



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

ITM

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
HEPATOPROTECTORA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
Sargassum fluitans Bogesen”**

OPCIÓN:

TESIS

PARA OPTAR AL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Q.F.B. ANGEL DE JESUS ORTIZ TELLO

ASESORAS:

DRA. ROSA ESTER MOO PUC

DRA. ELIZABETH DE LA LUZ ORTIZ VÁZQUEZ

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

28 DE JUNIO DE 2018

DEPENDENCIA: DIV. DE EST. DE POSG. E INV.
No. DE OFICIO: X-274/18.

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN.

Mérida, Yucatán, **20/junio/2018**

C. ORTIZ TELLO ANGEL DE JESUS.
Pasante de Maestría en Ciencias de los
Alimentos y Biotecnología.
PRESENTE

De acuerdo al fallo emitido por su asesor la **Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez co-asesorado por la Dra. Rosa Esther Moo Puc** y la comisión revisora integrada por el Dr. Denis Israel Magaña Ortiz, y el M.C. Jesús Manuel Ramón Sierra. Considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la Tesis.

"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y HEPATOPROTECTORA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Sargassum fluitans* Borgesen"

ATENTAMENTE
IN HOC SIGNO VINCES



M.C. DANIEL ARCÁNGEL LÓPEZ SAURI
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN.



S. E. P.
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE MERIDA
DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION

C.p. Archivo
DAL5/fja,

Agradecimientos

La vida es una caja de sorpresas, hoy me da la oportunidad de terminar una meta más desde que decidí seguir el camino de la ciencia. Es fascinante concluir una propuesta planteada con la finalidad de aportar un pequeño grano de conocimiento a la sociedad de mi país, mi lindo y querido México. No fue fácil, la vida académica y científica implica muchos sacrificios, es por ello que extiendo mi más sincero agradecimiento:

A nuestro gran creador Dios todopoderoso, por darme la fortuna de tener vida y salud, ya que sin él no hubiera podido concluir este proyecto, y al que estoy inmensamente agradecido por tantas bendiciones.

A la Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez, que me permitió ser su alumno y que me enseñó que las oportunidades están disponibles para aquellos que quieren salir adelante, gracias por aceptarme en el posgrado que hoy concluyo con mucha satisfacción.

A la Dra. Rosa Esther Moo Puc, por enseñarme a lo largo de estos últimos años el cariño y el gusto por la ciencia, pero sobre todo por la oportunidad de confiar en mí, y darme la oportunidad de continuar con mi gran anhelo de estudiar un posgrado.

Al Dr. Denis Israel Magaña Ortiz y M. en C. Jesús Manuel Ramón Sierra, por el apoyo, amistad y aporte de sus conocimientos brindados para concluir este trabajo.

A mi Familia, a quienes amo con todo mi corazón, ya que desde que llegue a este mundo me han apoyado en todas las decisiones y me han brindado todo su apoyo para hacerle frente a las situaciones complicadas y a aquellos seres queridos que no se encuentran presentes pero que siempre guardo en mi alma.

A todos mis compañeros y amigos de los distintos laboratorios a los que tuve la fortuna de llevar a cabo mis experimentos, por los buenos momentos que tuvimos durante la convivencia y sus buenos consejos.

“El éxito no es el final, el fracaso no es fatal: es el coraje para continuar lo que cuenta”

Winston Churchill

Contenido

Índice de Figuras.....	3
Índice de Tablas	4
Abreviaturas.....	5
Resumen.....	7
Abstract.....	9
Capítulo 1. Introducción	11
Capítulo 2. Antecedentes.....	13
2.1 El hígado.....	13
2.1.1 Biotransformación de sustancias dañinas.....	14
2.2. Epidemiología.....	15
2.3 Etiología de la cirrosis hepática.....	15
2.4 Blancos potenciales para revertir el daño hepático	19
2.5 Mecanismos de defensa antioxidante	20
2.5.1 Factor de transcripción Nrf2	21
2.6 Tratamiento.....	22
2.7 Macroalgas	25
2.7.1 Género <i>Sargassum</i>	24
2.7.2 <i>Sargassum fluitans</i>	24
2.8 Actividad biológica de las macroalgas	25
2.8.1 Actividad antioxidante.....	25
2.8.2 Actividad hepatoprotectora.....	26
2.9 Compuestos aislados en macroalgas	26
Capítulo 3. Justificación	31
Capítulo 4. Hipótesis.....	32
Capítulo 5. Objetivos	33
5.1 Objetivo general.....	33
5.2 Objetivos particulares.	33
Capítulo 6. Materiales y métodos	34
6.1 Colecta de material de estudio.....	34

6.2 Estudios <i>in vitro</i>	34
6.2.1 Actividad antioxidante	34
6.3 Estudios <i>in vivo</i>	37
6.3.1 Animales	37
6.3.2 Determinación de la dosis máxima tolerable en ratones	37
6.3.3 Determinación de la actividad hepatoprotectora	38
6.8 Análisis estadístico	43
Capítulo 7. Resultados y Discusiones	44
7.1 Estudios <i>in vitro</i>	44
7.1.1 Actividad antioxidante	44
7.2 Estudios <i>in vivo</i>	49
7.2.1 Dosis máxima tolerable en ratones	49
7.2.2 Actividad hepatoprotectora	50
Capítulo 8. Conclusiones	68
Capítulo 9. Perspectivas	69
Bibliografía	70

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura del lobulillo hepático.....	13
Figura 2. Diagrama esquemático del sinusoides hepático.	16
Figura 3. Activación de las CHE.	18
Figura 4. Estructura de la silibina.....	23
Figura 5. Rama de <i>S. fluitans</i>	26
Figura 6. Método de dosis fijas	38
Figura 7. Curva concentración-efecto del porcentaje de captación de radicales libres	44
Figura 8. Curva concentración-efecto del porcentaje de poder reductor	45
Figura 9. Curva concentración-efecto de capacidad quelante.....	46
Figura 10. Porcentaje promedio de cambio corporal.....	50
Figura 11. Tiempo de latencia de los grupos experimentales	52
Figura 12. Duración de sueño de los grupos experimentales.....	53
Figura 13. Fotografías representativas del tejido hepático de los diferentes grupos experimentales obtenidos con la tinción de hematoxilina y eosina (H&E).....	59
Figura 14. Fotografías representativas de tejido hepático de los diferentes grupos experimentales obtenidos con la tinción tricrómica de Masson	60
Figura 15. Promedio de hepatocitos.....	61
Figura 16. Promedio de células infiltradas.....	62
Figura 17. Porcentaje promedio de fibras de colágeno	63
Figura 18. Clasificación de daño hepático de cada grupo experimental	64

Índice de Tablas

Tabla 1. Función de los principales antioxidantes	21
Tabla 2. Compuestos con actividad biológica aislados de extractos de algas.....	29
Tabla 3. Modelo experimental realizado para la inducción de daño hepático con CCl₄.....	39
Tabla 4. Peso relativo del hígado de los grupos experimentales	55
Tabla 5. Marcadores serológicos de daño hepático	57

Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ALT: Alanino Aminotransferasa.

ANOVA: Análisis de Varianza.

ARE: Siglas en inglés de Elemento de Respuesta Antioxidante.

AST: Aspartato Aminotransferasa.

CCl₄: Tetracloruro de Carbono.

CAT: Catalasa.

CHE: Célula Hepática Estrellada.

CES: Célula Endoteliales Sinusoidales.

CE₅₀: Concentración Efectiva Media.

CI₅₀: Concentración Inhibitoria Media.

CIR: Centro de Investigaciones Regionales.

CK: Célula Kupffer.

CNP: Células No Parenquimales.

Col I: Colágeno tipo I.

Col II: Colágeno tipo II.

DPPH: 2,2-Difenil-1-Picrylhydrazyl.

EE: Extracto Etanólico.

EA: Extracto Acuoso.

EDTA: Ácido Etilen Diamino Tetracético.

EM: Extracto Metanólico.

ERO's: Especies Reactivas de Oxígeno.

FA: Fosfatasa alcalina.

GPx: Glutación Peroxidasa.

GRed: Glutación Reductasa.

SH: Glutación Reducido.

GST: Glutati3n S Transferasa.

H: Hepatocito.

H&E: Hematoxilina y Eosina.

IFN- α : Siglas en ingl3s de Interfer3n alfa.

INEGI: Instinto Nacional de Estadística Geogr3fica e Inform3tica.

i.p.: Intraperitoneal.

LPS: Lipopolisac3ridos.

MEC: Matriz Extracelular.

MMP: Metaloproteasas.

NF- κ B: Siglas en ingl3s de Factor Nuclear kappa B.

Nrf2: Siglas en ingl3s de Factor Nuclear Eritroide Relacionado con Factor 2.

OECD: Siglas en ingl3s de Organizaci3n para la Cooperaci3n y el Desarrollo Econ3mico.

OMS: Organizaci3n Mundial de la Salud.

PDGF: Siglas en ingl3s de Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas.

SNC: Sistema Nervioso Central.

SOD: Super3xido Dismutasa.

TGF- β 1: Siglas en ingl3s de Factor de Crecimiento Transformante β 1.

TD: Tiempo Dormido.

TL: Tiempos de Latencia.

TM: Tigr3mica de Masson.

UADY: Universidad Aut3noma de Yucat3n.

VIH: Virus de Inmunodeficiencia humana.

VHC: Virus de Hepatitis C.

v.o.: Vía oral.

v.sc.: Vía subcut3nea.

Resumen

El hígado es un órgano de vital importancia para el bienestar del cuerpo humano, entre sus funciones se encuentran la síntesis, secreción y biotransformación de sustancias. La biotransformación es un proceso importante e implicado en la reducción de la toxicidad de ciertas sustancias como los fármacos. Sin embargo, el consumo prolongado de fármacos en pacientes con padecimientos como la diabetes e hipertensión provoca daños inminentes en el hígado que desencadenan en cirrosis. La cirrosis es una enfermedad caracterizada por un desorden estructural a nivel celular, alteración del flujo sanguíneo y un incremento de la incapacidad del hígado para llevar a cabo sus funciones.

Según la OMS las enfermedades hepáticas se encuentran entre las principales causas de muerte a nivel mundial; solamente en México durante el 2016 ocupó el cuarto lugar de mortalidad en individuos de 15 a 64 años de edad. Actualmente se encuentran estudiando nuevos compuestos que sean de utilidad para la protección y disminución de los efectos dañinos ocasionados al hígado. Un área prometedora para la obtención de estos compuestos son los organismos marinos debido a las condiciones climáticas de temperatura y luz a la que se encuentran sometidas, entre los organismos marinos se ubican las algas marinas las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en la península de Yucatán.

En el presente trabajo se propuso determinar el efecto antioxidante y hepatoprotector del alga café *Sargassum fluitans*. El efecto antioxidante se determinó *in vitro* a través de la medición del porcentaje de captación de radicales libres DPPH, poder reductor de Fe (III) y quelante de Cu (II). Se estableció la dosis máxima no tóxica (tolerable) en ratones Balb/c mediante el uso de dosis fijas y se investigó el efecto hepatoprotector en ratas Wistar en un modelo de daño hepático inducido con CCl₄. Las ratas fueron tratadas con extracto etanólico de *S. fluitans* oralmente a una dosis de 50 mg/kg de peso corporal diariamente durante 12 semanas. Finalmente se tomaron muestras sanguíneas y se realizaron cortes histológicos del hígado para su análisis.

Los resultados indicaron que el extracto etanólico de *S. fluitans* mostró poseer un efecto antioxidante de captación de radicales libres DPPH, reductor de Fe (III) y quelante de Cu (II), además de ser inocuo, ya que no se observó toxicidad aguda en los animales evaluados durante la administración de dosis $\leq 5\text{g/kg}$. La administración de CCl_4 incrementó significativamente ($p < 0.05$) las enzimas de daño hepático; aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (FA); mientras que el tratamiento con el extracto etanólico de *S. fluitans* protegió al hígado ya que no incrementó significativamente ($p < 0.05$) las enzimas hepáticas AST, ALT y FA.

Los cortes histológicos del grupo de CCl_4 mostraron un decremento del número de hepatocitos y un incremento de células infiltradas con la cuantificación de las imágenes obtenidas a partir de la tinción de hematoxilina & eosina y se observó un incremento de fibras de colágeno con la tinción tricrómica de Masson, mientras que el grupo con tratamiento con extracto etanólico de *S. fluitans* no mostró un decremento del número de hepatocitos, incremento de células infiltradas e incremento de fibras de colágeno, siendo significativamente diferentes al grupo de CCl_4 ($p < 0.05$). De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que el EE obtenido del alga *S. fluitans* de la costa de la península de Yucatán posee actividad antioxidante y hepatoprotectora, por lo que podría ser un buen candidato para la elaboración de un fitomedicamento que contrarreste los daños provocados al hígado.

Abstract

The liver is an organ of vital importance for the well-being of the human body, among its functions are the synthesis, secretion and biotransformation of substances. Biotransformation is an important process and is involved in reducing the toxicity of substances like the drugs. However, prolonged drug use in patients with conditions such as diabetes and hypertension cause imminent damage to the liver that triggers cirrhosis. Cirrhosis is a disease characterized by structural disorder at the cellular level, impaired blood flow and increased inability of the liver to carry out its functions.

According to WHO, liver diseases are among the leading causes of death worldwide; in Mexico alone during 2016 it ranked fourth in mortality in individuals 15 to 64 years of age. They are currently studying new chemical compounds that are useful for the protection and reduction of the harmful effects caused to the liver. A promising area for obtaining these compounds are marine organisms due to the climatic conditions of temperature and light to which they are subject, marine organisms include marine algae which are widely distributed in the Yucatan peninsula.

In the present work, it was proposed to determine antioxidant and hepatoprotective effect of brown seaweed *Sargassum fluitans*. The antioxidant effect was determined *in vitro* through the measurement of DPPH free radical uptake percentage, Fe (III) reducing power and Cu (II) chelating agent. The maximum non-toxic (tolerable) dose was established in Balb/c mice by using fixed doses and the hepatoprotective effect in Wistar rats was investigated in a model of liver damage induced with CCl₄. The rats were given ethanol extract of *S. fluitans* orally at dose of 50 mg /kg body weight for 12 weeks. Finally, blood samples were taken and histological sections of the liver were made for analysis.

The results indicated that the ethanol extract of *S. fluitans* showed to have an antioxidant effect of uptake of free radicals DPPH, reducer of Fe (III) and chelant of Cu (II), besides being innocuous, since no acute toxicity was observed in the animals evaluated during the administration of doses ≤ 5 g / kg. The administration of CCl₄ caused significant ($p < 0.05$) elevation of the liver damage enzymes; aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP). The treatment with ethanol extract of *S. fluitans* protected the liver since it did not increase significantly ($p < 0.05$) the liver enzymes AST, ALT y FA.

The histological sections of the CCl₄ group showed a decrease in the number of hepatocytes and an increase in infiltrated cells with the quantification of the images obtained from hematoxylin and eosin staining and an increase in collagen fibers was observed with the trichrome stain of Masson, while the group treated with ethanol extract of *S. fluitans* did not show a decrease in the number of hepatocytes, increase in infiltrated cells and increase in collagen fibers being significantly different from the CCl₄ group ($p < 0.05$). According to the results obtained, it is concluded that the EE obtained from the algae *S. fluitans* of the coast of the Yucatan Peninsula has antioxidant and hepatoprotective activity, so it could be a good candidate for the development of a phytomedicine to counteract the damage caused to the liver.

Capítulo 1. Introducción

El término enfermedad hepática hace referencia al mal funcionamiento del hígado que puede ser provocado por múltiples factores, como por ejemplo: una infección viral, la obesidad, enfermedades autoinmunes o el excesivo consumo de sustancias que pueden ser tóxicas al hígado. Entre estas enfermedades podemos encontrar a la cirrosis hepática. La cirrosis hepática es una enfermedad crónica y difusa del hígado que altera su estructura y función, desde el punto de vista histopatológico se caracteriza por pérdida del parénquima hepático, formación de septos fibrosos y nódulos de regeneración estructuralmente anormales (Mansejo, A. et al 2008).

Según datos obtenidos de la Organización Mundial de la Salud, indican que aproximadamente 2.3 millones de personas mueren cada año a causa de enfermedades hepáticas, de las cuales el 16.6% es atribuido al uso nocivo de sustancias, un mayor porcentaje en comparación con las muertes causadas por infecciones por virus de VIH (2.8%) y tuberculosis (1.7%) (OMS, 2016).

En México, de acuerdo al Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI), las enfermedades del hígado ocuparon el cuarto lugar de mortalidad en individuos de 30 a 59 años de edad durante el 2016, mientras que en Yucatán durante el 2017 ocurrieron 12.7% de muertes causadas por enfermedades hepáticas. Se ha planteado que en los siguientes años se incrementará la morbilidad y mortalidad de enfermedades hepáticas, en las que la cirrosis hepática será la principal causa (Mendez et al., 2005).

Entre el tratamiento disponible para inhibir la secreción hepatocelular de colágeno y frenar la producción de tejido fibroso se encuentra la colchicina; sin embargo, aún no se ha confirmado la eficacia de este medicamento, ya que el tratamiento genera severos efectos adversos (Rambaldi et al. 2005; Morgan et al.2005).

La falta de una terapia efectiva para evitar la progresión del daño hepático, ha generado múltiples líneas de investigación entre las que se incluyen la búsqueda de compuestos con actividad hepatoprotectora, denominada así debido a que tiene el objetivo de proteger al hígado de los efectos nocivos de hepatotoxinas que el hombre pueda ingerir o

contrarrestar las alteraciones en los mecanismos de defensa antirradicalarios (Adewusi E. et al. 2010).

La búsqueda de estos compuestos hepatoprotectores se ha realizado en su mayoría en especies de plantas (Liliana et al. 2009). Sin embargo, recientemente se ha visto que las especies marinas son una fuente importante para aislar estos compuestos. La ventaja de las especies marinas está basada en la gran diversidad estructural inducida por la presión ecológica a la que están sometidos, producen innumerables metabolitos secundarios que les sirven como antioxidantes, para la protección de enfermedades virales, hongos patógenos y depredadores o para otras funciones como la reproducción y la comunicación (Garateix, A. 2005).

Entre las especies marinas encontramos a las macroalgas. Las macroalgas han mostrado tener actividad citotóxica, antiproliferativa y antiprotozoaria en especies como: *Sargassum fluitans*, *Turbinaria tricostata*, *Dictyota ciliolata* y *Padinasanctae crucis* (Zubia et al. 2007; Freile Pelegrin et al. 2008; León Deniz et al. 2009; Moo Puc et al. 2008). Además se ha visto que las algas tienen efecto antioxidante, entre los reportes de efecto antioxidantes podemos encontrar a los realizados en las especies *Dictyota cervicornis*, *Dictyota ciliolata*, *Dictyota crenulata*, *Lobophora variegata*, *Padina gymnospora*, *Sargassum pteropleuron*, *Sargassum ramifolium*, y *Turbinaria tricostata* (Zubia et al. 2007).

Sin embargo, hasta ahora son pocos los trabajos enfocados a la búsqueda de compuestos hepatoprotectores basados en su capacidad antioxidante. En el presente trabajo se propone determinar en base a la capacidad antioxidante del extracto etanólico (EE) de *S. fluitans* el efecto hepatoprotector utilizando un modelo de daño hepático inducido con tetracloruro de carbono (CCl₄).

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 El hígado

El hígado es el órgano más grande y de vital importancia para el bienestar de todo el cuerpo, se encuentra dividido en dos grandes lóbulos derecho e izquierdo, se halla recubierta por una doble membrana fibrosa, el peritoneo visceral y la cápsula de Glisson. La unidad funcional del hígado es el lobulillo hepático, constituido por una vena central donde se disponen radialmente los hepatocitos hacia la periferia, en la periferia se encuentran cinco o seis espacios porta, cada uno de los cuales contiene una rama de la vena porta, una arteria hepática y un conducto biliar, como se observa en la figura 1 (García et al. 2012).

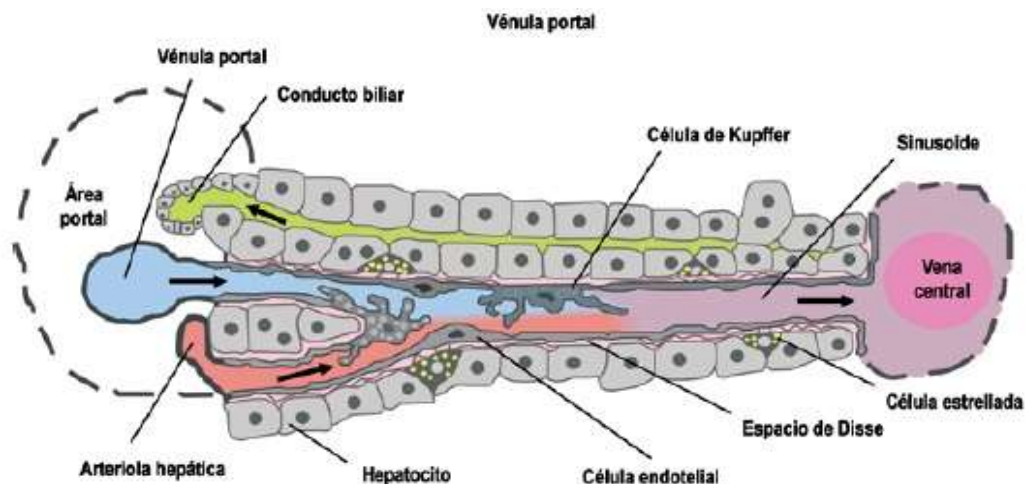


Figura 1. Estructura del lobulillo hepático, donde se muestra el espacio porta, la disposición de los hepatocitos, el sinusoides y el espacio de Disse (Baialardo A. 2015).

Entre las principales funciones del hígado se encuentran el control de infecciones, la síntesis, secreción y control de sustancias esenciales para el organismo como las proteínas y la glucosa, la principal fuente de energía del organismo; también entre sus funciones se encuentra la biotransformación de sustancias dañinas, cuya función es convertir sustancias dañinas en inocuas para el cuerpo humano y de esta forma ser excretadas (Matsumoto et al. 2018).

2.2.1 Biotransformación de sustancias dañinas

El término biotransformación ha sido definido como cualquier transformación química de fármacos y sustancias tóxicas, que se llevan a cabo en organismos vivos, principalmente en el hígado (Williams R.1974).

El proceso de biotransformación se lleva a cabo cuando una sustancia ingresa al organismo, desempeñando un importante papel en la reducción de posibles tóxicos, de tal forma las sustancias nocivas son destoxificadas o desprovistas de su capacidad lesiva (Williams R.1974).

La biotransformación se realiza por vía química involucrando una serie de transformaciones clasificadas en dos fases (Williams R.1974):

- Fase I: Biotransformaciones que incrementan la hidrosolubilidad del compuesto mediante la introducción de grupos o función de carácter polar como OH^- , NH_2^+ , COH , COOH , SH^- etc. En esta fase se llevan a cabo reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis, desalquilación, hidratación e isomería.
- Fase II: Está constituida por reacciones de conjugación, en la que sustancias con los átomos polares aludidos se unen a reactivos endógenos para formar derivados aún más hidrosolubles. En esta fase se llevan a cabo reacciones de sulfatación, acetilación y glucoronación. Sólo en algunos casos, como en la acetilación de ciertas sulfamidas, el derivado es menos hidrosoluble.

Finalmente los compuestos ingeridos hidrosolubles muy polares se excretan directamente por la orina, las poco polares requieren ser conjugadas previamente, los liposolubles experimentan las reacciones de fase I y II en tanto que los pocos biotrasformables quedan retenidos en los lípidos del organismo y solo sería excretables por la bilis, las heces y en menor proporción en la leche. Es por ello, que el buen funcionamiento del hígado es primordial para asimilar el daño producido durante el metabolismo de sustancias ingeridas. Sin embargo el daño es inminente cuando el consumo de sustancias tóxicas se realiza en grandes cantidades y de manera crónica (Williams R.1974).

2.2 Epidemiología

Según datos de la Organización Mundial de la Salud durante el 2016 se produjeron 2.3 millones de defunciones en el mundo a causa de enfermedades hepáticas de las cuales el 16.6% fueron provocadas por cirrosis hepática por uso nocivo de sustancias (OMS, 2016).

En México las enfermedades hepáticas representan un grave problema de salud, donde se ha incrementado la incidencia y mortalidad (Quiroz et al. 2010), durante el 2016 ocuparon el cuarto lugar de mortalidad en individuos de 15 a 64 años de edad, durante este año se reportaron 38,755 muertes debidas a enfermedades del hígado, siendo en los hombres el mayor número de muertes con 28,232 muertes (INEGI, 2016). Mientras que en el estado de Yucatán durante el 2017 ocurrieron 12.7% de muertes causadas por enfermedades hepáticas, siendo la segunda causa de muerte después de la diabetes mellitus (SSY, 2017).

2.3 Etiología de la cirrosis hepática

Debido a su complejidad y las funciones vitales (biotransformación) que desempeña este órgano se encuentra susceptible a sufrir daños, el 90 % de los daños es ocasionado por el consumo de sustancias, que en cantidades elevadas resulta tóxico para el hígado (García et al. 2012).

La exposición prolongada a fármacos o sustancias tóxicas como por ejemplo: el etanol, paracetamol, rifampicina, CCl₄, concentraciones elevadas de hierro y cobre consecuencia de enfermedades metabólicas, desencadenan la formación de fibrosis. La fibrosis produce un desorden estructural a nivel celular caracterizado por una distorsión del parénquima hepático asociado a la formación de septos y nódulos que alteran el flujo sanguíneo y que aumenta la incapacidad del hígado para llevar a cabo sus funciones (Friedman S. 2008).

La fibrosis hepática tiene un mecanismo muy complejo y se encuentra dividido en tres etapas importantes: iniciación, perpetuación y resolución. El daño que consecuentemente origina la fibrosis se lleva a cabo a nivel celular en la unidad estructural denominado sinusoides hepáticos. El sinusoides hepáticos es un sistema microvascular formado por diferentes tipos celulares altamente especializados, divididos en células parenquimales: los hepatocitos (H); y las células no parenquimales (CNP): las células de Kupffer, las

células hepáticas estrelladas (CHE) también denominadas células de Ito o células almacenadoras de grasa, y las células endoteliales sinusoidales (CES). Los H's se encuentran separados de las CES por el espacio denominado Disse, en este espacio se encuentra la matriz extracelular (MEC) y las CHE's, la cual es esencial para mantener la función diferenciada de las células residentes en el hígado, como se observa en la figura 2 (Claria J. y Titos E. 2004, Friedman S. 2008).

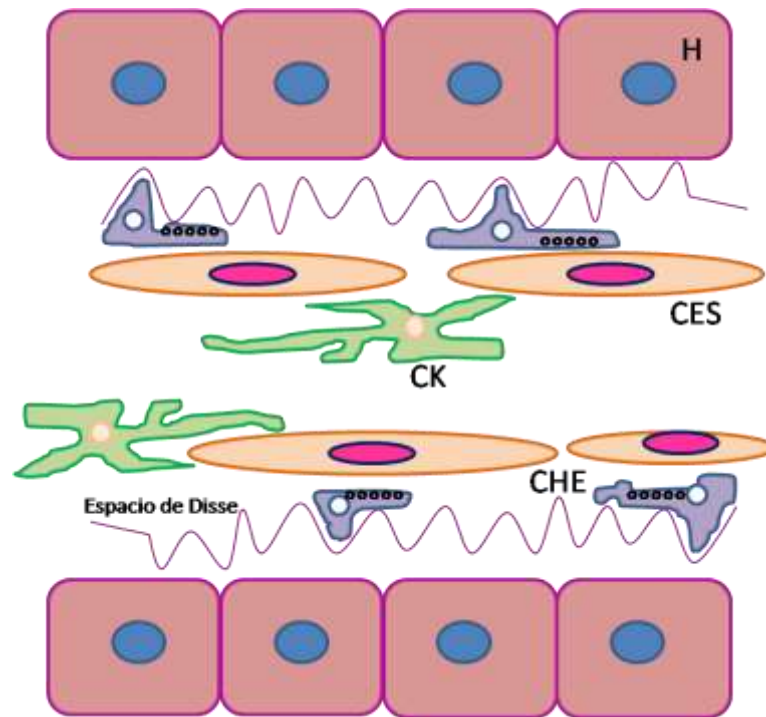


Figura 2. Diagrama esquemático del sinusoide hepático. El sinusoide hepático está formado básicamente por 4 tipos celulares distintos. Los hepatocitos (H); las células endoteliales sinusoidales (CES) que forman el endotelio fenestrado del sinusoide; las células hepáticas estrelladas (CHE), situadas en el espacio de Disse; y las células Kupffer (CK) (Claria J. y Titos E. 2004).

Durante la primera etapa de la fibrosis, la iniciación, se encuentran involucradas las CK, H's y CES, éstas células se encuentran en contacto con grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (ERO's) producidas como producto de la metabolización del citocromo P450 2E1 (Friedman S. 2008). Las ERO's tienen la capacidad de oxidar lípidos

y ocasionar daños en la membrana celular mediante peroxidación lipídica. La peroxidación lipídica se lleva a cabo en tres etapas, durante la primera etapa llamada iniciación sucede el ataque de un radical libre a un carbono de la cadena alifática a un ácido graso, posteriormente la segunda etapa (propagación) ocurre mediante una reacción en cadena de los ERO's provocando una extensión del daño y la formación de más ERO's, finalmente en la última etapa (descomposición) se descomponen los hidroperóxidos formados en etano, pentano, aldehídos reactivos (malonildialdehído) y cetonas que reaccionan con proteínas y ADN, lo que provoca efectos tóxicos para la célula y consecuentemente la muerte celular (citotóxicidad) (Touys R. 2006). El daño producido en la membrana principalmente de las CK y H's provoca su rompimiento y liberación del contenido intracelular, estimulando de manera paracrina a las CHE que permanecen quiescentes (estado de reposo) (Claria J. y Titos E. 2004).

Las CHE's se encuentran en estado quiescente almacenando vitamina A (retinoides) y produciendo proteínas importantes para la MEC. Sin embargo, cuando se activan estas células, sus funciones metabólicas y estructura morfológica se encuentran alteradas, adquiriendo características de miofibroblastos como: alargamiento celular, expresión de alfa actina específica de musculo liso (α -SMA, por sus siglas en inglés), pérdida de retinoides e incremento de la síntesis de citocinas involucradas en la modificación de la MEC (Friedman S. 2017).

Una vez activadas las CHE's se da lugar a la segunda etapa de la fibrosis, la perpetuación. Durante la perpetuación la CHE's sintetizan principalmente factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento tumoral β 1 (TGF- β 1, por sus siglas en inglés). Estos factores actúan de manera autocrina, propiciando la proliferación de CHE e incrementando la síntesis de colágeno fibrilar I y III. El colágeno fibrilar I y III sustituye al existente (colágeno IV) que es degradado por colagenasa IV, este proceso es regulado mediante proteínas tipo Smad (Friedman S. 2008).

La última etapa de la fibrosis, denominada etapa de resolución, es la de mayor importancia. Durante esta etapa puede detenerse y revertirse el proceso de fibrosis, originando una regeneración celular hepática. Entre los procesos se encuentran la apoptosis y la reversión. Durante la apoptosis se observa un incremento de inhibidores de

metaloproteasas tipo 1 (TIMP-1, por sus siglas en inglés) que evitan la degradación de MEC y un incremento de la expresión de ligandos tipo CD95, Bcl-2, y p53 que propician la muerte celular de CHE; mientras que en el proceso de reversión se produce Interleucina 10 (IL-10), una citocina que incrementa la actividad de lisis del colágeno I y III, y regula la inflamación (Friedman S. 2010).

Si la resolución no se lleva a cabo, la fibrosis aumenta de manera crónica hasta el proceso final denominado cirrosis hepática, durante la cirrosis las funciones del hígado son casi nulas, disminuyen principalmente la síntesis de proteínas como la albúmina y aumentan los niveles de enzimas como: la alanina aminotransferasa (ALT), la aspartato aminotransferasa (AST) y la fosfatasa alcalina (FA) (García et al. 2012).

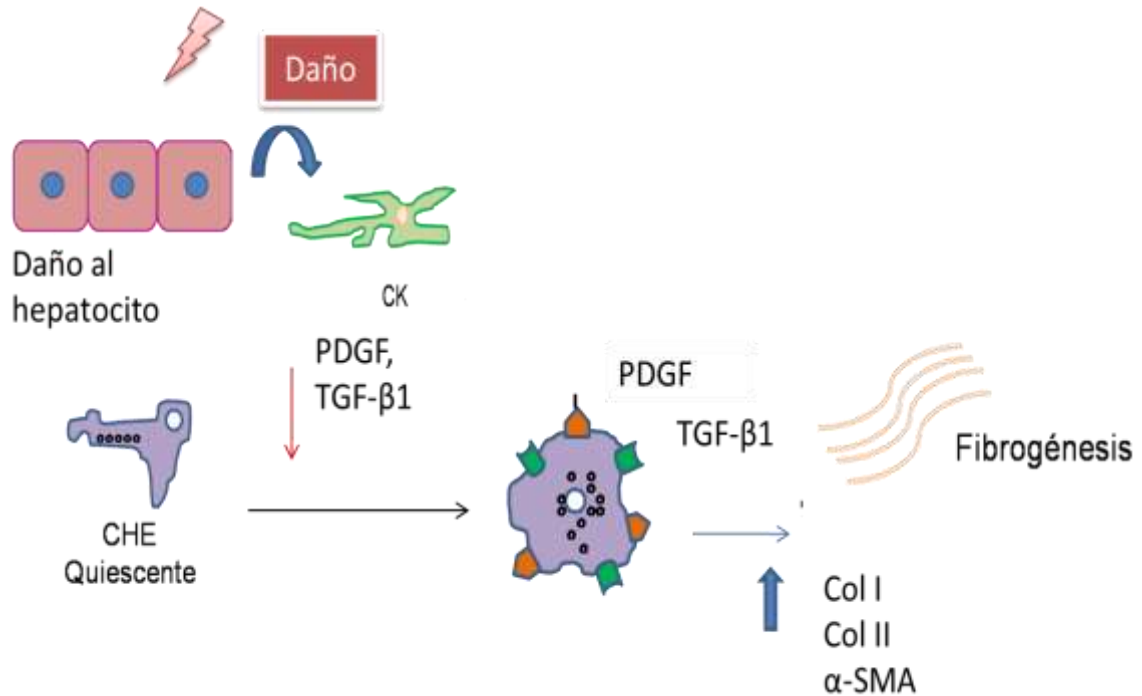


Figura 3. Activación de las CHE. La activación inicia con el daño generado por el aumento de metabolitos tóxicos que generan estrés oxidante. Esto ocasiona que de las CHE en estado quiescente se activen y se dirijan hacia la etapa de perpetuación. Durante la etapa de perpetuación ocurre la quimotaxis e inflamación por aumento de quimosinas; la proliferación y fibrogénesis por el aumento principalmente de PDGF y TGF-β1. En respuesta, se producen en mayor cantidad metaloproteasas de matriz (MMP) que ocasiona la degradación de la MEC (Friedman S. 2010).

2.4 Blancos potenciales para revertir el daño hepático

El daño hepático crónico induce fibrosis en el hígado y es sus estados finales cirrosis. Los eventos moleculares encontrados en la cirrosis hepática implican: acúmulo de proteínas fibrilares como colágena I, III, con la sucesiva activación de CHE inducida mediante la secreción autocrina y paracrina de citocinas, como se mencionó anteriormente. Conforme progresa el daño hepático, los pacientes cursan con episodios cada vez más frecuente de sangrado de tubo digestivo y de encefalopatía y complicaciones graves que los lleva a la muerte (Friedman S. 2010)

Se han establecido blancos terapéuticos que disminuyan el acúmulo de proteínas fibrilares y de activación de CHE, que incluyen: remoción del agente lesivo, reducción del estrés oxidativo, supresión de la respuesta inflamatoria, modulación de citocinas proactivadoras de CHE, modulación de depósitos de MEC e inducción de apoptosis de CHE (García L. 2007).

La remoción del agente lesivo es útil en pacientes que cursan con obstrucción biliar, en pacientes consumidores crónicos de bebidas alcohólicas y por virus de hepatitis B y C, siendo esta última la manera más difícil para inducir la regresión fibrótica, ya que se debe de eliminar por completo el agente causal (García L. 2007).

Otro blanco y que hasta el momento se ha visto prometedor es la disminución del estrés oxidativo, el empleo de sustancias con propiedades antioxidantes como vitamina E (Mutalip M. 2018), fosfatidilcolina (también llamada lecitina) (Raj P. 2011), S-adenosil L-metionina, resveratrol y quercetin, retinoides (Casas S. 2015) y silimarina (El-gazayerly O. 2014), en diferentes modelos experimentales mostraron que suprimen la respuesta fibrótica al daño oxidativo. Sin embargo, faltan estudios que valoren su seguridad y eficacia.

Para suprimir la respuesta inflamatoria se han utilizado los glucocorticoides, pero no han logrado la supresión de la fibrogénesis y la progresión a la cirrosis continúa. Con este mismo propósito se han evaluado la IL-10 e inhibidores del TNF- α , con el objetivo de neutralizar las citocinas proinflamatorias y lograr disminuir la necrosis e inflamación en el hígado (García L. 2007).

El control de depósitos de colágena es sumamente complicada ya que su producción se encuentra regulada a diferentes niveles: transcripcional, postranscripcional y traduccional al igual que por la degradación de MMP's. Entre los estudios realizados se encuentran el HOE077 y el S-4682 que mostraron una gran capacidad para inhibir la prolil-4 hidroxilasa. La colchicina, un agente que bloquea la polimerización de tubulina que demostró que inhibe la secreción de colágena *in vitro*. La colchicina se ha usado en algunos ensayos clínicos y ha mostrado cierto efecto benéfico en la cirrosis de varias etiologías (Ghosh N. 2011).

También se ha probado compuestos para evitar la proliferación celular de CHE y su muerte apoptótica. La pentoxifilina fue probada con la finalidad de inhibir la enzima fosfodiesterasa encargada de la proliferación de las CHE (Ghosh N. 2011), así como también el ácido s-farnesiltiosalicílico un antagonista de receptor Ras que inhibe la proliferación y migración de CHE (Ghosh N. 2011).

2.5 Mecanismos de defensa antioxidante

A pesar de que ciertas sustancias producto del metabolismo resultan dañinas para el cuerpo humano y que puede conllevar al desarrollo de fibrosis, nuestro cuerpo cuenta con diferentes mecanismos de defensa antioxidante para contrarrestar los efectos nocivos. Estos mecanismos se encuentran integrados por sistemas enzimáticos y no enzimáticos, como se muestra a continuación:

Tabla 1. Función de los principales antioxidantes.

Antioxidantes enzimáticos	Función
Superóxido dismutasa (SOD)	Eliminación de radical superóxido
Catalasa (CAT)	Eliminación de Hidroperóxidos (H ₂ O ₂)
Glutación peroxidasa (GPx)	Eliminación de Hidroperóxidos
Glutathion reductasa (GRed)	Eliminación del glutathion oxidado
Glutathion s-transferasa (GST)	Eliminación de peróxidos lipídicos
Metionina Sulfóxido reductasa	Reparación de residuos de metionina
Peroxidasa	Descomposición de peróxido de hidrogeno y peróxidos lipídicos
Antioxidantes no enzimáticos en plasma/ suero	
Ácido úrico	Captador se oxigeno singlete y radicales libres.
Albúmina	Actividad peroxidasa en presencia de GSH
Bilirrubina	Captación de radicales peróxilo
Glutathion reducido (GSH)	Sustrato para la acción de enzimas GPx y GST y captador de radicales libres.
Ubiquinol (coenzima Q)	Captador de radicales libres.
Antioxidantes no enzimáticos de la dieta	
Ácido ascórbico	Reacción con superóxido, oxigeno singlete y radical peróxilo, regeneración de tocoferoles.
Tocoferoles	Protección de membranas lipídicas, bloqueo de la cadena de reacciones de peroxidación
Carotenoides	Desactivación del oxígeno singlete. Bloqueo de la cadena de reacciones de peroxidación.
Péptidos antioxidantes	Captación de radicales libres actividad quelante de metales y reducción de especies oxidadas.
Compuesto fenólicos	Captación de radicales libres y actividad quelante de metales.

Fang et al. (2002) y Lee et al (2004)

Estos antioxidantes actúan evitando el estrés oxidativo definido como un desbalance entre el incremento de ERO's y una baja actividad de los mecanismos antioxidantes que desencadenan daños a nivel celular (Casas S. 2015).

2.5.1 Factor de transcripción Nrf2

Un importante factor de transcripción ha sido implicado en el mecanismo de defensa celular ante el estrés oxidativo denominado factor de transcripción Nrf2 (por sus siglas en inglés, nuclear factor erythroid related factor 2) (Shen Z. et al. 2018). El Nrf2, regula la expresión inducible de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes, mediante su unión a una secuencia específica del ADN conocida como ARE (por sus

siglas en inglés, antioxidant response element) que puede ser activada por diferentes oxidantes y/o electrófilos de naturaleza química diversa. La actividad del factor Nrf2 se encuentra constitutivamente reprimida debido a su unión con una proteína citoplasmática llamada Keap1 y el citoesqueleto. Dicha unión fomenta la permanente degradación de Nrf2 por el proteosoma, por lo que el control primario de su función radica principalmente en su distribución subcelular, más que en su síntesis. Se ha sugerido que el sistema Nrf2-Keap1 contribuye a la protección contra varias patologías como la toxicidad hepática y la inflamación entre otras (Konigsberg M. 2007).

2.6 Tratamiento

El proceso de la fibrosis que conlleva a la cirrosis hepática, es un proceso dinámico y reversible, que puede disminuir gradualmente mediante el uso de terapias efectivas que eviten su progresión, como por ejemplo: el control del peso corporal y de niveles de lípidos en sangre, así como también evitar el uso nocivo de sustancias nocivas para el hígado (Zhou W. et al. 2014).

Se ha visto, que el uso de fármacos antivirales como interferón α (IFN- α , por sus siglas en inglés), ribavirina, lamivudina, adefovir, entecavir han mostrado tener un efecto antifibrótico. También el uso de terapia anti-inflamatoria e inmunosupresora, ha logrado disminuir la progresión de la fibrosis; entre estos fármacos encontramos a celecoxib, glucocorticoides, azatiprima, rapamicina y colchicina. El uso de agentes antioxidantes como la vitamina E y de hepatoprotectores como ácido ursodeoxicólico, ácido tauroursodeoxicólico y silimarina han mostrado tener el mismo efecto (Zhou W. et al. 2014).

Sin embargo, cuando los pacientes ya padecen de cirrosis hepática, la posibilidad de efectuar una terapia específica es nula, ya que es frecuente el diagnóstico de esta enfermedad en etapas avanzadas. Durante la cirrosis, comúnmente se administran medicamentos que contrarrestan los efectos secundarios, como por ejemplo los diuréticos como la espirinolactona, que disminuye el edema y la ascitis, a pesar de que los pacientes durante esta etapa no responden al tratamiento (Gómez A. 2012).

Finalmente a los pacientes con cirrosis hepática, se les recomienda realizar reposo y llevar una dieta de proteína animal (0.5 g/kg de peso), una restricción del consumo de sodio y una ingesta de líquidos a 1,200 ml/día, se les administra ácido fólico y vitaminas como: B, C y K, siendo la terapia definitiva el trasplante de hígado (Gómez A. 2012).

Actualmente y dada las limitaciones que tienen los tratamientos existentes se están buscando nuevos compuestos y blancos terapéuticos potenciales para enlentecer el progreso o revertir la fibrosis hepática, evitando la etapa final del daño hepático, la cirrosis. Sin embargo hasta ahora no ha sido encontrado (Gómez A. 2012).

2.6.1 Silimarina

La silimarina es un extracto proveniente de semillas de la planta *Silybum marianum* que pertenece a la familia Asteraceae originaria del Mediterráneo, es conocida comúnmente como cardo mariano, esta planta ha sido utilizada en la medicina tradicional como remedio de enfermedades gastrointestinales y para enfermedades relacionadas con el hígado debido a su capacidad de proteger al hígado (Colica C. 2017). Entre sus principales componentes de la silimarina se encuentran los flavonoides: silcristina, silidianina, isosilibinina y silibina, siendo la silibina la de mayor cantidad (60-70%), cuya estructura se muestra en la figura 4. (Bijak M. 2017).

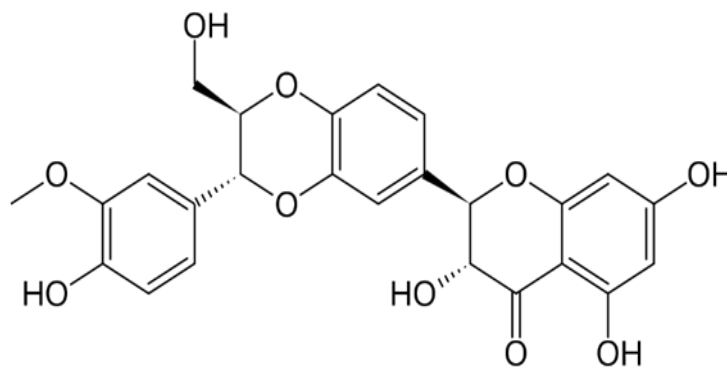


Figura 4. Estructura de silibina, el compuesto mayoritario de la silimarina (Bijak M. 2017).

La capacidad de la silimarina de proteger al hígado ha sido demostrada por varios investigadores alrededor del mundo mediante diferentes modelos experimentales, entre ellos modelos de toxicidad en animales experimentales usando CCl₄, como el estudio realizado por Mouriel y Mourelle (1990) quienes encontraron que la silimarina a dosis de 50 mg/kg administrada diariamente durante ocho semanas a ratas Wistar protegió la membrana de los hepatocitos de los daños provocados por el CCl₄.

La silimarina posee múltiples mecanismos de acción. Las más importantes son sus propiedades antioxidantes y regeneración celular. La actividad antioxidante sobre ERO's de superóxido, hidroxil ($\cdot\text{OH}$), peróxido de hidrogeno (H₂O₂) producidas por un incremento a la exposición a sustancias nocivas, muestra que la silimarina tiene la capacidad de captar este tipo de moléculas disminuyendo el riesgo de un desequilibrio oxidativo. También, la silimarina puede incidir en el núcleo celular de los hepatocitos y actuar sobre enzimas de la ARN polimerasa, incrementando la síntesis de ADN y proteínas, mecanismo que ha sido importante en la terapéutica ya que puede reparar el daño de los hepatocitos y restaurar de manera rápida la función de células como los hepatocitos. Otros posibles mecanismos responsables de la actividad de la silimarina son la inhibición de la ruta 5-lipoxigenasa, supresión del factor nuclear NF- κ B, que actúan disminuyendo el proceso inflamatorio y el proceso fibrótico (Pradhan S. 2006, Surai 2015)

Las múltiples propiedades y mecanismos biológicos encontrados en la silimarina han llevado su interés como tratamiento en pacientes con enfermedades hepáticas como el hígado graso, la fibrosis y cirrosis. En un estudio realizado por Salmi y Sarna donde evaluó el efecto de la silimarina en 106 pacientes con enfermedad hepática, quienes mostraron niveles séricos de enzimas de daño hepático (ALT y AST) elevadas y daños histológicos, al ser tratados con silimarina durante 4 semanas se obtuvieron resultados satisfactorios, los pacientes mostraron un disminución de las enzimas de daño hepático y regeneración celular.

Los efectos benéficos encontrados en la silimarina ha permitido el desarrollo de nuevos productos para el tratamiento de trastornos digestivos asociados a alteraciones funcionales hepáticas, actualmente se comercializan los productos SILYBUM ORTO que son comprimidos con 150 mg de silimarina, LEGALON con 70 mg de silimarina y

LEGALON FORTE con 140 mg de silimarina. La dosis recomendable para adultos y ancianos es de 150 mg/kg tres veces al día después de las principales comidas durante un tiempo de 4 a 6 semanas, siendo posteriormente la dosis de mantenimiento de 150 mg dos veces al día (Surai 2015).

Actualmente se estudian otras propiedades de la silimarina tales como su efecto antiviral sobre el VIH y VHC, su efecto sobre el cáncer de hígado y su actividad para proteger las neuronas (Surai 2015).

2.7 Las macroalgas

Las macroalgas, se clasifican en tres clases según su pigmentación; en algas verdes (Clorophyta), algas rojas (Rhodophyta) y algas cafés (Phaeophyta). Están constituidos por un mayor porcentaje de elementos traza en comparación con las plantas terrestres (El Gamal A. 2010).

Las macroalgas son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria, farmacéutica y textil por ser una de las principales fuentes de extracción de carragenina y alginina utilizadas para la elaboración de salsas, preservación de cosméticos y papel, por mencionar algunos (Rout S. et al 2015).

En Asia principalmente en China y Japón son utilizadas para disminuir los niveles en sangre de colesterol y glucosa, para el tratamiento de enfermedades como el Bocio e Hipertiroidismo, y como suplemento vitamínico (El Gamal A. 2010).

En las últimas décadas se han aislado un innumerable número de compuestos con actividad biológica, convirtiendo a las macroalgas en una fuente importante para la investigación. Los compuestos con actividad biológica encontrados en las macroalgas se han relacionado con su alimentación, reproducción, comunicación, exposición a cambios de temperatura, protección de enfermedades y depredadores (Rout S. et al. 2010, Gamal A. et al 2010).

2.7.1 Género *Sargassum*

El género *Sargassum* se clasifica dentro de las algas cafés (Phaeophyta) conocidas como hierbas malas del golfo, están conformadas aproximadamente por 400 especies, se encuentran localizadas en todas las zonas tropicales y subtropicales del mundo. Por sus propiedades farmacológicas se les han considerado como alimento medicinal del siglo XXI, entre los principales metabolitos encontrados en este género se encuentran los terpenoides, polisacáridos, polifenoles, ácidos sargaquinoicos, plastoquinonas, sargachromenoles, esteroides, glicéridos etc.(Yende S. et al. 2014).

2.7.2 *Sargassum fluitans*

Sargassum fluitans Borgesen (Borgensen) 1914 (figura 5), es una especie que pertenece a la clase de algas cafés (Phaeophyta), entre sus características importantes se tiene que, es un alga pelágica, con ausencia de espina en el neumatóforo (tipo de raíz que crece hacia arriba) lo que las distingue de otras especies, suelen flotar en grandes conglomerados que pueden llegar a formar pequeñas o grandes arribazones en las costas, tienen un alto valor ecológico debido a que sirven de hábitats, área de desove y es utilizada como fuente alimentaria a un conjunto diverso de flora y fauna (Moreira et al. 2013).



Figura 5. Rama de *S. fluitans* (Moreira et al. 2013).

2.8 Actividad biológica de las macroalgas

Las macroalgas han mostrado tener innumerables metabolitos con actividad biológica entre las que se encuentran la actividad antioxidante y hepatoprotectora (El Gamal A. 2010). Entre los estudios de actividad biológica mencionados tenemos los siguientes:

2.8.1 Actividad antioxidante

Estudios previos realizados en extractos acuosos de macroalgas *Ascophyllum nodosum*, *Pelvetia canaliculata*, *Fucus spiralis* y *Ulva intestinalis*, mostraron tener actividad antioxidante sobre la captación de radicales DPPH con una concentración Inhibitoria media (CI₅₀) de 9.39, 3.39, 13.53 y 0.76 mg/mL respectivamente (Tierney M. et al 2013).

Le Lann K. y col. (2008) evaluaron la actividad antioxidante del extracto metanólico de *Bifurcaria bifurcata* y *Sargassum muticum*, especies recolectadas en costas de Francia, cuyos resultados indicaron una CI₅₀ de 1.91 mg/mL y 1.68 mg/mL respectivamente.

En otro estudio realizado en Colombia, donde también se analizaron extractos metanólicos provenientes de las especies de macroalgas *Caulerpa mexicana*, *Laurencia sp.*, *Sargassum sp.*, *Dictyota sp.* y *Sargassum cymosum* se obtuvieron resultados de actividad captadora de radicales DPPH de CI₅₀= 0.26, 0.36, 0.64 y 0.77 mg/mL respectivamente (Echavarría B., et al 2009).

En México Zubia et al. 2007 evaluó la actividad antioxidante de 8 especies de macroalgas del género Phaeophyta obtenidas en las costas de los estados de Yucatán y Quintana Roo, las especies evaluadas fueron *Dictyota cervicornis*, *Dictyota ciliolata*, *Dictyota crenulata*, *Lobophora variegata*, *Padina gymnospora*, *Sargassum pteropleuron*, *Sargassum ramifolium*, *Turbinaria tricostrata*, donde se obtuvo la mayor actividad con la especie *Lobophora variegata* con una CI₅₀ de 0.32 mg/mL sobre la captación de radicales DPPH. De esta forma, se ha observado que las macroalgas poseen un gran potencial antioxidante.

2.8.2 Actividad hepatoprotectora

La actividad hepatoprotectora se describe como la acción de proteger al hígado de los efectos nocivos de hepatotoxinas que el hombre puede ingerir o de contrarrestar las alteraciones en los mecanismos de defensa antirradicalarios, los agentes que son capaces de realizarlos son llamados hepatoprotectores (Adewusi 2010).

Así mismo se ha evaluado la actividad hepatoprotectora de extractos provenientes de las algas, como Vázquez R. et al. (2012) quienes suministraron el extracto acuoso obtenido de la especie de alga *Sargassum siliquosum* a ratas Sprague-Dawley, las dosis evaluadas fueron de 100 y 200 mg/kg de peso corporal, en este estudio se utilizó como control de daño hepático el acetaminofén a dosis de 2g/kg, y como control de hepatoprotección a la silimarina a dosis de 300 mg/kg; el experimento se llevó a cabo durante 7 días. La disminución de las enzimas AST y ALT, así como también la FA, fueron indicativo de una disminución del daño hepático.

Otro estudio realizado por Khan H. y col. (2016), donde se evaluó la actividad hepatoprotectora de extractos etanólicos de *Sargassum varigatum*, *Sargassum terrenium* y *Sargassum binderi*, se utilizó ratas Wistar a quienes se les indujo daño hepático utilizando acetomifen 1g/kg y CCl₄ a concentraciones de 2 mL/kg. Los resultados indicaron que el alga *Sargassum variegatum* a dosis de 200 mg/kg tuvo la mayor actividad de hepatoprotección, ya que se observó una disminución de las enzimas hepáticas AST y ALT.

Raghavendran et al. (2004), reportó el efecto hepatoprotector del extracto de *Sargassum polycystum* a concentración de 200 mg/kg. En este estudio se utilizó ratas Wistar a quienes se les indujo daño con 800 mg/kg de acetaminofen. El estudio se realizó durante un periodo de 15 días. Finalmente se observó que los niveles de AST, ALT y bilirrubinas disminuyeron en comparación con las ratas tratadas con acetaminofén.

2.9 Compuestos aislados en macroalgas

Entre los compuestos aislados en extractos orgánicos de macroalgas y que han mostrado poseer actividad biológica se encuentran los siguientes:

Tabla 2. Compuestos con actividad biológica aislados en extractos de algas.

Compuesto	Extracto	Tipo de compuesto	Especie	Actividad	Referencia
Thunbergols A	MeOH	Tocotrienol	<i>Sargassum thunbergii</i>	Antioxidante sobre DPPH CE ₅₀ = 30 µg/mL	Seo et al. 2006
Thunbergols B	MeOH	Tocotrienol	<i>Sargassum thunbergii</i>	Antioxidante sobre DPPH CE ₅₀ = 31 µg/mL	Seo et al. 2006
1-Eicosanol	MeOH: Hex (1:1)	Alcohol graso	<i>Sargassum confusum</i>	Inhibición de movilidad de esporas CI ₅₀ = 125 µg/mL	Ganti et al. 2006
Diocetyl phthalato	MeOH: Hex (1:1)	Ésteres de ftalato	<i>Sargassum confusum</i>	Inhibición de movilidad de esporas CI ₅₀ = 125 µg/mL	Ganti et al. 2006
Eckol	EtOH MeOH	Florotanino	<i>Eisenia bicyclis</i> <i>Ecklonia stolonifera</i>	Inhibición de acetilcolinesterasa CI ₅₀ = 20.56 µM.	Hyeon C. et al. 2006 Yoon N. et al. 2008
Plorofucofuroeckol A	EtOH MeOH	Florotanino	<i>Eisenia bicyclis</i> <i>Ecklonia stolonifera</i>	Citotóxica sobre células HEpG2 CE ₅₀ = 79.2 µg/mL Inhibición de butirilcolinesterasa, CI ₅₀ = 136.7 µM; Inhibición de acetilcolinesterasa CI ₅₀ = 4.8 µM.	Kim Y. et al. 2005 Hyeon-C. et al. 2006 Yoon N. et al. 2008
Triphlorethol A	EtOH	Florotanino	<i>Eisenia bicyclis</i> <i>Ecklonia stolonifera</i>	Inhibición de butirilcolinesterasa Inhibición de acetilcolinesterasa, CI ₅₀ = 500 µM.	Hyeon-C. et al. 2006 Yoon N. et al. 2008
Fucoesterol	EtOH MeOH	Esterol	<i>Ecklonia stolonifera</i>	Antidiabética inhibición de α-amilasa Inhibición de la butirilcolinesterasa, CI ₅₀ = 421.7 µM	Yoon N. et al. 2008
Saringasterol	EtOH MeOH	Esterol	<i>Ecklonia stolonifera</i>	Inhibición de la butirilcolinesterasa, CI ₅₀ = 176.4 µM Inhibición de acetilcolinesterasa CI ₅₀ = 389.1 µM.	Yoon N. et al. 2008
Phloroglucinol	EtOH	Florotanino	<i>Ecklonia stolonifera</i>	Inhibición de butirilcolinesterasa CI ₅₀ =500 µM.	Yoon Na et al. 2008

Eckstolonol	EtOH	Florotanino	<i>Ecklonia stolonifera</i>	Citotóxica sobre células HepG2 CE ₅₀ = 62 µg/mL Inhibición de la butirilcolinesterasa, CI ₅₀ = 230.2 µM Inhibición de la acetilcolinesterasa CI ₅₀ = 42.6 µM.	Kim et al. 2005 Yoon N. et al. 2008
2-Phoroeckol	EtOH	Florotanino	<i>Ecklonia stolonifera</i>	Inhibición de acetilcolinesterasa CI ₅₀ = 38.1 µM .	Yoon N. et al. 2008
7-Phoroeckol	EtOH	Florotanino	<i>Ecklonia stolonifera</i>	Inhibición de acetilcolinesterasa CI ₅₀ = 21.1 µM.	Yoon N. et al. 2008
Dieckol	EtOH	Florotanino	<i>Ecklonia stolonifera</i>	Inhibición de la acetilcolinesterasa CI ₅₀ = 17.1 µM.	Yoon N. et al. 2008
Fucoxantina	H ₂ O: Hex: EtOH (1:1:2)	Carotenoide	<i>Undaria pinnatifida</i>	Actividad antioxidante en células hepáticas BNL CL2 CE= 5 µM	Liu C. et al. 2011

Capítulo 3. Justificación

La cirrosis hepática es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, la terapia farmacológica que se encuentra disponible actualmente sólo disminuye los efectos provocados por esta enfermedad como la ascitis, pero no logra evitar por completo su progreso. Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar un blanco terapéutico que ayude a combatir el desarrollo de esta enfermedad (GOMS, 2016; García L. 2007).

Se ha visto que la disminución del estrés oxidativo es un blanco prometedor para la disminución del progreso de formación de fibrosis, el responsable de la cirrosis hepática. El empleo de sustancias con propiedades antioxidantes como la silimarina ha mostrado tener efectos benéficos en paciente que cursan con enfermedades hepáticas. Sin embargo la seguridad y eficacia aún no ha sido establecida clínicamente (El-gazayerly O. 2014).

Recientemente se ha visto que las especies marinas son una fuente importante para aislar compuestos con propiedades antioxidantes, debido a que estas especies marinas se encuentran sometidas a condiciones variables de temperatura y presión marítima que provoca la producción de innumerables metabolitos secundarios diferentes a especies terrestres (Garateix, A. 2005).

Entre estas especies marinas se encuentran las macroalgas que han mostrado tener diferentes compuestos con actividades biológicas, entre ellas la actividad antioxidante (Tabla 2). La especie de macroalga *S. fluitans* pertenece a la clase de algas cafés, entre sus características importantes se tiene que, suelen flotar en grandes conglomerados que pueden llegar a formar pequeñas o grandes arribazones en las costas. El incremento de la eutrofización de los océanos ha provocado la proliferación descontrolada de algas convirtiéndolas en una fuente de desaprovechamiento y contaminación (Moreira et al. 2013). La especie de alga *S. fluitans* se encuentra ampliamente distribuida en la península de Yucatán por lo que es de fácil disposición para su estudio, y dada las características climáticas del estado de Yucatán se piensa que los compuestos encontrados en este tipo de alga serán prometedores. Aunado a esto se propuso estudiar la actividad antioxidante y hepatoprotectora del EE de *S. fluitans* con la finalidad de obtener un futuro fitofármaco que sea útil para combatir las enfermedades hepáticas.

Capítulo 4. Hipótesis

El extracto etanólico de *S. fluitans* Borgesen posee actividad antioxidante y hepatoprotectora.

Capítulo 5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar la actividad antioxidante y hepatoprotectora del extracto etanólico obtenido a partir del alga *S. fluitans* Borgessen.

5.2 Objetivos particulares

1. Determinar la actividad antioxidante *in vitro* del EE de *S. fluitans*.
2. Determinar la dosis máxima tolerable *in vivo* en ratones.
3. Evaluar la actividad hepatoprotectora *in vivo* en ratas en un modelo de daño hepático inducido por CCl₄.

Capítulo 6. Materiales y Métodos

6.1 Colecta del material de estudio

Las especies de algas a estudiar fueron colectadas en las orilla del mar de Puerto Morelos, localizado en la costa del caribe de la península de Yucatán (20° 46' 07''N, 86° 57' 14''W) durante el invierno de 2016, la recolección se realizó bajo la dirección de la Dra. Rosa Ester Moo Puc. Las algas colectadas fueron mantenidas en bolsas de plástico con agua de mar en recipientes con hielo hasta su llegada al laboratorio. En el laboratorio fueron lavadas con agua corriente y pesadas, luego se preparó un ejemplar para el herbario y finalmente se llevó a cabo su identificación en el herbario “Alfredo Barrera Marín” de la Universidad Autónoma de Yucatán. Posteriormente se realizó según lo descrito por Chale-Dzul et al. 2014, se cortaron en fragmentos pequeños con la ayuda de un molino de cuchillas, se tomó 100 g del alga y se añadió etanol (EtOH) 80% v/v donde fueron mantenidas durante 12 horas a temperatura ambiente. Seguidamente el sobrenadante se filtró y se concentró en un rotavapor, finalmente el concentrado se liofilizó hasta obtener el extracto seco.

6.2 Estudios *in vitro*

6.2.1 Actividad antioxidante

Captación del radical DPPH

Para evaluar la capacidad que tiene un antioxidante de neutralizar los radicales libres, fue necesario cuantificar la capacidad del extracto para estabilizar el radical DPPH (2,2-Difenil-1-Picrylhydrazyl). El DPPH es una molécula que tiene un electrón desapareado la cual absorbe un color violeta intenso disuelto en alcohol, cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante, el DPPH gana un átomo de hidrogeno, como consecuencia el color violeta disminuye gradualmente (Charles D. 2013).

La evaluación de la capacidad antioxidante se realizó siguiendo la metodología propuesta por Segura-Campos, M. et al. (2012). Primero se preparó el blanco tomando 100 µL de agua destilada y se añadió 1 mL de DPPH (0.1 mM) diluido en alcohol etílico a 96%, posteriormente se evaluó 100 µL del EE a concentraciones entre 1 y 6 mg/mL, al cual se adicionó 1 mL de DPPH (0.1 mM).

De igual manera se evaluó como control antioxidante la vitamina C a concentraciones entre 0.1 y 0.5 mg/mL. Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 30 min., finalmente se midió la absorbancia a 517 nm. El porcentaje de captación de radicales DPPH se calculó como sigue:

$$\% \text{ captación de radicales DPPH} = \left\{ \frac{AB - AM}{AB} \right\} \times 100$$

Dónde:

AB = Absorbancia del blanco

AM = Absorbancia de la muestra

Poder reductor de Fe (III)

El poder reductor de Fe (III) se basa en la capacidad que tiene un antioxidante de reducir el ion férrico (Fe^{3+}) al ion ferroso (Fe^{2+}) formando un complejo azul. El poder reductor del extracto se determinó mediante la metodología descrita por Oyaizu (1986). Primero se preparó el buffer de fosfatos a 0.2 M a pH 6.6, posteriormente se tomó 250 µL del buffer y se mezcló con 250 µL de ferricianuro de potasio al 1%, luego se añadió 100 µL del EE a concentraciones entre 0.1 y 6 mg/mL y se incubó a temperatura constante (50°C) durante 20 min. Luego se añadió 250 µL de ácido tricloroacético al 10% y se centrifugó a 548 x g durante 10 min. Después se tomó 500 µL del sobrenadante y se añadió 400 µL de agua destilada y 100 µL cloruro férrico al 0.1%, posteriormente se incubó a 50 °C durante 10 min. Finalmente se dejó enfriar durante 10 min y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 700 nm. Para determinar el porcentaje de reducción de Fe (III) se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Poderreductor} = \left\{ \frac{AM - AB}{AM} \right\} \times 100$$

Dónde:

AB= Absorbancia del blanco

AM = Absorbancia de la muestra

Capacidad quelante de Cu (II)

Para la determinación de la capacidad quelante o de formación de complejos con iones de metales pesados, se utilizó el método de Carter, P. (1971). Primero se preparó el tampón de acetato de sodio 50 mM (pH6) con 57.8 μ L de ácido acético y 0.49 g de acetato de sodio, ambos fueron mezclados y aforados con agua destilada a un volumen final de 5 mL.

Posteriormente se preparó el blanco y el control sin reacción. Para el blanco se mezcló 1200 μ L tampón de acetato de sodio 50 mM (pH 6) y se añadió 25 μ L de violeta de pirocatecol (4 mM). Para el control sin reacción se mezcló 1000 μ L de tampón de acetato de sodio 50 mM (pH 6), 100 μ L de agua destilada y 100 μ L de solución patrón de Cu (II) (40.0 mg/mL), posteriormente se añadió 25 μ L de violeta de pirocatecol (4 mM).

El EE se evaluó a concentraciones entre 4 y 8 mg/mL. Se tomó 100 μ L de la muestra y se añadió 1000 μ L de tampón de acetato de sodio 50 mM (pH 6), 100 μ L de solución patrón de Cu (II) (40.0 mg/mL) y 25 μ L de violeta de pirocatecol (4 mM). Se dejó reaccionar durante 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se midió la absorbancia a 632 nm. Se evaluó como control quelante el EDTA a concentraciones entre 0.1 y 0.4 mg/mL. Finalmente se calculó el porcentaje de capacidad quelante como sigue:

$$\% \text{ Capacidad Quelante} = \left\{ \frac{1 - AbsVPCuM}{AbsVPCu} \right\} \times 100$$

Dónde:

%CQ = Porcentaje de capacidad quelante.

AbsVPCuM = Absorbancia del complejo de violeta de pirocatecol-Cu (II) en presencia de muestra.

AbsVPCu = Absorbancia del complejo de violeta de pirocatecol-Cu (II).

6.3 Estudios *in vivo*

6.3.1 Animales

En los experimentos se utilizarán ratones Balb/c y ratas machos adultos de la variedad Wistar, criados en el bioterio del CIR “Dr. Hideyo Noguchi” de la UADY. Los animales permanecieron en cajas de acrílico (largo 38 cm, ancho 28 cm y altura 20 cm) con agua y alimentos a libre demanda. Debido a que la actividad de las ratas Wistar varía de manera cíclica (circadiana), con una mayor actividad durante la fase de oscuridad, las ratas permanecieron durante todo el tiempo en una habitación con un sistema de ciclos de luz-oscuridad de 12:12 h, encendiéndose las luces a las 7 a.m. y apagándose a las 7 p.m.

En apego a las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de los animales de Laboratorio se hizo todo lo posible para evitar cualquier sufrimiento innecesario a los animales (National Research Council, 1996).

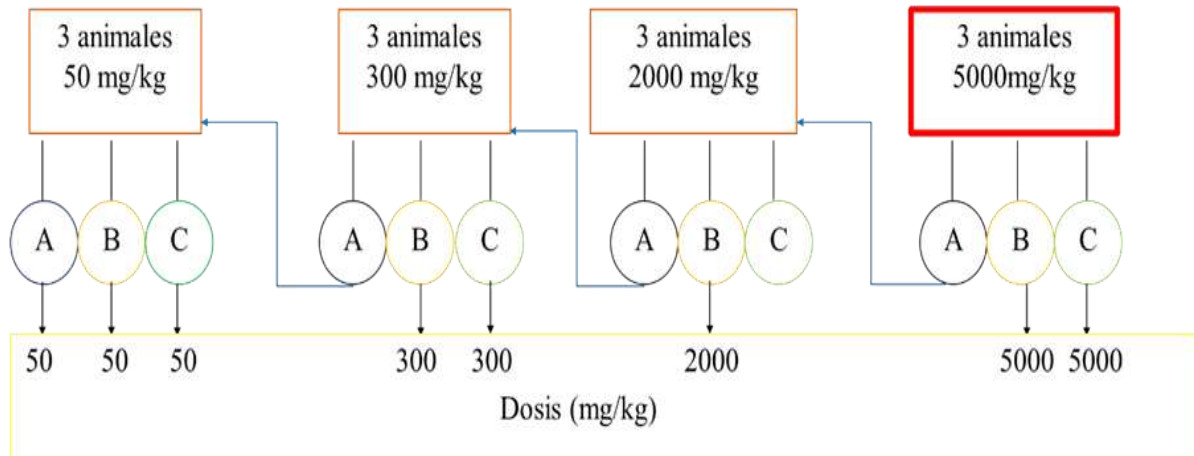
6.3.2 Determinación de dosis máxima tolerable en ratones

Para la determinación de la dosis máxima tolerable, se utilizaron ratones de la cepa Balb/c de 8-10 semanas de edad y 20-25 g de peso (Kang J. 2008), se llevó a cabo el método de dosis fijas (Van de Heuvel et al. 1987).

Antes del inicio del experimento los animales fueron mantenidos en sus jaulas durante al menos 5 días con la finalidad de aclimatarlas a las condiciones del laboratorio. El experimento consistió en la administración de la mayor dosis de EE (5,000 mg/kg) a un grupo conformado por tres ratones machos, según el diagrama propuesto por la organización para la cooperación económica y el desarrollo, OECD por sus siglas en inglés, (OECD 2001). La dosis fue preparada con 25% de agua destilada y administrada por vía oral (v.o.).

Una vez aplicada la dosis, los animales fueron sometidos a observación durante 14 días, durante este tiempo se prestó atención a signos de toxicidad y muerte de cada uno de los miembros del grupo. En caso de observar a algún integrante del grupo con algún signo de toxicidad o muerte se continuaría el experimento utilizando nuevamente tres animales a los cuales se les aplicaría una dosis menor y se someterían nuevamente a observación

durante 14 días. Finalmente al no observar ningún signo de toxicidad y muerte se establece la dosis máxima tolerable, como se puede observar en la figura 4 (OECD, 2001).



A: Muerte, B: Evidencia de toxicidad, C: No toxicidad.

Figura 6. Método de dosis fija para la determinación de dosis máxima tolerable.

6.3.3 Determinación de la actividad hepatoprotectora

Para la determinación de la actividad hepatoprotectora, se utilizaron ratas machos Wistar entre pesos de 300-450 g, fueron alimentados con una dieta líquida continua a través de v.o. (French et al 1986, Tsakumoto et al. 1990), las ratas estuvieron conformados en 5 grupos de 6 ratas cada una, las cuales fueron pesadas semanalmente.

Todos los grupos recibieron dos tratamientos diferentes, uno diariamente y otro cada tercer día, como se describe a continuación. Al grupo uno designado como grupo control (sin daño) se administró únicamente agua destilada (v.o.) diariamente a una dosis de 1 mL/kg y aceite de maíz (utilizado como vehículo) cada tercer día por vía subcutánea (v.sc.). El grupo dos, el control de daño, se le administró una dosis de agua destilada de 1 mL/kg (v.o.) y una dosis de CCl₄ de 0.60 mL/kg (v.sc.) cada tercer día, la dosis administrada fue preparada con 25% de aceite de maíz (Cachón A. et al. 2016). Al grupo

tres designado como control estándar, se administró diariamente silimarina a una dosis de 100 mg/kg (v.o.) y se indujo daño con CCl₄ cada tercer día (v.sc.) (Zhang W. et al. 2013).

Durante el experimento, se evaluó el EE de *S. fluitans* (grupo 4 y 5) a una concentración de 50 mg/kg diariamente (v.o.). Al grupo cuatro se le generó daño con CCl₄, mientras al grupo cinco únicamente se le administró EE de *S. fluitans* y no se le generó daño (control basal) (Khan H. et al. 2016). La administración de los tratamientos a los diferentes grupos experimentales se realizó durante doce semanas, como se muestra a continuación:

Tabla 3. Modelo experimental realizado para la inducción de daño hepático con CCl₄.

Grupo experimental (n=6)	Tratamiento diario (12 semanas)	Tratamiento cada 3er día
1. Control negativo	Agua destilada (1 mL/kg)	Aceite de maíz (4 mL/kg)
2. CCl₄ Control de daño	Agua destilada (1 mL/kg)	CCl ₄ (0.60mL/kg) 3:1 aceite de maíz
3. CCl₄+ Silimarina Control estándar	Silimarina (100 mg/kg)	CCl ₄ (0.60mL/kg) 3:1 aceite de maíz
4. CCl₄+EE	Extracto EE (50 mg/kg)	CCl ₄ (0.60mL/kg) 3:1 aceite de maíz
5. EE	Extracto EE (50 mg/kg)	Extracto EE (50 mg/kg)

Los animales fueron observados individualmente todos los días de 9:00 a 16:00 h durante 12 semanas, prestando con mayor interés las primeras 4 horas después del inicio de tratamiento (Stokes W. 2002). Una vez finalizado el tratamiento, se realizó el ensayo de inducción de sueño.

Posteriormente, se tomó muestras de sangre por punción cardiaca a cada una de las ratas y fueron sacrificadas, se extirpó el hígado y se calculó el peso relativo. Finalmente se realizó cortes histológicos al tejido hepático para su análisis (Cachón A. et al. 2016).

Ensayo de inducción de sueño

Para evaluar la funcionalidad del hígado, se realizó el ensayo de inducción de sueño. Para este ensayo fue necesario aplicar pentobarbital a una dosis de 20mg/kg vía intraperitoneal (i.p.). Posteriormente se midió el tiempo de latencia (tiempo que tarda cada animal en perder el equilibrio) y tiempo de duración total de sueño (tiempo en recuperar los reflejos para mantenerse de pie). La medición se realizó durante un tiempo máximo de 60 min (Celis C. et al. 2007, Woo et al. 2017).

Análisis bioquímico

Para el análisis bioquímico, fue necesario tomar muestras de sangre por punción cardiaca. Las muestras fueron depositadas en tubos amarillos sin anticoagulante (BD Vacutainer) durante 10 min para favorecer la coagulación; posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 3,600 r.p.m. durante 15 min. Finalmente se tomó el suero y se determinó las concentraciones de aspartato aminotransferasa (AST), la alanino aminotransferasa (ALT) y la fosfatasa alcalina (FA) relacionadas con daño hepático basado en la metodología propuesta por Reitman S. y Frankel S. 1957, los pasos para la determinación de cada una de ellas se mencionan a continuación.

La AST presenta una elevada actividad en el hígado, el incremento de concentraciones en suero se observan habitualmente en cirrosis alcohólica, hepatitis vírica y hepatitis inducida por fármacos. Para la determinación de la enzima se tomó 10 μ L de suero y se depositó en un slide conformado por una multicapa con soporte poliéster, el slide estuvo conformado por una capa de piridoxal-5-fosfato que induce la producción de glutamato y oxalacetato a partir de L-aspartato y α -cetoglutarato. El oxalacetato formado en la desaminación del L-aspartato es convertido a piruvato y dióxido de carbono por el oxalato descarboxilasa que se encuentra localizado en una segunda capa del slide. Posteriormente la piruvato oxidasa de la tercera capa del slide oxida al piruvato en acetilfosfato y peróxido de hidrógeno. El paso final de la reacción implica la oxidación catalizada por la peroxidasa de un leucoderivado para dar un pigmento coloreado. La frecuencia de oxidación del leucoderivado se monitoriza por espectrofotometría de reflectancia. El cambio de densidad de reflectancia es proporcional a la actividad enzimática de la muestra.

La ALT también presenta una elevada actividad en el hígado, se incrementa rápidamente durante la necrosis celular hepática, la cirrosis, los tumores hepáticos y la ictericia obstructiva. Para la determinación de ALT se tomó 10 μ L de suero, y se depositó en un slide conformado por piridoxal-5-fosfato que induce la formación de piruvato y glutamato a partir de la presencia de alanina y α -cetoglutarato. Luego el lactato deshidrogenasa localizada en una segunda capa del slide cataliza la conversión de piruvato y NADH en lactato y NAD⁺. La frecuencia de oxidación del NADH se monitoriza por espectrofotometría de reflectancia. La frecuencia de cambio en la densidad de reflectancia es proporcional a la actividad enzimática.

La FA es una enzima presente en el hígado que se incrementa en enfermedades hepatobiliares que implican colestasis, inflamación o cirrosis. Para la determinación fue necesario tomar 10 μ L de suero y depositada en un slide conformado por fosfato de *p*-nitrofenilo y además componentes necesarios para la reacción. La FA contenida en la muestra cataliza la hidrólisis de fosfato de *p*-nitrofenilo a *p*-nitrofenol en pH alcalino. El *p*-nitrofenol se difunde a la capa subyacente, donde se controla mediante espectrofotometría de reflectancia, los cambios en la densidad de reflexión es proporcional a la actividad enzimática.

Todos los análisis se realizaron mediante el uso de métodos estandarizados y automatizados usando el equipo VITROS System Integrated 5600 (Ortho Clinic Diagnostic) del laboratorio de análisis clínicos del Centro Médico Nacional Lic. Ignacio García Téllez del IMSS-Yucatán.

Análisis histológico

Se llevó a cabo el análisis histológico del hígado de las ratas al finalizar las 12 semanas de experimentación. Los hígados fueron extirpados y fijados con 10% de paraformaldehído y 0.1% de buffer de fosfatos (PBS), posteriormente fue necesario la obtención de cortes transversales del tejido de hígado con la ayuda de un procesador de tejidos marca Autotechnicon Duo, los cuales fueron incluidos en parafina líquida (punto

de fusión 60°C) hasta obtener pequeños bloques. Una vez obtenidos los bloques de parafina se obtuvieron 5 cortes seriados de 4 µM de espesor, luego los cortes fueron colocadas en portaobjetos tratados previamente con Poli-L-Lisina al 0.01% (Sigma) durante 24 horas, con la finalidad de adherir mejor el corte histológico al portaobjetos.

Después los cortes histológicos fueron desparafinados e hidratados. Para la desparafinación se utilizó una estufa a 60°C donde los portaobjetos con los cortes histológicos fueron calentados durante 10 min. Posteriormente fueron depositados en un vaso copling con xilol durante 10 min para eliminar el remanente de la parafina. Luego los cortes fueron hidratados con etanol a diferentes grados de concentración, se inició con el de mayor grado de concentración que fue el alcohol absoluto y así sucesivamente con alcohol a 90°, 70° y 50° hasta finalizar con agua destilada, todos se realizaron con un tiempo de incubación de 5 min. Posteriormente fueron depositados en un vaso copling con buffer de citratos donde se calentaron a baño maría durante 10 min y se dejaron enfriar durante 1 hora.

Luego los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina & eosina (H&E) y tricrómica de Masson (TM) y se dejaron secar durante 10 min, posteriormente fueron fijadas utilizando etanol a diferentes grados de concentración, iniciando con el de menor concentración, 50°, 70°, 90° y finalizando con alcohol absoluto. Las laminillas fueron depositadas en xilol y posteriormente fueron montadas con resina estellan (Merk) y cubreobjetos. Una vez fijadas y secas las laminillas se observaron al microscopio con objetivo de 10x y se tomaron fotografías con un fotomicroscopio Leica eclipse 55i equipado con una cámara digital Leica DC200 para su análisis.

Para el análisis fue necesario seleccionar las áreas consideradas adecuadas, rechazándose aquellos campos microscópicos con artefactos de corte. Posteriormente, las fotografías fueron analizadas con el software ImageJ donde se procedió al “*color deconvolution*”. El “*color deconvolution*” permitió separar la imagen original en imágenes con color monocromático que permitió distinguir con mayor claridad la morfología de hepatocitos, células infiltradas y fibras de colágeno obtenidas con las tinciones mencionadas. El resultado del número de hepatocitos y células infiltradas se expresó como el número de células promedio obtenidas con las imágenes de cada animal de los diferentes grupos

experimentales. Mientras que el contenido de colágeno se determinó mediante el promedio del porcentaje del área ocupada por las fibras de colágeno en relación al área total del conjunto de imágenes obtenidas de cada animal de los diferentes grupos experimentales.

Finalmente el análisis de la morfología celular y contenido de colágeno presente en el conjunto de imágenes de cada uno de los tejidos de las ratas pertenecientes a cada grupo experimental fue clasificado por un patólogo experto. La clasificación fue estratificada del 1 al 4 según el grado de alteración del tejido tomando en consideración el acino hepático. Se asignó el número 1 al tejido con patrón de hepatocitos con citoplasma y núcleo normales, sin alteraciones en la arteriola, vénula ni conducto biliar, sin presencia de fibrosis y con vena central sin alteraciones. El 2 al tejido con patrón con citoplasma con variaciones de tinción con gránulos y cromatina grumosa, mínimo aumento de infiltración celular, sin alteraciones en la arteriola, vénula y conducto biliar, sin presencia de fibrosis. El 3 al tejido con hepatocitos con citoplasma granular, núcleo con cromatina grumosa, moderada infiltración celular, sin alteraciones en arteriola, vénula y conducto biliar. Venas centrales con mínimo aumento de tejido fibroso. El número 4 fue asignado para el tejido con características de hepatocitos con citoplasma marcadamente granular, núcleo con cromatina grumosa, necrosis focal y con mínimo a moderado aumento de tejido fibroso.

6.4 Análisis Estadístico

Los resultados de los experimentos fueron reportados como media \pm desviación estándar. Se realizaron análisis de varianza de una vía (ANOVA) con pruebas *post hoc* de Tukey, utilizando un nivel de confianza de $p \leq 0.05$. Para datos no paramétricos se realizó el análisis Kruskal Wallis con comparaciones de Dunn. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism ver.5 statistical software.

Capítulo 7. Resultados y Discusiones

De acuerdo a las metodologías descritas, se obtuvieron los siguientes resultados:

7.1 Estudios *in vitro*

7.1.1 Actividad antioxidante

Captación del radical DPPH

Se determinó la capacidad de captación de radicales DPPH del EE, utilizando como control la vitamina C.

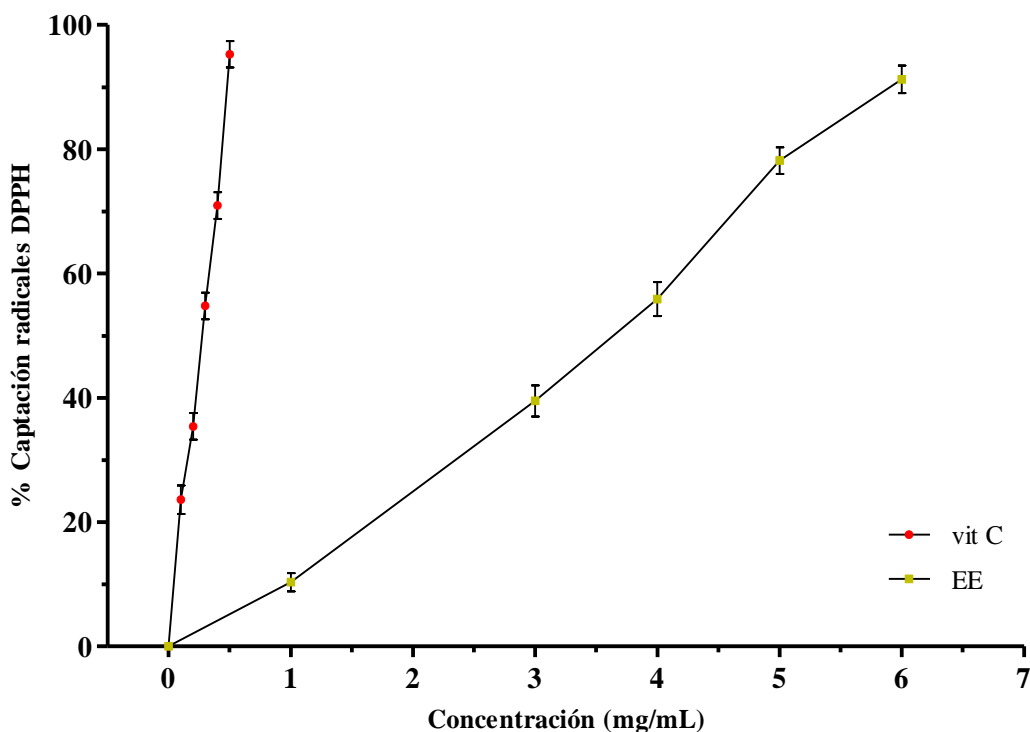


Figura 7. Curva concentración-efecto del EE de *S. fluitans*, donde se observa el porcentaje de captación de radicales libres en relación a la concentración del EE (mg/mL).

En la figura 7, se muestra el efecto esperado de la vitamina C como control antioxidante, presentó una capacidad de captación de radicales libres DPPH media de 0.28 mg/dL. El EE mostró un efecto antioxidante a concentración dependiente y una capacidad de captación de radicales media de 3.61 mg/dL.

Poder reductor de Fe (III)

Se determinó la capacidad del EE de poder reducir el Fe (III) a Fe (II), utilizando como control la vitamina C.

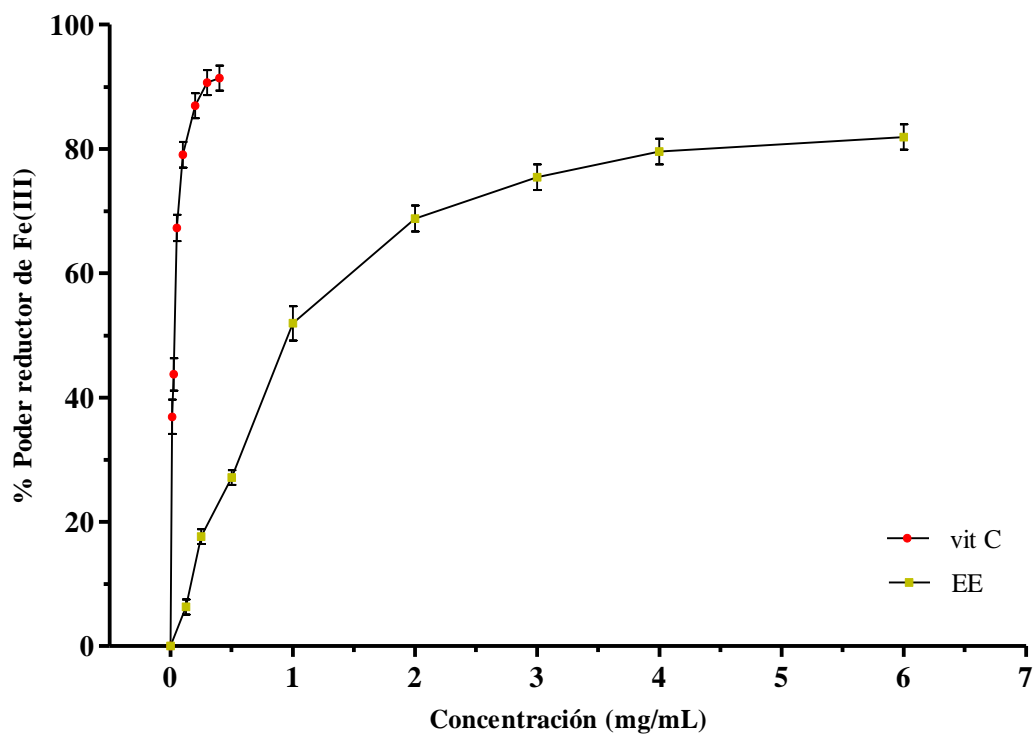


Figura 8. Curva concentración-efecto del EE de *S. fluitans*, donde se observa el porcentaje de poder reductor de Fe (III) en relación a la concentración del EE (mg/mL).

En la figura 8, se muestra el efecto de la vitamina C de control antioxidante, presentó la capacidad de reducir el Fe^{+3} a Fe^{2+} media de 0.5 mg/mL. El EE mostró un efecto antioxidante reductor a concentración dependiente media de 1.05 mg/mL.

Capacidad quelante de Cu^{2+}

Se determinó la capacidad quelante de Cu^{2+} del EE, utilizando como control el EDTA.

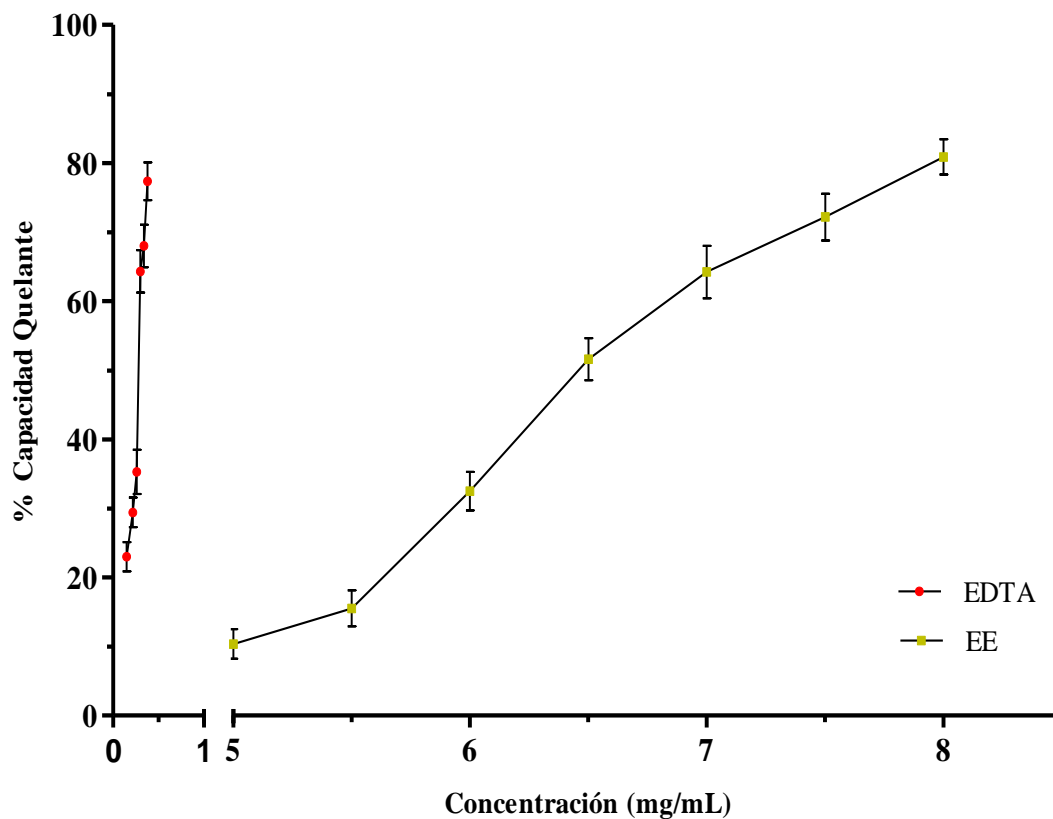


Figura 9. Curva concentración-efecto del EE de *S. fluitans*, donde se observa el porcentaje de capacidad quelante de Cu^{2+} en relación a la concentración del EE (mg/mL).

En la figura 9, se muestra el efecto del EDTA de control antioxidante, presentó una capacidad quelante de Cu^{2+} media de 0.29 mg/mL. El EE mostró un efecto antioxidante quelante a concentración dependiente media de 6.79 mg/mL.

Los resultados obtenidos de actividad antioxidante, indicaron que el EE de *S. fluitans* posee la capacidad de estabilizar radicales libres (DPPH), de reducir el Fe (III) y quelante de Cu (II), todos tuvieron un efecto dependiente de la concentración (figura 7,8 y 9), los métodos analizados de actividad antioxidante determinaron que el EE está conformado por compuestos que son capaces de transferir electrones al radical DPPH, reducir el metal Fe (III) y de quelar el Cu(II), mostrando un efecto antioxidante (Charles D. 2013).

El resultado obtenido de actividad antioxidante del EE sobre la capacidad de captación de radiales DPPH mostró un efecto a una $CE_{50} = 3.61$ mg/mL. Este resultado fue similar en estudios donde se utilizó extractos acuosos (EA) de *Nemacystum decipiens*, un alga café recolectada en las costas de Japón por Kuda T. y col. en 2005 y de la cual se obtuvo una capacidad de captación de radicales DPPH con $CE_{50} = 3.8$ mg/mL.

En 2010 Hwang y col. evaluaron el EA de *S. hemiphyllum* sobre radicales DPPH y determinaron una $CI_{50} = 1.8$ mg/mL, una concentración menor a la obtenida con el EE de *S. fluitans* que pertenece al mismo género. Sin embargo, el EE de *S. fluitans* mostró un mayor efecto en comparación a otros estudios, como el reportado por Zubia y col. en el 2007. En este estudio se evaluó el extracto de diclorometano: metanol (2:1) de las especies *S. ramifolium* y *S. pteropleuron* donde se obtuvo una CE_{50} de 6.64 mg/mL y 7.14 mg/mL respectivamente.

Ye H. y col. en 2009 determinaron el efecto antioxidante *in vitro* del EE de *S. pallidum*. En este estudio se reportó que a concentraciones entre 0.125 y 2 mg/mL se incrementaba el efecto antioxidante de captación de radicales libres DPPH de manera dependiente a la concentración como el obtenido en este estudio.

También Ye H. y col. (2009) determinaron el efecto antioxidante del EE de *S. pallidum* de poder reductor de Fe (III), donde se reportó que a concentración de 1 mg/mL tuvo resultados reductores similares con concentración de 8 µg/mL de vitamina C.

Los resultados obtenidos en este estudio de actividad antioxidante del EE *S. fluitans* de reducir el Fe (III), arrojaron una $CE_{50} = 1.05$ mg/mL. Este resultado fue similar al obtenido con el EA del alga *Papenfusiela kuromoro* proveniente de las costas de Japón, con una $CE_{50} = 1.7$ mg/mL (Kuda T. et al 2005).

En otro estudio realizado en la India, donde se evaluó la actividad antioxidante del EM de algas como *Sargassum marginatum*, *Padina tetrastomatica* y *Turbinaria conoides* utilizando la misma metodología, se observó que el EM tuvo la capacidad de reducir el Fe (III) a Fe (II) de manera dependiente a la concentración entre las concentraciones entre 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$, comportamiento semejante al reportado en este estudio (Chandini S. et al. 2008).

Mientras que durante la medición de la capacidad quelante de Cu (II) con EE de *S. fluitans* se observó un efecto con una $\text{CE}_{50}=6.79 \text{ mg/mL}$ (figura 9). El efecto antioxidante de quelación ya había sido observado anteriormente durante la medición del EE de *S. pallidum*. Sin embargo, en este estudio se midió la capacidad de quelar iones de Fe (II). En este estudio se reportó que a concentración de 2 mg/mL se obtenía 33% de capacidad quelante, de igual manera observó que entre concentraciones entre 0.25- 2 mg/mL el efecto fue dependiente a la concentración, resultado semejante a este estudio (Ye H. et al. 2009).

El efecto de actividad antioxidante obtenido en con el EE de *S. fluitans* también ha sido estudiado *in vitro* sobre células, como el estudio realizado por Pinteus et al. 2017 donde utilizó el EM del alga *Fucus spiralis*, en este estudio se midió la actividad y eficiencia para proteger las membranas celulares humanas MCF-7 ante la presencia de H_2O_2 , durante la evaluación se utilizó como control el floroglucinol, un compuesto que actúa como antioxidante protegiendo a las células del daño ocasionado por ERO's, los resultados indicaron que a concentraciones de 1 mg/mL se reducía el daño provocado a las células por el H_2O_2 .

Chale Dzul J. et al. 2014 reportó que el alga *Turbinaria tricostata* tuvo un efecto protector sobre células HepG2 a concentraciones entre 0.125 y 1 mg/mL , las células fueron tratadas con los extractos provenientes de esta alga y las cuales se pusieron en contacto con H_2O_2 durante 24 h para generar daño oxidativo, al finalizar el experimento no se observó un decremento de la viabilidad celular, a diferencia de las células que solamente fueron tratadas con el H_2O_2 .

Si bien, los resultados de actividad antioxidante determinados son de interés debido a que el EE fue capaz de disminuir el efecto dañino de radicales libres, de esta manera podría ayudar al cuerpo humano a neutralizar radicales libres cuando existan en mayor cantidad, como sucede en el estrés oxidante o coadyuvar junto con antioxidantes endógenos a la protección de las células, evitando el daño celular (Yu L. 2001, Ordoñez et al. 2006). Quizás el efecto de actividad antioxidante observado en este estudio puede deberse a la cantidad y tipo de compuestos contenidos en el EE como los florotaninos, tocotrienoles y derivados de ácidos grasos, los cuales se encuentran presentes en mayor cantidad en las algas cafés, grupo al que pertenece el alga *S. fluitans* (Tabla 2).

7.2 Estudios *in vivo*

7.2.1 Dosis máxima tolerable en ratones

Durante la determinación de la dosis máxima tolerable se demostró que el EE de *S. fluitans* es inocuo a dosis ≤ 5 g/Kg, ya que a esta dosis evaluada no se observó toxicidad aguda ni muerte de algún animal del grupo durante el experimento. De esta manera, la evaluación de la dosis máxima tolerable en ratones tuvo como finalidad determinar y establecer la dosis tóxica. Los resultados indicaron que el EE es seguro a dosis menores o iguales a 5 g/Kg (OECD, 2001). Según la clasificación de sustancias tóxicas admitida por la Unión Europea (UE) y la Organización para la Cooperación del Desarrollo Económico (OECD), se clasifica al EE de *S. fluitans* como una sustancia inocua y segura para ser utilizada en organismos vivos, siendo uno de los primeros reportes obtenidos sobre la toxicidad del EE proveniente de las algas de esta especie. (Van de Heuvel et al. 1990).

7.2.2 Actividad hepatoprotectora

Peso corporal

En la figura 10 se observa el porcentaje promedio del cambio corporal semanal de las ratas a través de 12 semanas de experimentación.

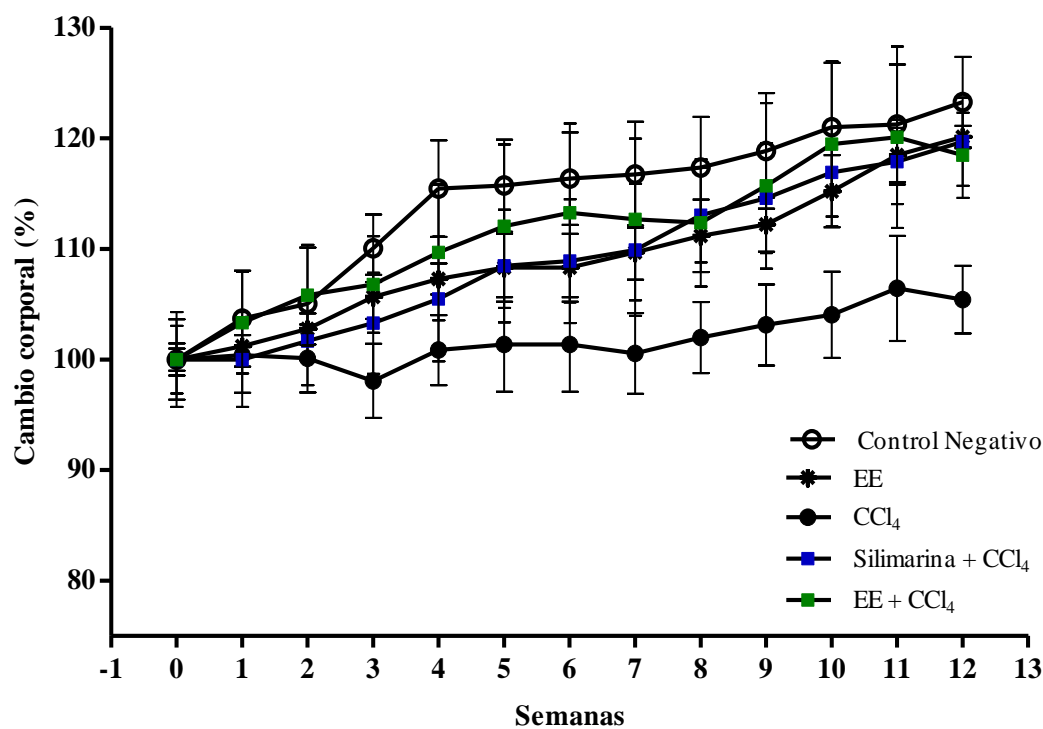


Figura 10. Porcentaje promedio de cambio corporal de los animales durante el experimento. Las ratas de cada grupo experimental fueron: Control negativo, EE (50 mg/kg), CCl₄ (0.60 mg/kg), Silimarina (100mg/kg) + CCl₄, EE+ CCl₄. Los resultados son expresados como medias \pm DE (n=6).

Como se observa en la figura 10, todos los grupos incrementaron su peso corporal a lo largo de las 12 semanas. Sin embargo, los porcentajes fueron distintos. Los pesos del grupo control negativo (sin daño), fueron aumentando gradualmente durante las 12 semanas, iniciaron con un peso promedio de 397g y finalizaron con un peso de 490 g, lo que representó un incremento del 23% con respecto a su peso inicial. El grupo de ratas

que recibió únicamente EE, inició con un peso promedio de 398 g, y finalizó con peso de 478 g, tuvo un incremento de alrededor de 80 g, este incremento representó un 20%.

El grupo de daño con CCl₄ inició con una media de peso de 438 g y mostró decrementos del 2% durante la semana 3, del 1% durante la semana 7 y de 1% durante la última semana, este grupo finalizó con un peso corporal de 463 g, registrando el menor incremento (6%). El grupo de tratamiento con silimarina + CCl₄ inició con un peso de 342 g y finalizó con un peso de 410 g, mostró un incremento del 20%. Mientras que el grupo de EE + CCl₄ tuvo un peso promedio de 377 g al iniciar el experimento y finalizó con 446 g, este grupo mostró un incremento del 18%.

Como se mencionó anteriormente los pesos de los grupos experimentales mostraron variación con respecto al peso inicial. Todos los grupos experimentales mostraron un incremento de peso, siendo el de mayor incremento el grupo control negativo (23%), y el de menor incremento el control de daño con CCl₄ (6%). Este menor incremento de peso corporal observado en el grupo de CCl₄ es similar en pacientes que sufren de daño hepático, quienes muestran un deplorable estado nutricional al estar en contacto de manera continua con sustancias nocivas (Margáin et al. 2017).

El incremento corporal observado en el grupo experimental de EE + CCl₄ y silimarina + CCl₄ del 18% y 20% respectivamente, puede deberse a un incremento de la tolerancia ante el estrés oxidante que evita la pérdida de peso corporal (Margáiz et al 2017). El comportamiento de peso corporal durante la experimentación es un indicativo importante para la determinación del efecto hepatoprotector, ya que esto permite observar el efecto dañino provocado a largo plazo.

Al finalizar las 12 semanas de experimentación se realizó el ensayo de inducción de sueño, como se muestra a continuación:

Inducción de sueño

Son dos los experimentos llevados a cabo durante el ensayo de Inducción de sueño, la medición del tiempo que tardan los animales en quedar dormidos (tiempo de latencia) y el tiempo en que permanecen dormidos (duración de sueño), después de la aplicación de pentobarbital a dosis de 20 mg/kg.

❖ Tiempo de latencia

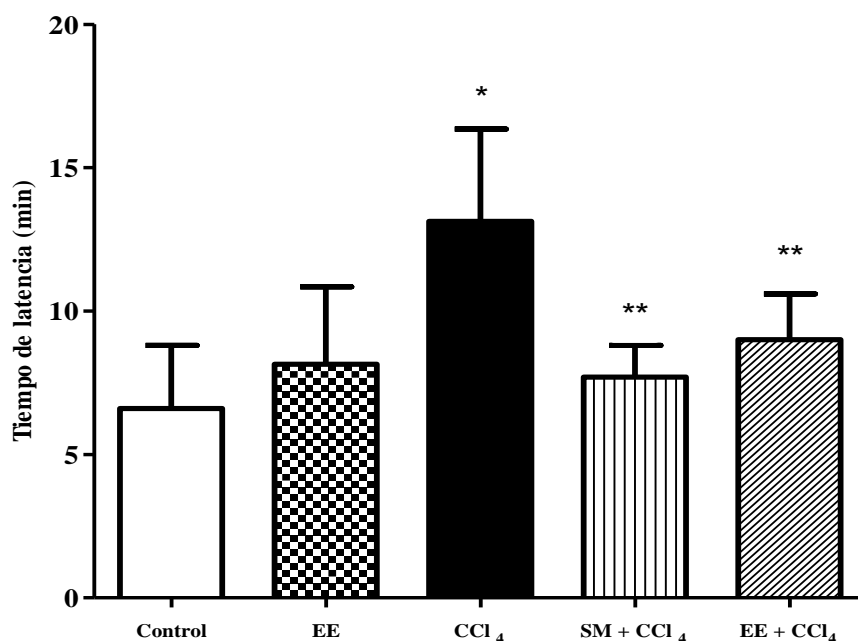


Figura 11. Tiempo de latencia de los grupos experimentales inducidos con pentobarbital. Los resultados son expresados como media \pm DE (n=6). Se realizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) con pruebas *post hoc* de Tuckey: * $p < 0.05$ vs control y ** $p < 0.05$ vs CCl₄.

En la figura 11, se muestra el promedio de tiempo de latencia de los diferentes grupos experimentales. El grupo control negativo mostró un tiempo de latencia promedio de 6 min, el grupo de EE tuvo una media de 8 min y el grupo control de daño con CCl₄ mostró un tiempo promedio de 13 min, siendo el de mayor tiempo a diferencia de los otros grupos evaluados. El grupo de silimarina + CCl₄ y EE + CCl₄ tuvieron un tiempo promedio de 7

y 9 min respectivamente. Se observó diferencias significativas en el grupo de daño con CCl₄ al ser comparado con el control negativo y diferencias significativas con los grupos de silimarina + CCl₄ y EE + CCl₄ al compararlos con el grupo de daño de CCl₄.

❖ Duración de sueño

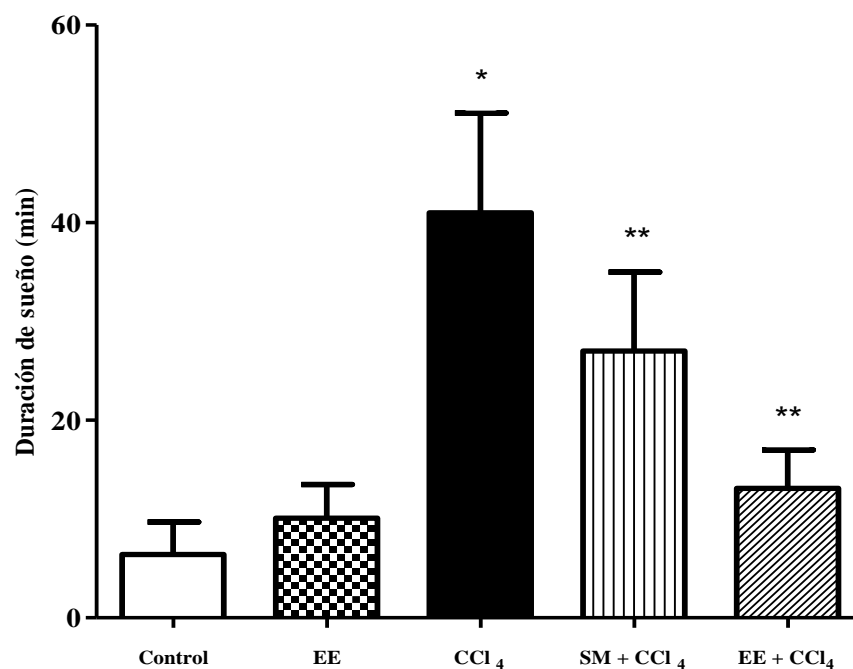


Figura 12. Duración de sueño de los grupos experimentales inducidos con pentobarbital. Los resultados son expresados como media ± DE (n=6). Se realizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) con pruebas *post hoc* de Tuckey: * $p < 0.05$ vs control y ** $p < 0.05$ vs CCl₄.

En la figura 12, se muestra el tiempo promedio de duración de sueño de los diferentes grupos experimentales. El grupo control negativo mostró un tiempo de duración de sueño promedio de 6 min, el grupo de EE tuvo una media de 10 min y el grupo control de daño con CCl₄ mostró un tiempo promedio de 41 min, siendo el de mayor tiempo de duración de sueño a diferencia de los otros grupos evaluados.

El grupo de silimarina + CCl₄ y EE + CCl₄ tuvieron un tiempo promedio de 27 y 13 min respectivamente. Se observó diferencias significativas en el grupo de daño con CCl₄ al ser comparado con el control negativo y diferencias significativas con los grupos de silimarina + CCl₄ y EE + CCl₄ al compararlos con el grupo de daño de CCl₄.

Mediante el ensayo de inducción de sueño se determinó la funcionalidad del hígado. En este ensayo se llevó a cabo dos experimentos, la medición del tiempo que tardan en quedar dormidas las ratas (tiempo de latencia) y el tiempo en que permanecen dormidas, al ser aplicada una dosis de 20 mg/kg de pentobarbital (figura 11 y 12).

El grupo control negativo mostró el menor tiempo de duración del efecto del pentobarbital a diferencia de los otros grupos experimentales. Este resultado muestra el funcionamiento normal del hígado, ya que se tuvo con este grupo experimental un eficiente metabolismo del fármaco. El grupo de tratamiento con EE tuvo efectos similares al control negativo. Mientras que el grupo que mostró el mayor TL y TD, fue el grupo de daño con CCl₄ con un tiempo promedio de 2 y 6.8 veces mayor al grupo control, siendo significativamente diferentes.

El incremento del tiempo observado con el grupo de CCl₄ puede deberse a una disminución del proceso de biotransformación del pentobarbital que se encargan de realizar los hepatocitos a través de oxidación microsomal, provocando una mayor duración agonista sobre el receptor GABA_A de las neuronas en el sistema nervioso central (SNC) responsable del efecto hipnótico-sedante (Tsubokura Y. et al. 2016, Toshimoto et al. 2017). Esta disminución del proceso de biotransformación es debido al mal funcionamiento del hígado que puede ser provocado por múltiples factores como un decremento de la circulación sanguínea entero-hepática (Toshimoto et al 2017), pérdida de tejido fenestrado que permite la circulación sanguínea de fármacos hacia los hepatocitos (Higashi et al. 2017), disminución del número de células principalmente los hepatocitos, y de un incremento de tejido fibrótico ocasionado por el daño con CCl₄ (Friedman 2010).

El grupo experimental con tratamiento con EE de *S. fluitans* mostró un menor TL y TD en comparación con el grupo de daño con CCl₄, demostrando de esta manera que el

extracto proveniente de esta alga ejerció un efecto protector, ya que el hígado de las ratas de este grupo experimental funcionó de mejor manera ante el efecto provocado por el pentobarbital a diferencia del grupo de CCl₄.

Peso relativo del hígado

Una vez finalizado el ensayo de Inducción de sueño, las ratas fueron pesadas y sacrificadas, se extirpó el hígado y se pesó. Posteriormente se calculó el peso relativo con respecto a la media de peso corporal como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Peso relativo del hígado de los grupos experimentales.

Grupo	Peso relativo del hígado (g/g peso corporal, %)
Control negativo	2.84 ± 0.11
EE	2.87 ± 0.05
CCl₄	3.36 ± 0.16*
Silimarina + CCl₄	2.78 ± 0.27
EE + CCl₄	2.83 ± 0.11

Los resultados son expresados como medias ± DE (n=6), ANOVA *post hoc* de Tuckey: * $p < 0.05$ vs todos los grupos.

En la tabla 4, se muestra el porcentaje promedio de peso relativo del hígado de cada uno de los grupos experimentales. El grupo con el mayor porcentaje de peso relativo se observó en el grupo de daño con CCl₄, quien mostró diferencias significativas con respecto a los otros grupos experimentales.

Este incremento del peso relativo de los hígados puede deberse a un proceso inflamatorio provocado por el daño con CCl₄, ya que durante este proceso se encuentra involucrado el proceso de reclutamiento de células, principalmente leucocitos como los neutrófilos que propician un incremento en el tamaño del hígado, siendo la inflamación un punto clave para el desarrollo de fibrosis (Higashi T. et al. 2017, Matsumoto S. et al. 2018).

A diferencia con los otros grupos experimentales donde no se observó un incremento del peso relativo puede pensarse que hubo un proceso antiinflamatorio, sin embargo únicamente puede ser afirmado para los grupos EE + CCl₄ y silimarina + CCl₄, ya que estos grupos fueron sometidos a daño hepático con el CCl₄, sin embargo es difícil de comprobar ya que es necesario realizar pruebas posteriores que comprueben dicho efecto. Recientemente se ha visto que extractos provenientes de otras especies de algas del mismo género han mostrado poseer un efecto directo sobre el factor nuclear kappa B (NF-κB, por sus siglas en inglés) que se encarga de regular las citocinas proinflamatorias. En un estudio realizado por Oh S. et al. en 2016 comprobó que el EE proveniente del alga café *S. serratifolium* originaria de las costas de Korea y Japón logró inhibir el NF-κB y consecuentemente la producción de óxido nítrico (NO), prostaglandina E₂ y citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF-α. Los resultados fueron determinados a partir de muestras obtenidas de ratones ICR tratados con una dosis diaria de EE de 10 mg/kg de *S. serratifolium* durante un tiempo de 4 días. El proceso inflamatorio fue estimulado con 2 mg/mL de lipopolisacáridos (LPS).

Análisis bioquímico

A partir de las muestras de suero de las ratas, se determinó los marcadores enzimáticos de AST, ALT y FA relacionados con daño hepático. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Marcadores serológicos de daño hepático.

Grupo	AST (U/L)	ALT (U/L)	FA (U/L)
Control negativo	81.00± 2.16	82.00±5.10	121.33 ±11.09
EE	90.00±13.00	80.50±7.50	123.50 ±11.50
CCl ₄	317.00±9.27*	187.77±7.85*	244.33 ±2.87*
Silimarina + CCl ₄	93.67±9.18**	93.00 ±7.82**	132.33 ±9.46**
EE + CCl ₄	87.67±2.49**	92.33±6.60**	130.50±5.50**

AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanino aminotransferasa y FA: fosfatasa alcalina, fueron determinados después de 12 semanas de tratamiento. Los resultados son expresados como medias ± DE (n=6), ANOVA *post hoc* de Tuckey: * $p < 0.05$ vs control y ** $p < 0.05$ vs CCl₄.

En la tabla 5, se muestra la concentración en suero de las enzimas relacionadas con daño hepático. La menor concentración de AST, ALT y FA se observó en el grupo control negativo, el EE mostró una concentración enzimática similar al control negativo e inferior al grupo de daño con CCl₄. El grupo de daño con CCl₄ mostró la mayor concentración en las tres enzimas evaluadas. La concentración enzimática de AST, ALT y FA obtenida en el grupo de silimarina + CCl₄ y EE + CCl₄ fueron menores al grupo de daño con CCl₄. Se observó diferencias significativas en el grupo de daño con CCl₄ al ser comparado con el control negativo y diferencias significativas con los grupos de Silimarina + CCl₄ y EE + CCl₄ al compararlos con el grupo de daño de CCl₄.

De acuerdo a la tabla 5, se observa que el grupo experimental EE + CCl₄ mostró una menor concentración de las enzimas estudiadas a diferencia del grupo de daño con CCl₄, quien mostró concentraciones significativamente más altas que el resto de los grupos experimentales. Esto comprobó que el EE de *S. fluitans* tuvo un efecto protector sobre el hígado ya que las concentraciones de las enzimas AST, ALT y FA fueron 3.6, 2, 1.8 veces

menores respectivamente en comparación a la concentración del grupo experimental de CCl₄. El EE de *S. fluitans* tuvo resultados similares al grupo con tratamiento de silimarina ya que las concentraciones enzimáticas de AST, ALT y FA no mostraron diferencias significativas.

Estudios realizados en otras especies de algas del mismo género se han observado resultados similares, Hira K. y col. en 2016 determinaron el efecto hepatoprotector de las especies de algas cafés *S. variegatum*, *S. tenerrimum* y *S. binderi* mediante un modelo de daño hepático inducido con CCl₄. Para el experimento se utilizó ratas Wistar a quienes se indujo daño con una dosis de 2 mg/kg de CCl₄ aplicada por vía intraperitoneal. Las ratas fueron tratadas simultáneamente con una dosis de 200 mg/kg de EE de las algas diariamente durante un tiempo de 14 días. Los resultados indicaron que el EE de las algas *S. tenerrimum* y *S. binderi* mostraron un potencial efecto hepatoprotector ya que no se observó un incremento de las enzimas de daño hepático AST, ALT y FA. Mientras que el EE de *S. variegatum* no mostró tener el mismo efecto, ya que las concentraciones de las enzimas hepáticas mostraron un incremento de aproximadamente 1.5 veces, similar al grupo control de CCl₄.

También ha sido evaluado el EE de las especies *S. ilicifolium*, *S. lanceolatum*, *S. swartzii* provenientes de las costas de Pakistán. La evaluación se llevó a cabo en ratas Wistar a una dosis de 200 mg/kg durante un tiempo de 14 días. La dosis de EE fue aplicada por v.o. diariamente, y se utilizó como control de daño el CCl₄ a una dosis de 2 mL/kg. Al finalizar el experimento se midió la concentración de las enzimas AST, ALT y FA. Los resultados de estas enzimas fueron significativamente menores en los grupos experimentales donde se utilizó el EE de las algas en comparación con el grupo de daño con CCl₄. El grupo de daño con CCl₄ mostró un incremento de 2 a 3 veces la concentración de las enzimas AST, ALT y FA (Hira K. y col. en 2017).

Análisis histológico

A partir de los cortes histológicos del hígado de las ratas se llevó a cabo la tinción de H&E y TM que permitió el análisis microscópico de la morfología celular y la determinación de la presencia de fibras de colágeno relacionados con daño hepático. Los resultados se muestran en las figuras 13 y 14.

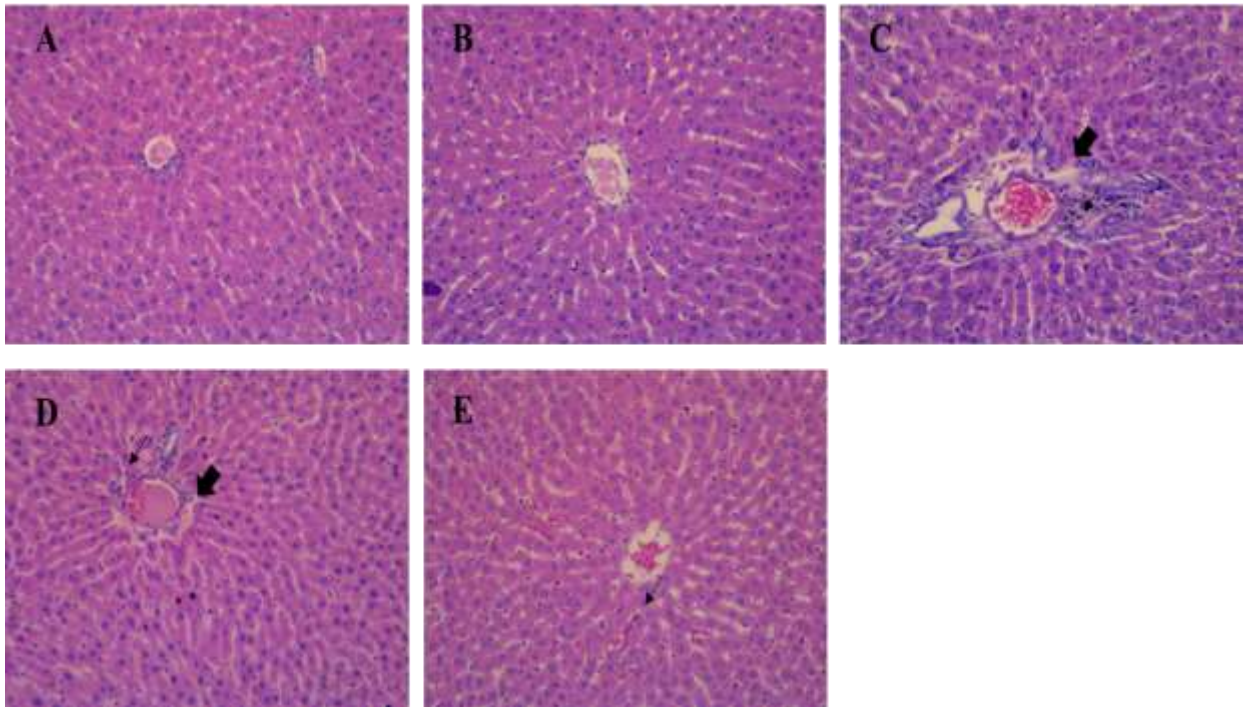


Figura 13. Fotografías representativas del tejido hepático de los diferentes grupos experimentales obtenidos con la tinción de hematoxilina y eosina (H&E), 10x. **A:** Control Negativo; **B:** EE; **C:** CCl₄; **D:** silimarina + CCl₄; **E:** EE + CCl₄. Infiltración de células (flechas delgadas), ausencia de células (flechas gruesas).

En la figura 13 se muestran las imágenes representativas de los cortes de tejido de hígado teñidos con H&E. La H&E tiñe el núcleo de las células de color azul y el citoplasma de color rosa y permite distinguir con claridad las células presentes en el tejido. En la imagen A; control negativo, se observa la vena central irradiada con hepatocitos con núcleo y citoplasma sin daños aparentes, similar a lo encontrado en animales sólo con EE; imagen B. La figura C, control de daño con CCl₄ muestra la presencia de células infiltradas (flecha

delgada) y espacios sin tinción alrededor de la vena central, haciendo referencia a la ausencia de células hepáticas por muerte celular (flecha gruesa). La imagen D; silimarina + CCl₄ muestra también la presencia de células infiltradas (flecha delgada) y espacios con ausencia de células hepáticas (flecha gruesa), sin embargo en menor medida que la imagen C de CCl₄. La imagen E; EE + CCl₄ muestra infiltración de células (flecha delgada), pero con menor evidencia de ausencia de células hepáticas (espacios sin tinción).

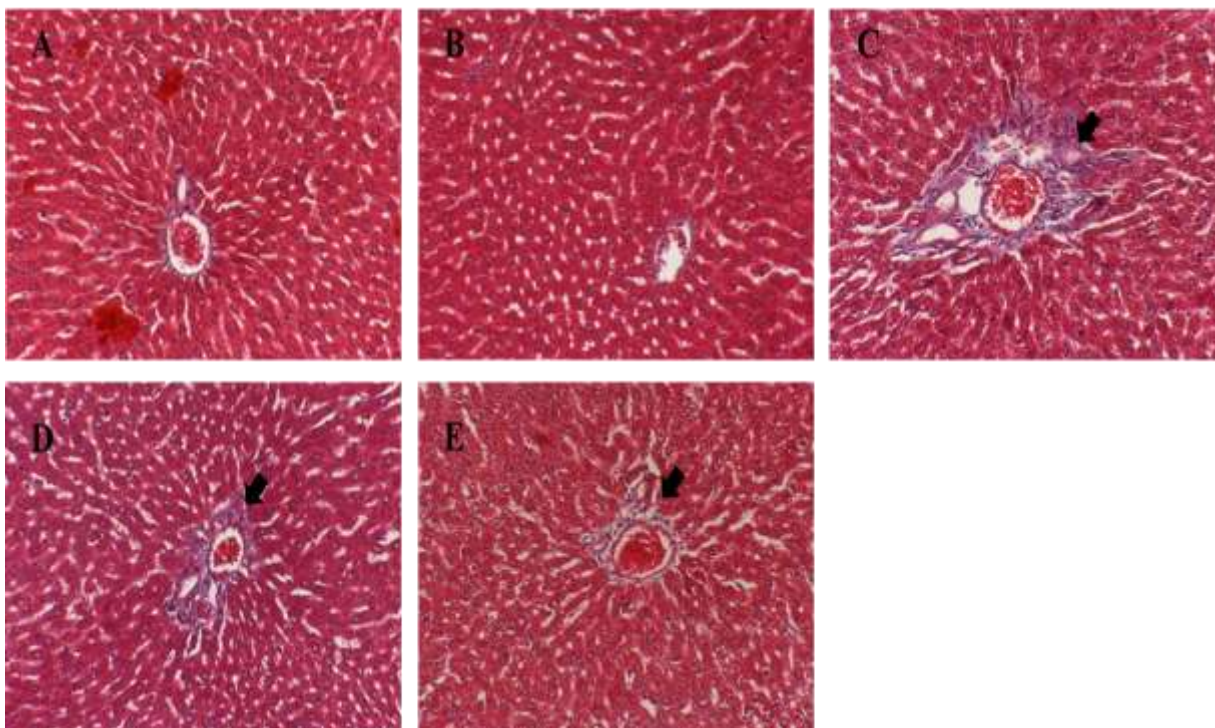


Figura 14. Fotografías representativas de tejido hepático de los diferentes grupos experimentales obtenidos con la tinción tricrómica de Masson, 10x. **A:** Control Negativo; **B:** EE; **C:** CCl₄; **D:** silimarina + CCl₄; **E:** EE + CCl₄. Presencia de bandas de fibras de colágeno (flechas negras).

La figura 14 muestra el conjunto de imágenes representativas del tejido hepático teñidas con tinción tricrómica de Masson. La tinción TM, permite distinguir con claridad la presencia de fibras de colágeno ya que adquieren una coloración azul con esta técnica. La imagen A; control negativo y B; EE muestra en menor medida la presencia de fibras de colágeno. La imagen C; CCl₄ muestra un incremento de fibras de colágeno (flecha negra),

a diferencia de las imágenes D; silimarina + CCl₄ y E; EE + CCl₄ donde se observa una menor cantidad de depósitos de colágeno en comparación con la imagen C; CCl₄.

Se realizó el análisis cuantitativo de las imágenes obtenidas con la tinción de H&E, con la ayuda del programa ImageJ se determinó el número de células promedio del conjunto de imágenes obtenidas de cada animal por grupo experimental. De acuerdo a la cuantificación obtenida se realizó la clasificación de las células de acuerdo a su tamaño y se obtuvo el número de hepatocitos (células de mayor tamaño, 10 – 30 μm) y células infiltradas (las de menor tamaño 0-10 μm). En la figura 15 se muestra el número promedio de hepatocitos y en la figura 16 se muestra el número promedio de células infiltradas.

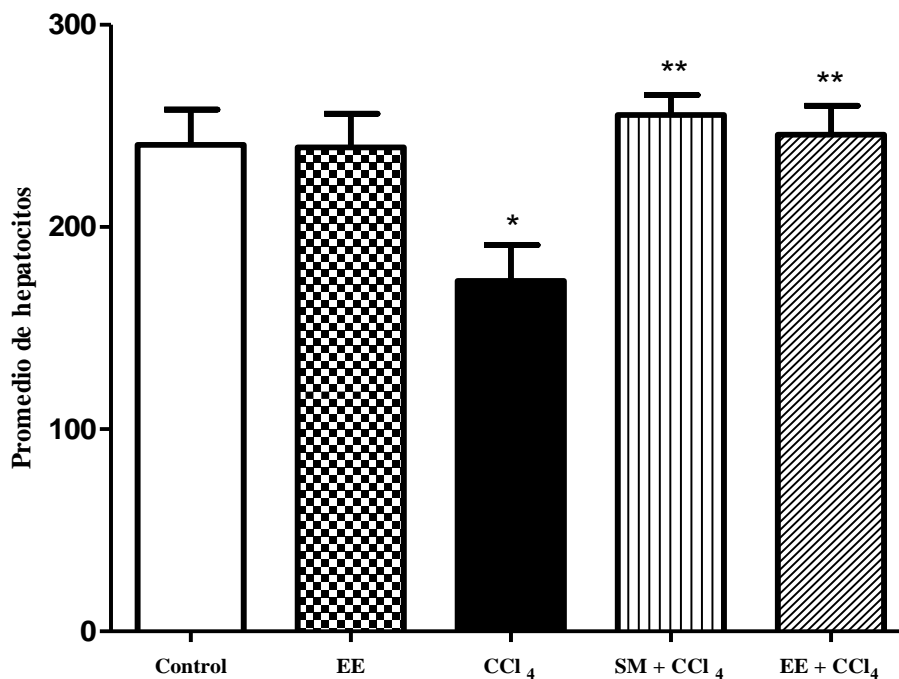


Figura 15. Promedio de hepatocitos presentes en las imágenes obtenidas del tejido hepático de los diferentes grupos experimentales, cuantificados a partir de la tinción de H&E. Los resultados son expresados como media ± DE (n=6). Se realizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) con pruebas *post hoc* de Tuckey: * $p < 0.05$ vs control y ** $p < 0.05$ vs CCl₄.

En la figura 15 se observa el promedio de hepatocitos presentes en las imágenes obtenidas del tejido hepático de los diferentes grupos experimentales. En el grupo control se tuvo un promedio de 240 células hepáticas, similar al grupo de EE. En el grupo de animales tratados con CCl₄ se observó un decremento significativo del número promedio de células hepáticas en comparación con el grupo control con un promedio de 174 hepatocitos. El grupo de silimarina + CCl₄ tuvo un promedio de 255 y EE + CCl₄ tuvo 245, similares al control y diferentes al grupo de CCl₄.

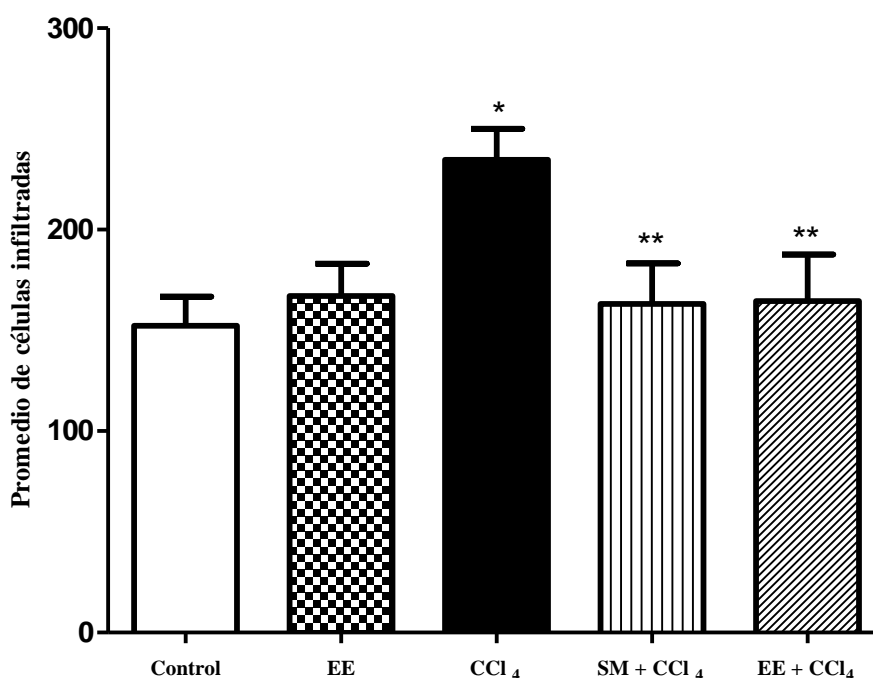


Figura 16. Promedio de células infiltradas presentes en las imágenes obtenidas del tejido hepático de los diferentes grupos experimentales, cuantificados a partir de la tinción de H&E. Los resultados son expresados como media \pm DE (n=6). Se realizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) con pruebas *post hoc* de Tuckey: * $p < 0.05$ vs control y ** $p < 0.05$ vs CCl₄.

En la figura 16 se muestra el promedio de células infiltradas presentes en las imágenes obtenidas del tejido hepático de los diferentes grupos experimentales. El grupo control tuvo un promedio de 152 células infiltradas, mientras el grupo de EE tuvo un promedio de 167. El grupo de CCl₄ tuvo un promedio de 234 mostrando un incremento significativo del número de células infiltradas en comparación con el grupo control. El grupo de silimarina + CCl₄ y EE + CCl₄ tuvieron un promedio similar de 163 células infiltradas, estos grupos mostraron un menor incremento de las células infiltradas significativamente diferente al grupo de CCl₄.

Se realizó el análisis cuantitativo de las imágenes obtenidas con la tinción de TM con la ayuda del programa ImageJ, determinando el porcentaje promedio de fibras de colágeno del conjunto de imágenes obtenidas de cada animal por grupo experimental. Los resultados se muestran a continuación en la figura 17.

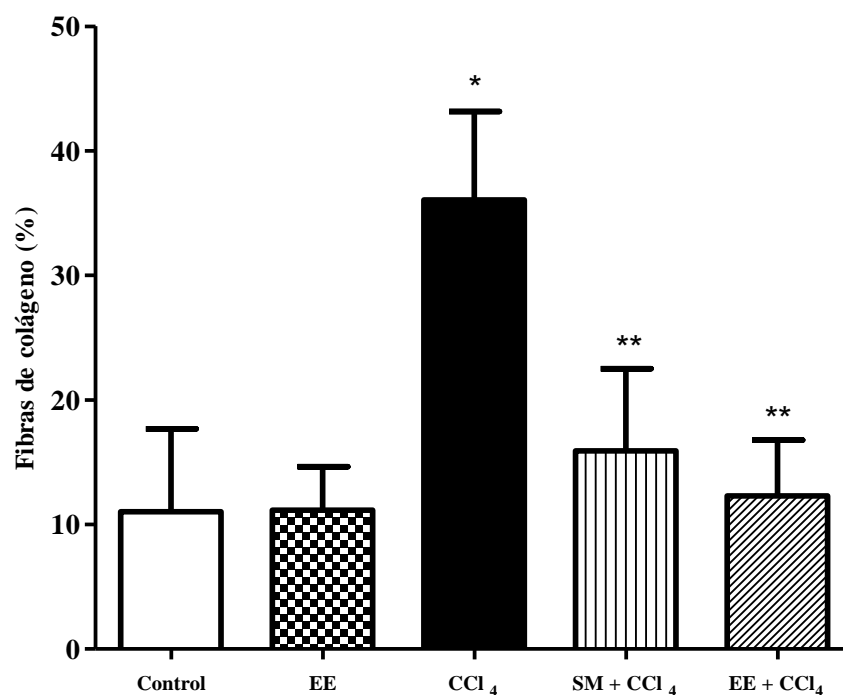


Figura 17. Porcentaje promedio de fibras de colágeno presentes en el tejido hepático de los diferentes grupos experimentales, obtenidos a partir de la tinción TM. Los resultados son expresados como media \pm DE (n=6). Se realizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) con pruebas *post hoc* de Tuckey: * $p < 0.05$ vs control y ** $p < 0.05$ vs CCl₄.

En la figura 17 se muestra el promedio de fibras de colágeno presentes en las imágenes obtenidas del tejido hepático de los diferentes grupos experimentales. El grupo control y EE fueron similares con 11%, el grupo de CCl₄ tuvo un incremento de 36% de fibras de colágeno significativamente diferentes con el grupo control. El grupo de silimarina + CCl₄ y EE + CCl₄ mostraron un menor porcentaje de fibras de colágeno a diferencia del grupo de CCl₄, siendo 2.4 y 3 veces menores respectivamente.

Finalmente se llevó a cabo la clasificación del grado de alteración del tejido, donde se tomó en consideración el análisis de cada uno de los tejidos pertenecientes a cada grupo realizado por un patólogo experto, los resultados se muestran en la figura 18.

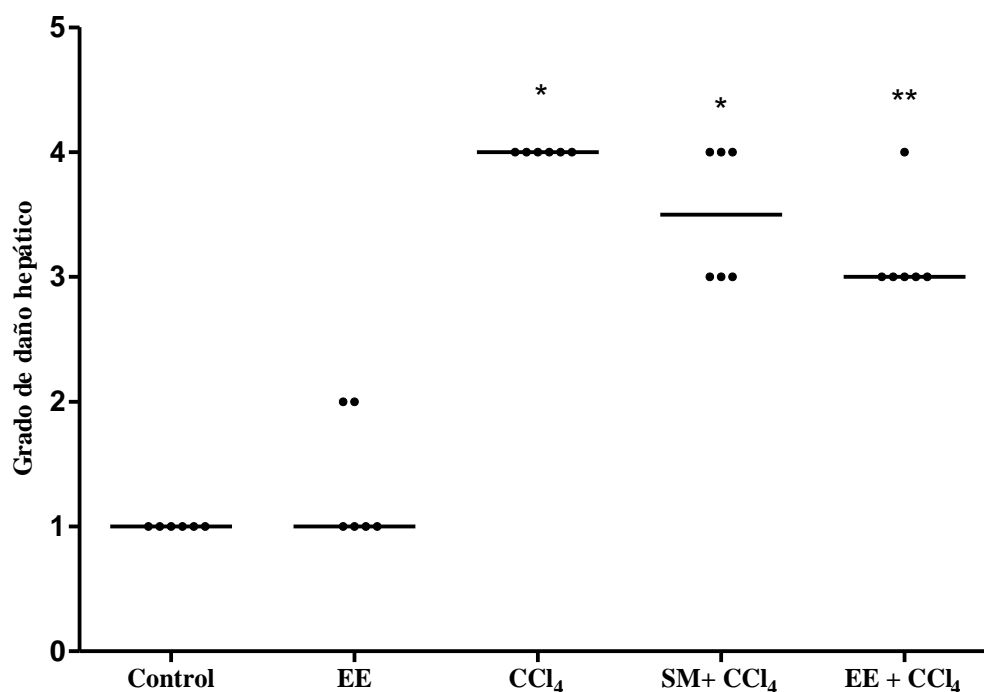


Figura 18. Clasificación del daño hepático establecida por un patólogo a partir del análisis de imagen del tejido hepático. El análisis de tejido hepático fue realizado de manera individual por grupo experimental a partir de las tinciones de H&E y TM. Los resultados son expresados como medianas del grado de daño obtenido por grupo (n=6). Se realizó el análisis Kruskal Wallis con comparaciones de Dunn: * $p < 0.05$ vs control, ** $p < 0.05$ vs CCl₄.

La clasificación que se muestra en la figura 18, fue estratificada del 1 al 4 según el grado de alteración del tejido tomando en consideración el acino hepático. El tejido hepático de todas las ratas del grupo control cumplió con un patrón de 1 con características de hepatocitos con citoplasma y núcleo normales sin presencia de fibrosis. Mientras que en el grupo de EE fue similar al control excepto por dos animales que tuvieron un patrón 2 con mínima infiltración celular. Todas las ratas del grupo de daño con CCl₄ tuvieron un patrón 4 con necrosis celular y moderada presencia de fibras de colágeno. Tres animales del grupo de silimarina + CCl₄ mostraron cumplir un patrón de 3 con moderada infiltración celular y mínima presencia de fibras de colágeno, los tres restantes cumplieron un patrón de 4. La mayoría del grupo de EE + CCl₄ tuvieron grado 3, únicamente una rata cumplió con los criterios de grado 4. El grupo de CCl₄ y silimarina + CCl₄ fueron diferentes al grupo control, mientras que el grupo de EE + CCl₄ fue diferente al grupo de CCl₄.

A través de la histología se obtuvieron datos importantes sobre la actividad hepatoprotectora, entre ellos el número promedio de hepatocitos, el número de células infiltradas y el porcentaje de fibras de colágeno presente en cada uno de los grupos experimentales. La disminución del número promedio de células hepáticas hace énfasis a la lesión tisular provocada por el CCl₄, ya que el metabolismo del CCl₄ a través del citocromo P450_{2E} da como resultado el radical CCl₃• (triclorometil). El decremento significativo observado en el grupo de CCl₄ muestra el efecto persistente del radical CCl₃• sobre los ácidos grasos poliénicos presentes en los fosfolípidos de membrana que origina la destrucción oxidativa y por consiguiente la muerte de los hepatocitos (Claria J. et al. 2008, Friedman 2010). El grupo de ratas con tratamiento con EE de *S. fluitans* no mostró un decremento del número de hepatocitos, mostrando un efecto protector en los hepatocitos ante el efecto tóxico del CCl₄.

También la infiltración celular es un mecanismo involucrado en la lesión tisular. Entre las células involucradas en la infiltración destacan la activación de células Kupffer, células inflamatorias como neutrófilos y monocitos; y la activación de CHE involucrada en la síntesis de colágeno fibrilar. Cabe recordar que las CHE permanecen quiescentes hasta ser activadas durante el daño tisular, entre las características que tienen estas células es que adquieren la capacidad de migración (Higashi T. et al. 2017). No se observó un incremento

significativo del número promedio de células infiltradas en el grupo con tratamiento con EE de *S. fluitans*, mostrando una vez más la capacidad del extracto de ejercer un efecto benéfico sobre el daño tisular. Otro mecanismo involucrado con el daño tisular es la inflamación. En la inflamación se encuentran involucradas la participación muchas células, entre ellas se tiene a las células Kupffer que forman parte del sinusoides hepático y cuya función es detoxificación, éstas células se activan ante ciertos estímulos como el radical $\text{CCl}_3 \cdot$. La activación de células Kupffer provoca la liberación de citocinas como IL-1, IL-6, IL-10 y TNF- α que propicia el reclutamiento de neutrófilos y monocitos circundantes los cuales amplifican la respuesta inflamatoria (Claria J. et al. 2008, Higashi T. et al. 2017).

El incremento de fibras de colágeno se encuentra directamente relacionado con la progresión del daño hepático, el mecanismo de la síntesis de colágeno fibrilar se debe a la citocina TFG- β 1. El TFG- β 1 es una citocina profibrótica que activa a las CHE que además de migrar producen cambios en los componentes de la MEC sustituyendo el colágeno IV, proteoglicanos de heparán sulfato y laminina por colágeno I y III responsables de la fibrosis y la cirrosis (Higashi T. et al. 2017). La disminución de fibras de colágeno obtenidas con el EE de *S. fluitans* a dosis de 50 mg/kg muestra evidencia que sugiere una probable inhibición de citocinas proinflamatorias, y por consiguiente un decremento de la activación de CHE responsables de la síntesis de colágeno fibrilar. Los cambios histológicos obtenidos en este estudio muestran evidencia concreta del efecto hepatoprotector del EE de *S. fluitans*.

Existen varios mecanismos involucrados en el efecto hepatoprotector de compuestos antioxidantes, uno de ellos es activación de genes relacionados con el estrés oxidante como el Nrf2 que propicia la protección del daño celular. Estudios recientes han demostrado que los compuestos aislados en extractos provenientes de las macroalgas cafés poseen la capacidad de incrementar la transcripción antioxidante del factor Nrf2. Liu Xue et al. 2017, evaluaron la Laminarina un compuesto proveniente de macroalgas cafés en un ensayo *in vitro* utilizando células de fibroblastos de pulmón (MRC-5) a las cuales se les indujo daño con H_2O_2 . Las células fueron tratadas con concentraciones entre 0-5 mg/mL de Laminarina durante 24 h, posteriormente se determinó por PCR en tiempo real (qPCR)

y Western Blot la expresión de Nrf2 y Keap 1, también se midieron las concentraciones de antioxidantes endógenos como SOD, GSH y CAT. Los resultados indicaron que la Laminarina evitó la muerte celular por daño oxidativo, incrementó la expresión de Nrf2 y la concentración de antioxidantes endógenos antes mencionados.

En 2011 Ling C. y col. reportaron el efecto antioxidante de la Fucoxantina el mayor carotenoide proveniente de algas cafés. El efecto antioxidante fue determinado a partir del tratamiento entre 0.5-20 μM de Fucoxantina sobre células embrionarias hepáticas murinas BNL CL.2 (BCRC 60180). El experimento se llevó a cabo durante una incubación con Fucoxantina de 1, 3, 6 y 12 horas, posteriormente las células fueron sometidas a daño con H_2O_2 durante 30 min. Los resultados arrojaron que a concentración de 5 μM de Fucoxantina las células expresaron una mayor cantidad de Nrf2 la cual fue determinada a partir de técnicas de Western Blot y PCR transcriptasa inversa. Los resultados obtenidos con la Fucoxantina, llevó a Ling C. y col. a proponer un posible mecanismo de acción a nivel celular. La propuesta planteada se basó en la activación del gen ARE a partir del Nrf2, donde se pensó que esta activación se llevó a cabo mediante un mecanismo efectuado por la Fucoxantina a través de la modificación de residuos de cisteína de Keap1. Esta modificación permitía el cambio conformacional y la disociación de Nrf2 que permanecía unida a Keap1 en el citosol de las células y que la mantenía inactiva. El Nrf2 al estar libre en el citosol sufría una traslocación hacia al núcleo donde se unía al gen ARE. La unión de Nrf2 y ARE activan señales antioxidantes que inducen la expresión de enzimas citoprotectoras como Hemo oxigena 1 (HO-1) y NAD(P)H Quinona deshidrogenasa 1 (NQO1), evitando el daño celular. Este mecanismo es de interés ya que probablemente puede ser el responsable del efecto antioxidante y hepatoprotector observado con el EE de *S. fluitans*.

Los datos obtenidos sobre el efecto antioxidante y hepatoprotector del EE de *S. fluitans* son prometedores para la determinación del mecanismo responsable de dichas actividades y el desarrollo a futuro de un posible fitomedicamento que ayude a pacientes con la protección de células hepáticas que son susceptibles de daños durante la administración de medicamentos a largo plazo.

Capítulo 9. Conclusiones

- El EE de *S. fluitans* tiene propiedades antioxidantes, ya que posee la capacidad de captar radicales DPPH a una CE₅₀ de 3.61 mg/mL, de reducir el Fe (III) a Fe (II) a una CE₅₀ de 1.05 mg/mL y quelante de Cu (II) a una CE₅₀ de 6.79 mg/mL, siendo uno de los primeros reportes de actividad antioxidante obtenida con esta especie.
- El EE es inocuo a dosis $\leq 5\text{g/kg}$, ya que no se observó toxicidad aguda en los animales evaluados, convirtiéndola en una sustancia segura de ser consumida a dosis iguales o menores a la evaluada en este estudio.
- En el modelo de daño hepático inducido por CCl₄, el EE de *S. fluitans* mostró un efecto hepatoprotector debido a que:
 - 1.- No mostró un incremento significativo ($p<0.05$) sobre el tiempo de latencia y la duración de sueño en comparación con el grupo de daño con CCl₄.
 - 2.- No incrementó significativamente ($p<0.05$) las enzimas de daño hepático AST, ALT y FA.
 - 3.- No mostró un decremento promedio del número de hepatocitos por muerte celular, tampoco un incremento de células infiltradas como respuesta al daño y mostró un menor porcentaje de fibras de colágeno, siendo estos parámetros significativamente diferentes ($p<0.05$) al grupo de daño con CCl₄.

Capítulo 10. Perspectivas

De acuerdo a los resultados obtenidos de actividad antioxidante y hepatoprotectora con una dosis del EE de *S. fluitans* de 50 mg/kg, se sugiere continuar con estudios complementarios como:

- Determinar la expresión de proteínas en tejido hepático relacionadas con la protección y/o daño hepático.
- Evaluación de la expresión de genes relacionados con estrés oxidativo mediante el uso de técnicas de Biología molecular.
- Aislar y purificar los compuestos presentes en el EE y determinar el compuesto presente en mayor cantidad.
- Determinar el mecanismo biológico del efecto antioxidante y hepatoprotector.

Bibliografía

1. Adewusi E. y Afolayan A. (2010). A review of natural product with hepatoprotective activity. *J. Med. Plant Res.* 4(13):1318-1334.
2. Baialardo A. (2015). Síndrome cardio-hepático ¿Qué dedemos saber cómo cardiólogos? *Insuf. Card.* 10 (2): 66-77.
3. Beckman KB, Ames BN. (1998). The free radical theory of ageing matures. *Physiol. Reviews.* 78: 547-581.
4. Bijak M. (2017). Silibin, a mayor bioactive component of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt)- chemistry, bioavailability, and metabolism. *Molecules* 10, 22 1942.
5. Botham P. (2004). Acute systemic toxicity, prospect for tiered testing strategies. *Toxicology in vitro.* 18, 227-230.
6. Brandon W. Sugg J., Schrum L. (2010). Silibinin inhibits ethanol dependent cell proliferations in vitro modelo of hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters,* 291:120-129.
7. Caamal-Fuentes E., Moo-Puc R., Freile-Pelegriñ Y., Robledo D. (2014). Cytotoxic and antiproliferative constituents from *Dyctiota ciliolata*, *Padina sanctae-crucis* and *Turbinaria tricostata*. *Pharmaceutical Biology.* DOI 10.3109/13880209.2014.8862273.
8. Cachon A., Quintal C., Medina G., Castro G., Moo R. (2016). Hepatoprotective effect of low doses of caffeine on CCl4 induced liver damage in rats. *J Diet Suppl.* 14 (2):158-172.
9. Casas-Grajales S., Muriel P. (2015). Antioxidant in liver health. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 6(3): 59-72.
10. Celis C., Rincón J., Guerrero M. (2007). Actividad farmacológica sobre el sistema nervioso central del extracto etanólico y de la fracción alcaloidal de *Valeriana pavonii*. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.* 36 (1), 11-22.
11. Chale-Dzul J., Moo-Puc R., Robledo D., Freile-Pelegriñ, Y. (2014). Hepatoprotective effect of the fucoidan from the Brown seaweed *Turbinaria tricostata*. *Journal Applied Phycology.* DOI10.1007/s10811-014-0429-9.

12. Chandini S., Ganesan P., Bhaskar N. (2008). In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. *Food Chemistry*. 107, 707-713.
13. Charles D. (2013). Antioxidant properties of Spices Herbs and Other Sources. *Springer Science*. DOI 10.1007/978-1-4614-4310-0.
14. Claria J., Horrillo R., Martinez-Clemente M., Morán M. (2008). Mecanismos básicos de lesión hepatocelular. Papel de los mediadores lipídicos de inflamación. *Gastroenterol Hepatol*. 36 (10) 682-92.
15. Claria J., Titos E. (2004). La célula de Kupffer. *Gastroenterología y Hepatología*. 27 (4): 264-273.
16. Colica C., Boccuto L., Abenavoli L. (2017). Silymarin: an option to treat non-alcoholic fatty liver disease. *World Gastroenterol* 21, 23 (47): 8437-8438.
17. Diaz-Martin M., Espinosa A. (2000). Distribution of Brown seaweeds (Phaeophyta) in the Yucatan Peninsula Mexico. *B. Mar Sci* 66: 279-289.
18. Dominguez M., Colmenero J., Bataller R. (2009). Tratamiento de la fibrosis hepática, *Gastroenterología y Hepatología*. 32 (9):627-632.
19. Echavarría B., Franco A., Martínez A. (2009). Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del caribe colombiano. *Rev Fac Quím. Colombia*. 16 (1): 126-131.
20. El Gamal A. (2010). Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal* 18, 1-25.
21. El Nahas A., Allam A., Abdelmonsif D., El Kamel A. (2017). Silymarin-Loaded Eudragit Nanoparticles: Formulation, Characterization, and Hepatoprotective and Toxicity Evaluation. *Pharm Sci Tech*. DOI: 10.1208/s12249-017-0799-9.
22. El-gazayerly O., Makhlof A., Soel A., Mohmoud M. (2014). Antioxidant and hepatoprotective effects of silymarin phytosomes compared to milk thistle extract in CCl4 induced hepatotoxicity in rats. *J. Microencapsul*. 31(1) 23-30.
23. Fang, Y-Z.; Yang, S, y Wu G. (2002). Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*. 18: 872-879.
24. Favari L., Arce-Diaz C., Ortiz-Martínez J. (2013). Efecto hepatoprotector y antioxidante de *Traxacum officinale* en el daño hepático agudo inducido por tetracloruro de carbono en la rata. *Rev. Mex. Cienc. Farm*. 44 (4) 53-61.

25. Foyer CH, Halliwell B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase: aproposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21–25.
26. Freitas A., Rodriguez D. Rocha- Santos T. Duarte A. (2012). Marine biotechnology advances toward applications in new funtional food. *Biotechnol Adv* 30:1506-1515.
27. Friedman S. (2010). Envolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat. Ver. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 425-436.
28. Garateix, A. (2005). El mar: fuente de nuevos fármacos. *Elementos* 58, 39-47.
29. García L., Gálvez J., Armendáriz J. (2007). Blancos terapéuticos para revertir la cirrhosis hepática. *Rev. Med. Chile.* 135:783-791.
30. García L., González M., Otero M. (2012). Cirrosis hepática. *Medicine* 11:11625-33.
31. Ghosh N., Ghosh R., Mandal V., Mandal S. (2011). Recent advances in herbal medicine for treatment of liver diseases. *Pharmaceutical Biology.* 49 (9): 970-988.
32. GómezAyala Adela-Emilia (2012). Cirrosis hepática. *Farmacia Profesional* 26:45-51.
33. Halliwell B, Whiteman M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 142:231-255.
34. Higashi T., Friedman S., Hoshida Y. (2017). Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* DOI: i:10.1016/j.addr.2017.05.007.
35. Hira K., Sultana V., Ara J. y Haque E. (2017). Protective role of Sargassum species in liver and kidney dysfunctions and associated disorders in rat intoxicated with carbon tetrachloride and acetaminophen. *Pak. J. Pharm. Sci.* 30(3):721-728.
36. Hira K., Sultana V., Ara J., Haque E. y Athar M. (2016). Hepatoprotective potential of three Sargassum species of Korachi coast against carbon tetrachloride and acetaminophen intoxication. *Journal of Coastal Life Medicine.* 4(1):10-13.
37. Hwang P., Wu C., Gau S., Chien S., Hwang D. (2010). Antioxidant and immune-stimulating activities of hot-water extract from seaweed Sargassum hemiphyllum. *J Mar Sci Technol* 18:41-6.

38. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI 2018). <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=23587> (consultado mayo 2018)
39. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI 2016) Base de datos. Porcentaje de defunciones de 30 a 64 años por sexo y principales causas. <http://www.inegi.gob.mx> (consultado en marzo 2018).
40. Ishibashi H, Nacamura M. (2009). Liver architecture, cell function, and disease. *Semin immunopathol* 31:399-409.
41. Kang J., Khan M., Park N. (2008). Antipyretic, analgesic, and anti-inflammatory activities of the seaweed *Sargassum filvellum* and *Sargassum thumbergii* in mice. *Journal of ethnopharmacology* 116, 187-190.
42. Khan H., Viqar S., Jehan A., Syed E., Mohammad A. (2016). Hepatoprotective potential of three *Sargassum* species from Karachi coast against carbon tetrachloride and acetaminophen intoxication. *Journal of Coastal Life Medicine*. 4(1):10-13.
43. Konigsberg M. (2007). Nrf2: La Historia de un Nuevo Factor de Transcripción que Responde a Estrés Oxidativo. *REB* 26(1):18-25.
44. Kuda T., Tsunekawa M., Goto H., Araki Y. (2005). Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula Japan. *Journal of Food Composition and Analysis*. 18, 625-623.
45. Le Lann, Jégou C., Stiger V. (2008). Effect of different conditioning treatments on total phenolic content and antioxidant activities in two Sargassacean species: Comparison of the frondose *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and the cylindrical *Bifurcaria bifurcata* R. Ross. *Phycological Research*. 56: 238-245.
46. Lee EU, Friedman S. (2011) Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 25:195-206.
47. Lee, J.; Koo, N. Min DB (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3:21-33.

48. Leon-Deniz LV, Dumontiel, Moo-Puc R., Freile- Pelegrin Y. (2009). Antitrypanosomal in vitro activity of tropical marine algae extracts. *Pharm Biol* 47: 864-871.
49. Liu C., Chiu Y., Hu M. (2011). Fucoxanthin Enhances HO-1 and NQO1 Expression in Murine Hepatic BNL CL.2 Cells through Activation of the Nrf2/ARE System Partially by Its Pro-oxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* 59, 11344–11351.
50. Liu X., Liu H., Zhai Y. (2017). Laminarin protects against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in MRC-5 cells possibly via regulation Nrf2. *Peer J.* DOI: 10.7717/peerj.3642.
51. Maddrey W. (2005). Drug induced hepatotoxicity. *Journal of Clinical Gastroenterology* 39 (4 suppl 2): 83-89.
52. Margáin A. Macías R., Ríos S. (2017). Efecto de la dieta rica en proteínas y alta en fibra más la suplementación con aminoácidos de cadena ramificada sobre el estado nutricional de pacientes con cirrosis. *Rev. Gastroenterol. Mex.* 391-997.
53. Matsumoto S., Kikuta J., Ishii M (2018). Intravital Imaging of Liver Cell Dynamics. *Methods Mol. Biol.*1763: 137-143.
54. Mesejo A., Juan M., Serrano M. (2008) Cirrosis y encefalopatía hepáticas: consecuencias clínico-metabólicas y soporte nutricional. *Nutrición hospitalaria* 23: 25-30.
55. Moreira A., Gonzalo A. (2013). Inusual arribazón de *Sargassum fluitans* (Borgesen) Borgesen en la costa centro-sur de Cuba. *Rev. Invest. Mar* 33(2): 17-21.
56. Mulloy, B., Mourão P.A.S., Gray E. (2000) Structure/function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. *Journal of Biotechnology* 77, 123–135.
57. Muriel P. y Mourelle M. (1990). The role of membrane composition in ATPase activities of cirrhotic rat liver: Effect of Silymarin. *Journal of applied toxicology* 10(4) 281-284.
58. Mutalip M., Rahim A., Mh R. (2018). Vitamin E as an antioxidant in female reproductive health. *Antioxidants* 26, 7 (2). DOI: 10.3390/antiox7020022.

59. Nanji A., Jokelainen K., Tipoe G. (2001). Dietary saturated fatty acids reverse inflammatory y fibrotic changes in rat liver despite continued ethanoladministration. *JPET* 299:638-644.
60. National Research Council, U. S. A. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NationalAcademic Press, Washington, D. C. 1996.
61. Negi A, Kumar J, Luqman S, Shanker K, Gupta M, Khanuja S. (2008). Recent advances in plant hepatoprotectives: a chemical and biological profile of some important leads. *Med Res Rev.*28:746–72.
62. Noctor G, Foyer CH. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 249-2.
63. OECD, Guidline for testing of chemicals. Acute oral Toxicity –Fixe Dose procedure.
https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl420.pdf
 (consultado en Mayo 2018)
64. Oh S., Joung E., Kwon M., Lee B. (2016). Anti-Inflammatory Effect of Sargassum serratifolium in Lipopolysaccharide-Stimulated BV2 microglial Cells. *J Med Food.* 19 (11) 1023-1031.
65. Ordoñez A., Gómes J., Vattuone M. Isla M. (2006). Antioxidant activities of *Sechium edule* Swart stractz. *Food chemistry.* 97 452-457.
66. Organización Mundial de la Salud. Global status report on alcohol and health 2014.http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112736/1/9789240692763_eng.pdf
 y
http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/msbgsruprofiles.pdf?ua=1 2014 (consultado en mayo 2018)
67. Pinteus S, Silva J., Alves C., Horta A., Thomas O., Pedrosa R. (2017). Antioxidant and Cytoprotective Activities of Focus Spiralis Seawedon a Human Cellin vitro Model. *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2) 292.
68. Pomin V.H., Pereira M.S., Valente A.P., Tollefsen D.M., Pavão M.S.G., Mourão P.A.S. (2005). Selective cleavage and anticoagulant activity of a sulfated fucan: stereospecific removal of a 2-sulfate ester from the polysaccharide by mild acid

- hydrolysis, preparation of oligosaccharides, and heparin cofactor II-dependent anticoagulant activity. *Glycobiology* 15, 369–338.
69. Pourmorand F., Hosseinimehr S., Shahabimajd N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid content of some select Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* 5(11) 1142-1145.
70. Quiroz M., Flores Y., Aracena B., Perez R. (2010). Estimating the cost of treating patients with liver cirrhosis at the Mexican Social Security Institute. *Salud Pública de México* 52 (6) 493-501.
71. Raghavendran H., Shativel A., Devaki T. (2004). Hepatoprotective nature of seaweed alcoholic extract on acetaminophen induced hepatic oxidative stress. *Journal of health science* 50 (1) 42-46.
72. Rahman A., Choudhary M., Thonsen W. *Bioassay Techniques for Drug Development*; Harwood Academic Publishers, USA, 2001; pp 28-29.
73. Raj P, Nitesh K., Prateek J., Sankhe M., (2011). Effect of lecithin on D-galactosamine induced hepatotoxicity through mitochondrial pathway involving BCL2 and Bax. *Indian J. clin Biochem.* 26 (4) 378-384.
74. Reitman S. y Frankel S. (1957). A colometric method for the determination of serum Glutamic Oxalacetic, and Glutamic pyruvic Transaminases. *Am J Clin Pathol* 28 (1): 56-63.
75. Rout S., Kumar A. (2015). A review on the potentiality of marine seaweeds as a medicinal source. *SJIF* 4 (10): 458-476.
76. Salmi H y Sarna S. (1982). Effect of silymarin on chemical, functional and morphological alterations of the liver. A double-blind controlled study. *Scand J Gastroenterol* 17(4): 517-521.
77. Saritas A., Kandis H., Baltaci D., Yildirim U., Kaya H. (2014). N-Acetyl cysteine and erdosteine treatment in acetaminophen- induced liver damage. *Toxicology and Industrial health.* 30 (7): 670-678.
78. Secretaría de Salud de Yucatán (SSY). Principales causas de muerte hospitalaria. <http://salud.yucatan.gob.mx/> (consultado en marzo 2018).
79. Seo Y., Park K.E., Nam T.J. (2007). Isolation of a new chromene from the brown alga *Sargassum thumbergii*. *Koream Chem. Soc.* 28: 1831-1833.

80. Seo Y., Park K.E., Kim Y., Lee H., Yoo I., Ahn I., Lee B. (2006). Isolation of tetraprenyltoluquinols from the brown alga *Sargassum thumbergii*. *Chem.Pharm. Bull.* 54: 1730- 1733.
81. Shen Z., Wang Y., Su Z., Kou R., Xie K., Song F. (2018). Activation of p62-Keap1-Nrf2 antioxidant pathway in the early stage of acetaminophen induced acute liver injury in mice. *Chemico-Biological Interactions*. DOI: 10.1016/j.cbi.2018.01.008.
82. Stokes W. (2002). Humane Endpoints for Laboratory Animals Used in Regulatory Testing. *ILAR Journal* .43 (suppl 1): s31-s38.
83. Surai P. (2015). Silymarin as a natural antioxidant: an overview of the current evidence and perspectives. *Antioxidant (Basel)* 20; 4 (1): 204-47.
84. Tierney M., Smyth T., Hayes M., Vila A., Croft A., Brunton N. (2013). Influence of pressurised liquid extraction and solid-liquid extraction methods on the phenolic content and antioxidant activities of Irish macroalga. *IJFST*. 48: 860-869.
85. Tillán-Capó J., Bueno Pavón V., Carrillo Domínguez C (2009), Actividad hepatoprotectora del extracto acuoso seco *Boerhavia erecta* L. (tostón) en ratas. *Rev. Cubana Plant. Med.* 14(3) 29-36.
86. Toshimoto K., Tomoda Y., Chiba K., Sugiyama Y. (2017). Analysis of the change in the blood concentration-time profile caused by complex drug-drug interactions in the liver, considering the enterohepatic circulation: Examining whether the inhibition constants for uptake, metabolism, and biliary excretion can be recovered by the analyses using physiologically based pharmacokinetic modeling. *J. Pharm Sci.* DOI:10.1016/j.xphs.2017.04.057.
87. Touyz R. (2006). Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance?. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 16(3):222-33.
88. Tsai J., Liu J., Wu T., Huang C. (2008). Effects of silymarin on the resolution of liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *J. Viral Hep.* 15:508-514.
89. Tsubokura Y., Kobayashi T., Oshima Y. (2016). Effects of pentobarbital, isoflurane, ormedetomidinamidazolam-butorphanol anesthesia on bronchoalveolar lavage fluid and blood chemistry in rats. *J. Toxicol. Sci.* 41(5): 595-604.

90. Tsukamoto H., Gaal K., French S. (1990). Insight into the pathogenesis of alcoholic liver necrosis and fibrosis. *Status report. Hepatology*. 12:599-608.
91. Tsukamoto H., Towner S., Ciofalo L., French S. (1986). Ethanol induced liver fibrosis in rats fed high fat diet. *Hepatology*. 6 (5) 814-822.
92. Tsukamoto T, Hattori M, Sakabe M, Haginaka J. (2001). Determination of the molecular mass of new L-fucose- containing glycosaminoglycan and its distribution by high-performance gel-permeation chromatography with laser light-scattering detection. *Anal Sci*. 17, 555-558.
93. Van den Heuvel M., Dayan A., Shillaker R. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. *Hum Toxicol*. 6 (4) 279-91.
94. Vazquez R., Aposto J, Ramos J, Morale M. (2012). Hepatoprotective affect of aqueus sulfated polysacaride extract from *Sargassum siliquosum* J. Agardh on paracetamol-induced oxidative liver toxicity and antioxidant properties. *IJPF* 2. 15-17.
95. Wade C., Van Rij A. (1988). Plasma thiobarbituric acid reactivity: Reaction conditions and the role of iron, antioxidants and lipid peroxy radicals on the quantitation of plasma lipid peroxides. *Life Sci* 43, 1085-93.
96. Williams R. (1974). Interspecies variations in the metabolism of xenobiotics. *Biochem. Soc. Trans.* 2. 359-370.
97. Woo J., Woo T., Kang J., Hong J., Oh K. (2017). Potentiation of decursin on pentobarbital-induced sleeping behaviors via the activation of GABA_A-ergic systems in rodents. *Korean J Physiol Pharmacol*. 21(1):27-36.
98. Xi Y., Shu J., You T., Dong Y., Xin Y. (2005). Efficacy of Chinese medicine Yigan-kang granule in prophylaxis and treatment of liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol*. 11(17), 2583-2590.
99. Yu L. (2001). Free radical scavenging properties of conjugated linoleic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (7) 3452-3456.
100. Zang C, Wu W, Wang J. (2012) Antioxidant properties of polysaccharide brown seaweed *Sargassum graminifolium*, and its effect on calcium oxalate crystallization. *Mar Drugs* 10: 119-130.

101. Zhang W., Hong R. Tian T. (2013). Silymarin's protective effects and possible mechanisms on alcoholic fatty liver for rats. *Biomol Ther.* 21(4) 264-269.
102. Zhou W., Zhang Q., Qiao L. (2014). Pathogenesis of liver cirrosis. *World Journal of Gastroenterology* 20 (23): 7312-7324.
103. Zubia M., Robledo D., Freile-pelegrin Y. (2007). Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatán Península, México. *Journal of Applied Phycology* 19: 449-458.