepatitis en ratones alimentados con una dieta aterogénica. *Hepatología*, 46: 1392-1403.

65. Cannon, W.B. 1932. *The Wisdom of the Body*. W.W. Norton.
66. Yi, T.N., Y. Huang, M.I. Simon, and J. Doyle. 2000. Robust perfect adaptation in bacterial chemotaxis through integral feedback control. *PNAS* 97: 4649-4653.
67. Bjelakovic, G., Gluud, L. L., Nikolova, D., Bjelakovic, M., Nagorni, A., & Gluud, C. (2011). Antioxidant supplements for liver diseases. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi:10.1002/14651858.cd007749.pub2 10.1002/14651858.cd007749.pub2
68. Papel del estrés oxidativo en el desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica M. Galicia-Moreno G. Gutiérrez-Reyes Revista de Gastroenterología de México vol. 79 issue 2(2014) pp: 135-144 Published by Elsevier.
69. Kleiner DE, Chalasani NP, Lee WM, Fontana RJ, Bonkovsky HL, Watkins PB, Hayashi PH, Davern TJ, Navarro V, Reddy R, Talwalkar JA, Stolz A, Gu J, Barnhart H, Hoofnagle JH; Drug-Induced Liver Injury Network (DILIN). Hepatic histological findings in suspected drug-induced liver injury: systematic evaluation and clinical associations. *Hepatology*. 2014 Feb;59(2):661-70. doi: 10.1002/hep.26709. Epub 2013 Dec 18. PMID: 24037963; PMCID: PMC3946736.
70. Lee WM, Senior JR. Reconocimiento de la lesión hepática inducida por fármacos: problemas actuales, posibles soluciones. *Toxicol Pathol*. 2005; 33 : 155-164.
71. Ramachandran R, Kakar S. Patrones histológicos en la enfermedad hepática inducida por fármacos. *J Clin Pathol*. 2009; 62 : 481-492.
72. Kleiner DE. The histopathological evaluation of drug-induced liver injury. *Histopathology*. 2017 Jan;70(1):81-93. doi: 10.1111/his.13082. PMID: 27960237.
73. Espinoza, Omar, Bustos-Obregón, Eduardo, & Suja, José A. (2002). EFECTO DEL PARATHION SOBRE EL ÍNDICE DE APOPTOSIS EN HEPATOCITOS DE RATONES CF1. *Revista chilena de anatomía*, 20(1), 29-36.
74. Susin, SA, Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, KF, Irinopoulou, T., Prévost, MC, Brothers, G., Mak, TW, Penninger, J., Earnshaw, WC y Kroemer, G. (2000). Dos vías distintas que conducen a la apoptosis nuclear. *The Journal of experimental medicine*, 192 (4), 571-580.
75. Usefulness of pas-stain in histopathological diagnosis Tamar Hajar Serviansky,1 Nicole S. Kresch Tronik,1 Gabriela Moreno Coutiño,2 Roberto Arenas,2 Ma. Elisa Vega Memije3. Dec 2012.
76. Czaja MJ. Cell signaling in oxidative stress-induced liver injury. *Semin Liver Dis*. 2007 Nov;27(4):378-89. doi: 10.1055/s-2007-991514. PMID: 17979074.
77. PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DE LAS ENFERMEDADES NO TRANSMISIBLES EN MÉXICO, 2020 Secretaría de Salud Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud Dirección General de Epidemiología

77. COMUNICADO DE PRENSA NÚM. 592/21 28 DE OCTUBRE DE 2021
PÁGINA 1/4 COMUNICACIÓN SOCIAL CARACTERÍSTICAS DE LAS
DEFUNCIONES REGISTRADAS EN MÉXICO DURANTE 2020
78. Galicia-Moreno, M., & Gutiérrez-Reyes, G. (2014). Papel del estrés oxidativo en el desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica. *Revista de Gastroenterología de México*, 79(2), 135–144.
79. At a Glance Cells 2 Epithelial Tissue 76 Exocrine Glandular Epithelium 90 Connective and Supportive Tissue 100 Muscular Tissue 158 Nerve Tissue 180 Blood Vessels, Blood and Immune System 200 Endocrine Glands 254 Digestive System 272 Respiratory System 340 Urinary Organs 352 Male Sexual Organs 376 Female Sexual Organs 400 Integumentary System, Skin 438 Somatosensory Receptors 450 Sensory Organs 458 Central Nervous System.
80. Urtasun R, Nieto N. Células estrelladas hepáticas y estrés oxidativo [Hepatic stellate cells and oxidative stress]. *Rev Esp Enferm Dig*. 2007 Apr;99(4):223-30. Spanish. doi: 10.4321/s1130-01082007000400007. PMID: 17590105.
81. Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci*. 2002 Apr 1;7:d808-26. doi: 10.2741/reeves. PMID: 11897564.
82. Li J, Guo C, Wu J. Astaxanthin in Liver Health and Disease: A Potential Therapeutic Agent. *Drug Des Devel Ther*. 2020 Jun 9;14:2275-2285. doi: 10.2147/DDDT.S230749. PMID: 32606597; PMCID: PMC7293384.
83. Wu L, Mo W, Feng J, Li J, Yu Q, Li S, Zhang J, Chen K, Ji J, Dai W, Wu J, Xu X, Mao Y, Guo C. Astaxanthin attenuates hepatic damage and mitochondrial dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease by up-regulating the FGF21/PGC-1 α pathway. *Br J Pharmacol*. 2020 Aug;177(16):3760-3777. doi: 10.1111/bph.15099. Epub 2020 Jun 27. PMID: 32446270; PMCID: PMC7393201.
- Serebruany V, Malinin A, Goodin T, Pashkow F. The in vitro effects of Xancor, a synthetic astaxanthine derivative, on hemostatic biomarkers in aspirin-naive and aspirin-treated subjects with multiple risk factors for vascular disease. *Am J Ther*. 2010;17(2):125–132. doi:10.1097/MJT.0b013e31819cddb
84. Failla ML, Chitchumronchokchai C, Ferruzzi MG, Goltz SR, Campbell WW. Unsaturated fatty acids promote bioaccessibility and basolateral secretion of carotenoids and alpha-tocopherol by Caco-2 cells. *Food Funct*. 2014;5(6):1101–1112. doi:10.1039/C3FO60599J
85. Ranga Rao A, Raghunath Reddy RL, Baskaran V, Sarada R, Ravishankar GA. Characterization of microalgal carotenoids by mass spectrometry and their bioavailability and antioxidant properties elucidated in rat model. *J Agric Food Chem*. 2010;58(15):8553–8559. doi:10.1021/jf101187k
86. Fassett, R.G.; Coombes, J.S. Astaxanthin, oxidative stress, inflammation and cardiovascular disease. *Future Cardiol*. 2009, 5, 333–342.

87. Zhang L, Wang H. Multiple Mechanisms of Anti-Cancer Effects Exerted by Astaxanthin. *Mar Drugs*. 2015 Jul 14;13(7):4310-30. doi: 10.3390/md13074310. PMID: 26184238; PMCID: PMC4515619.
88. Kavitha, K.; Kowshik, J.; Kishore, T.K.; Baba, A.B.; Nagini, S. Astaxanthin inhibits NF-kappaB and Wnt/beta-catenin signaling pathways via inactivation of Erk/MAPK and PI3K/Akt to induce intrinsic apoptosis in a hamster model of oral cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, 1830, 4433–4444.
89. Tanaka, T.; Morishita, Y.; Suzui, M.; Kojima, T.; Okumura, A.; Mori, H. Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by the naturally occurring carotenoid astaxanthin. *Carcinogenesis* **1994**, 15, 15–19.
90. Song, X.D.; Zhang, J.J.; Wang, M.R.; Liu, W.B.; Gu, X.B.; Lv, C.J. Astaxanthin induces mitochondria-mediated apoptosis in rat hepatocellular carcinoma CBRH-7919 cells. *Biol. Pharm. Bull.* **2011**, 34, 839–844
91. Song, X.; Wang, M.; Zhang, L.; Zhang, J.; Wang, X.; Liu, W.; Gu, X.; Lv, C. Changes in cell ultrastructure and inhibition of JAK1/STAT3 signaling pathway in CBRH-7919 cells with astaxanthin. *Toxicol. Mech. Methods* **2012**, 22, 679–686.
92. Nagendraprabhu, P.; Sudhandiran, G. Astaxanthin inhibits tumor invasion by decreasing extracellular matrix production and induces apoptosis in experimental rat colon carcinogenesis by modulating the expressions of ERK-2, NFkB and COX-2. *Investig. New Drugs* **2011**, 29, 207–224.
93. Yasui, Y.; Hosokawa, M.; Mikami, N.; Miyashita, K.; Tanaka, T. Dietary astaxanthin inhibits colitis and colitis-associated colon carcinogenesis in mice via modulation of the inflammatory cytokines. *Chem. Biol. Interact.* **2011**, 193, 79–87.
94. Henriquez V, Escobar C, Galarza J, Gimpel J. Carotenoids in Microalgae. *Su bcell Biochem.* 2016;79:219–237.
95. Fassett RG, Coombes JS. Astaxanthin in cardiovascular health and disease. *Molecules.* 2012;17(2):2030–2048. doi:10.3390/molecules17022030
96. Zhang L, Wang H. Multiple mechanisms of anticancer effects exerted by ast axanthin. *Mar Drugs*. 2015;13(7):4310–4330. doi:10.3390/md13074310
97. Ruj, E. (n.d.). *H istología*.
98. Ross, M. H., & Pawlina, W. (2013). *Histología: Texto y atlas color con biología celular y molecular* (6a. ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
99. Crosas-Molist E, Fabregat I. Role of NADPH oxidases in the redox biology of liver fibrosis. *Redox Biol.* 2015 Dec;6:106-111. doi: 10.1016/j.redox.2015.07.005. Epub 2015 Jul 14. PMID: 26204504; PMCID: PMC4804101.
100. Krishna M. Anatomía microscópica del hígado. *Clin Liver Dis (Hoboken)*. 2014 Jan 13;2(Suppl 5):109-112. Spanish. doi: 10.1002/cld.287. PMID: 31333838; PMCID: PMC6448680.

101. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:8416763. doi: 10.1155/2017/8416763. Epub 2017 Jul 27. PMID: 28819546; PMCID: PMC5551541.
102. Tan SY, Yip A. Hans Selye (1907-1982): Founder of the stress theory. *Singapore Med J*. 2018 Apr;59(4):170-171. doi: 10.11622/smedj.2018043. PMID: 29748693; PMCID: PMC5915631.
103. McEwen BS. Stressed or stressed out: what is the difference? *J Psychiatry Neurosci*. 2005 Sep;30(5):315-8. PMID: 16151535; PMCID: PMC1197275.
104. Rahimi L, Rajpal A, Ismail-Beigi F. Glucocorticoid-Induced Fatty Liver Disease. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020 Apr 16;13:1133-1145. doi: 10.2147/DMSO.S247379. PMID: 32368109; PMCID: PMC7171875.
105. Conor P. Woods, Jonathon M. Hazlehurst, Jeremy W. Tomlinson, Glucocorticoids and non-alcoholic fatty liver disease, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Volume 154, 2015, Pages 94-103,
106. Jun Jin, C., Baumann, A., Brandt, A., Janina Engstler, A., Nier, A., Hege, M., Schmeer, C., Kehm, R., Höhn, A., Grune, T., Witte, O. W., & Bergheim, I. (2020). Aging-related liver degeneration is associated with increased bacterial endotoxin and lipopolysaccharide binding protein levels.
107. Choi HD, Youn YK, Shin WG. Positive effects of astaxanthin on lipid profiles and oxidative stress in overweight subjects. *Plant Foods Hum Nutr*. 2011 Nov;66(4):363-9. doi: 10.1007/s11130-011-0258-9. PMID: 21964877.
108. Shen, M., Chen, K., Lu, J., Cheng, P., Xu, L., Dai, W., Wang, F., He, L., Zhang, Y., Chengfen, W., Li, J., Yang, J., Zhu, R., Zhang, H., Zheng, Y., Zhou, Y., & Guo, C. (2014). Protective effect of astaxanthin on liver fibrosis through modulation of TGF- β 1 expression and autophagy. *Mediators of Inflammation*