



Universidad Autónoma del Estado
de México



Facultad de Ciencias

“Caracterización del fémur de ratón CD-1
sometidos a estrés fisiológico y suplementado
con astaxantina”

Tesis

Para obtener el título de:

FÍSICO

Presenta:

MAX EDUARDO JUÁREZ RAMÓN

Directores de tesis:

DR. PORFIRIO D. ROSENDO FRANCISCO

DR. EUGENIO TORRES GARCIA

TOLUCA, MEXICO, ENERO, 2018.

Indice.

Resumen.....	6
Introduccion.....	7
Antecedentes.....	8
Hueso.....	8
Nivel macro- estructural.....	10
Nive micro- estructural.....	11
Nivel nano- estructural.....	13
Fase inorgánica (mineral).....	13
Fase organica.....	15
Proceso demineralización.....	17
Estrés.....	19
Radicales libres.....	21
Antioxidantes.....	22
Microdureza.....	25
Infrarrojo.....	30
Absorcion infrarroja.....	31
Modos vibracionales.....	32
Infrarrojo medio.....	34
Puente de hidrogeno.....	36
IR-FT en el hueso.....	37
Metodologia.....	39
Microdureza.....	42
Infrarrojo.....	44

Resultados y analisis de resultados.....	45
Microdureza.....	45
IR.....	50
Conclusiones.....	56
Bibliografía.....	57

1 Resumen.

El análisis sobre la influencia del estrés en el cuerpo humano ha estado tomando relevancia en los últimos 90 años, ya que estamos influenciados directamente a lo largo de nuestra vida y a cada hora del día, en este trabajo se caracteriza a nivel estructural y molecular la influencia del estrés fisiológico, así como la suplementación con astaxantina en el hueso cortical de ratones CD-1.

2 Introducción.

Las consecuencias que se generan por estar sometido a estrés fisiológico por periodos prolongado puede variar, dependiendo de factores individuales, por ejemplo, disposición biológica o física. Por lo tanto el estudio de la influencia del estrés es un espectro bastante grande englobando la repercusión en los diferentes sistemas del individuo como el suprarrenal, el neurológico y óseo.

El presente trabajo se centrará en el sistema óseo, ya que hay pocos estudios sobre la influencia del estrés en él, es de vital importancia el caracterizar las afectaciones a nivel molecular y estructural de este sistema, a si como también el uso de antioxidantes para retrasar el proceso oxidativo que se genera por estrés fisiológico, porque dentro de sus funciones del sistema oseo está la protección de órganos principales de golpes externos, al igual le proporciona movimiento al cuerpo y sostén mediante la incorporación de tejido muscular, a su vez los órganos como corazón, estómago e hígado se sostienen del tejido muscular.

El retraso del proceso oxidativo en los diferentes sistemas se logra con una implementación en la dieta de antioxidantes, dentro de estos destacan tres: vitaminas, compuestos fenólicos y los carotenoides, en este último encontramos inmerso la astaxantina un potente antioxidante.

El estudio de las afectaciones a nivel estructural en el hueso se llevará a cabo mediante la técnica de medición de microdureza, que consiste en hacer pequeñas indentaciones sobre el material para conocer su comportamiento mecánico mediante la utilización de una carga o fuerza, con ello se mide su capacidad de estabilidad-comportamiento-respuesta que es influenciada por la fuerza de sus enlaces atómicos y su naturaleza. El análisis mediante espectroscopia con infrarrojo (técnica que se utiliza para el análisis de un componente en mezclas con propiedades fisicoquímicas muy similares mediante las vibraciones de los átomos de sus moléculas), se puede medir de manera directa las repercusiones en la estabilidad del material (como las propiedades mecánicas), de igual forma se puede realizar el análisis de las diferentes moléculas del hueso que pueden ser modificadas por condiciones de estrés fisiológico y el uso de astaxantina. Con dicho análisis se tiene un mejor entendimiento de los cambios principales de la estructura ósea al ser influenciadas bajo estos parámetros.

3 Antecedentes.

3.1 Hueso.

El hueso es tejido conjuntivo especializado, cuyas propiedades físicas, permite que pueda ser analizado a diferentes escalas dependiendo de necesidades y funciones específicas [1,2] (figura 1a). Para trabajar con este tipo de sistema se tiene que delimitar el área a analizar, puesto que cambia totalmente sus propiedades físicas como forma, tamaño y estructura en cada una de las escalas.

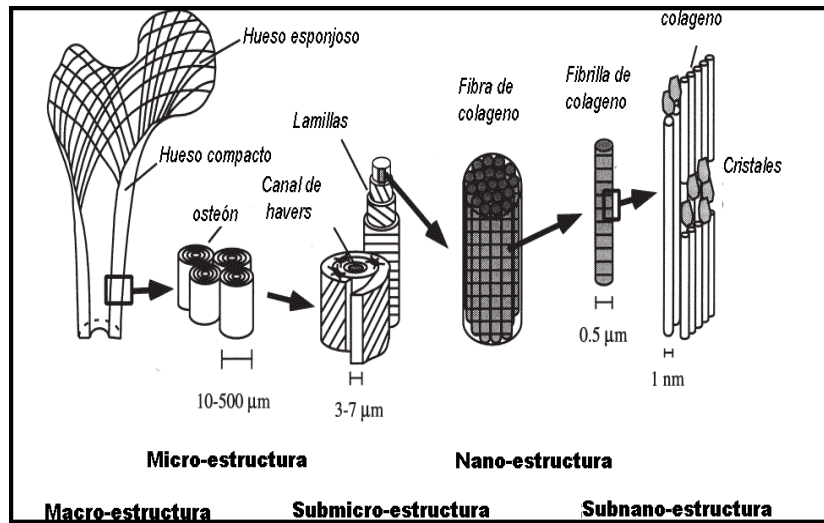


Figura 1a. Organización jerárquica estructural del hueso: Macro estructural; hueso cortical y esponjoso, Micro estructural; osteones con sistemas Haversianos, Submicro estructural laminillas; Nano estructural; Conjuntos de fibras de fibrillas de colágeno; (Subnanoestructural) cristales minerales óseos, moléculas de colágeno y proteínas no colágenosas [1].

La característica que distingue el tejido óseo de otros tejidos conjuntivos es la mineralización de su matriz, que produce un tejido muy duro capaz de proporcionar sostén y protección.

La ubicación de los tejidos óseos compacto y esponjoso varía de acuerdo con la forma del hueso, estos se encuentran en partes específicas de los huesos, entonces es útil, describir brevemente las clases de huesos [71]. Según su forma, los huesos se pueden clasificar en cuatro grupos:

- Huesos planos, que son delgados y anchos (p. ej., los huesos del calvario (calota craneal) y el esternón). Están formados por dos capas relativamente gruesas de tejido óseo compacto con una capa intermedia de tejido óseo esponjoso.

- Huesos irregulares, que poseen una forma que no permite clasificarlos dentro de ninguno de los tres grupos anteriores; la forma puede ser compleja (p. ej., vértebra) o el hueso puede contener espacios aéreos o senos (p. ej., etmoides).
- Huesos cortos, que tienen sus tres dimensiones casi iguales (p. ej., los huesos carpianos de la mano).
- Huesos largos, que tienen una longitud mayor que las otras dos dimensiones y consisten en una diáfisis y dos epífisis (p. ej., fémur, tibia y los metacarpianos).

Los huesos largos tienen un cuerpo (figura 1b), llamado diáfisis y dos extremos expandidos que reciben el nombre de epífisis. La superficie articular de la epífisis está cubierta de cartílago hialino. La porción dilatada del hueso entre la diáfisis y la epífisis se denomina metáfisis, además, la diáfisis se extiende hasta la línea epifisaria y una gran cavidad ocupada por la médula ósea, llamada cavidad medular, forma la parte interna del hueso, en ésta, casi todo el espesor del tejido óseo es compacto; a lo sumo, sólo una pequeña cantidad de hueso esponjoso rodea la cavidad. En las epífisis sucede lo contrario. Allí, el hueso esponjoso es abundante y el hueso compacto apenas forma una delgada cubierta externa [71].

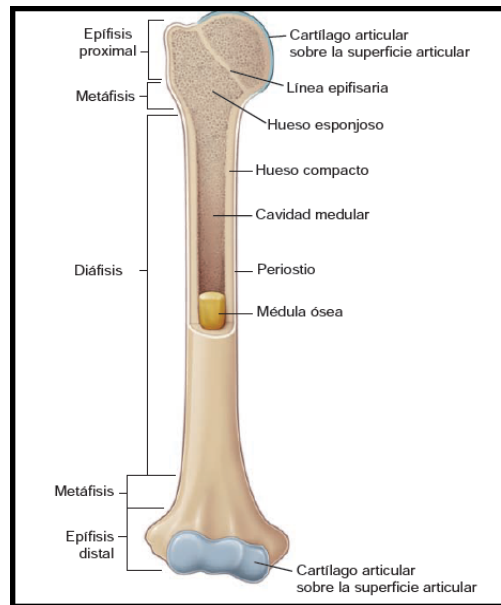


Figura 1b. Estructura típica de un hueso largo [71].

3.1.1 Nivel macro-estructural.

El hueso esponjoso (calloso) y cortical (compacto) a este nivel (cm) puede diferenciarse, con magnitudes variantes que depende de cada ser vivo y tipo de hueso, por ejemplo un hueso largo como el fémur de ser humano tiene una parte densa-compacta en el exterior con una capa interior porosa-esponjosa [2,7]. Los huesos planos como las vertebras presenta una estructura en sándwich (capas densas corticales afuera y una delgada estructura esponjosa de refuerzo dentro). Aunque ambos tipos de hueso contienen una parte cortical y esponjosa con un grado de porosidad o densidad [2, 3,4] (Figura 2).

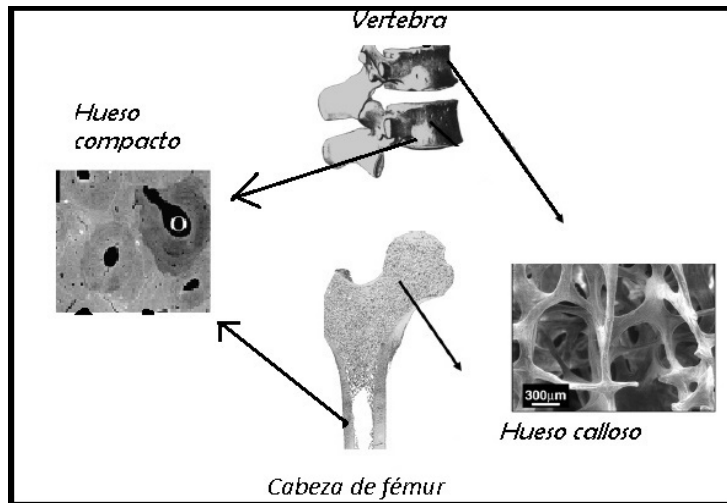


Figura 2. Jerarquía de diferentes tipos (fémur y vertebra) de hueso del ser humano a nivel macro- estructural, en donde se muestra la estructura de hueso cortical y esponjoso. Imágenes SEM [2].

En general, el material del hueso esponjoso (trabecular) es mucho más activo metabólicamente que el hueso cortical, y por lo tanto es en promedio es "más joven" teniendo una biomecánica diferente [2,28](figura 3).

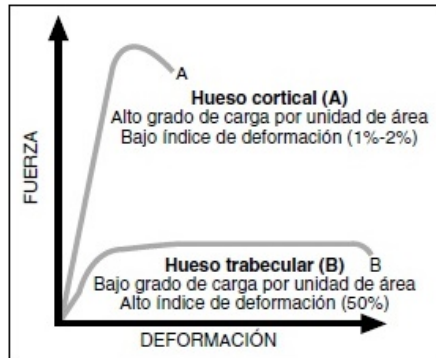


Figura 3. Comparación biomecánica del hueso trabecular y cortical [28].

Por lo tanto, aunque el hueso esponjoso y cortical puede ser del mismo tipo de material, la maduración del material óseo cortical puede alterar las propiedades mecánicas a nivel micro-estructural [2].

3.1.2 Nivel micro estructural.

Al pasar al nivel micro estructural el hueso cortical contiene una conformación muy distinta al esponjoso (figura 4). El cual está formado por diferentes estructuras como por periostio, fibras de sharpe y tipos de laminillas [7,8].

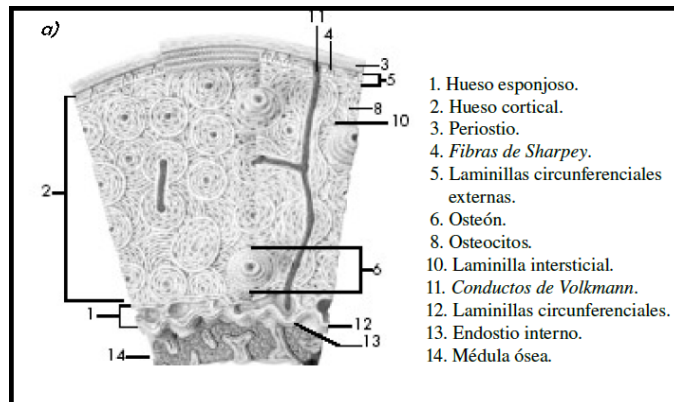


Figura 4a. Esquema de hueso cortical, sección transversal [5].

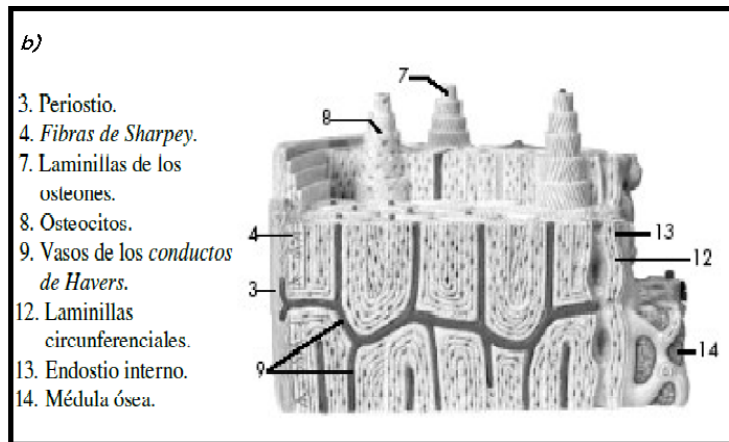


Figura 4b. Esquema de hueso cortical, corte lateral [5].

Las laminillas (lamelas) de fibras de colágeno con un ancho de diámetro de $3-7 \mu\text{m}$, se agrupan en capas concéntricas (3-8 lamelas) alrededor de un canal para formar la unidad básica que se conoce como osteón. El osteón parece un cilindro de unos $200-300 \mu\text{m}$ de diámetro y $3-5 \mu\text{m}$ de largo casi paralela [2,5] a lo largo del eje del hueso y se le considera como la unidad básica del hueso cortical [2] (figura 5).

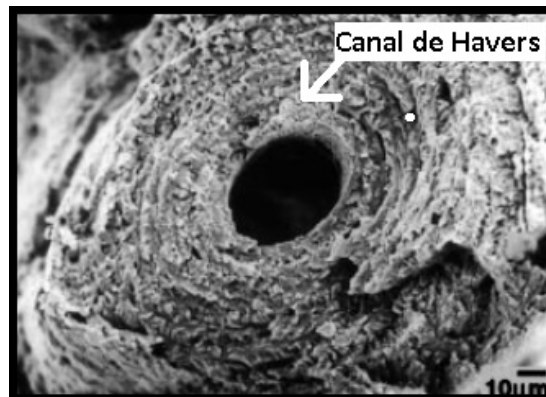


Figura 5. SEM de un osteón del fémur de un humano [14].

Cada osteón tiene un sistema vascular central llamado Canal de Havers con diámetro del orden de $50 \mu\text{m}$, dentro del canal están algunos nervios y el transporte de sangre, linfa para la mineralización se hace por el interior del

canal, teniendo un módulo elástico es de 12 –5.5 GPa de tensión y resistencia de 120 y 102 MPa [1,6].

Los canales deVolkman son de un diámetro de 5-10 μm y estos enlazana los canales haversianos por una red de vasos sanguíneos y linfáticos, tanto los canales de volkman y los canalículos tienden a situarse en planos perpendiculares a los canales de havers [5,6]. ayudando al remodelado y remineralización de hueso cortical.

3.1.3 Nivel nano estructural.

A escala nanométrica se puede visualizar la construcción básica del tejido óseo conformada de tres fases y/o pilares que son fase inorgánica, orgánica y líquida [9,14]. En peso, el hueso es aproximadamente 60% inorgánico Hidroxiapatita (HAP), 30% orgánico (colágeno) y 10% agua [9] (figura 6).

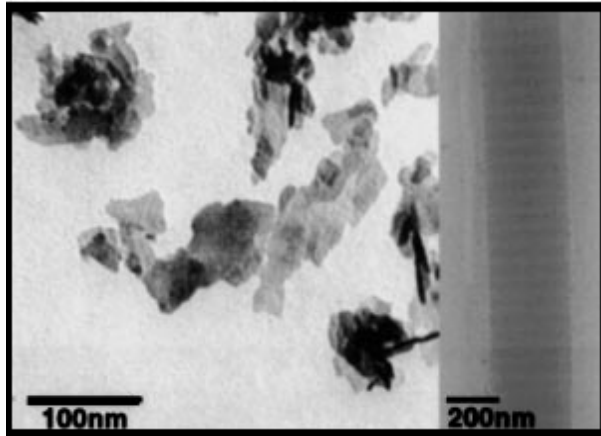


Figura 6. Cristales de hidroxiapatita (izquierdo).
Fibras de colágeno (derecho) observadas por TEM [15].

Fase inorgánica (mineral). La fase inorgánica del hueso consta de un mineral cerámico del tipo cristalino, más a menudo denominado hidroxiapatita (HAP) ; $\text{Ca}_{10} \text{PO}_4 \text{OH}_2$ [9,10] que es una forma impura de fosfato cálcico natural con una estructura de tetraedros de iones de PO_4 sostenidos por iones de Ca_{10} interceptados y una columna con iones de OH para equilibrarla.

La HAP ósea no es HAP pura porque los diminutos cristales de apatita forman placas de 2- 5 nm de espesor con 15 nm de ancho 20 a 50 nm de largo, dentro de estas hay impurezas tales como potasio, magnesio, estroncio y sodio en lugar de los iones calcio, carbonatos en lugar de los iones fosfatos y cloruros o fluoruros en lugar de los iones hidroxilo con un pH promedio de 4.2 [10].

Las propiedades de estas apatitas dependen fuertemente de la cristalinidad, composición química y de su morfología cristalina [11], por ejemplo se ha demostrado que la hidroxiapatita carbonatada (CO3HAP) tiene mejor biocompatibilidad y propiedades osteoconducativa, utilizándose comúnmente para reparar tejidos dañados y enfermos [12,13]. Otra propiedad importante de la hidroxiapatita es su capacidad para unirse con alta afinidad a moléculas biológicas. Por ejemplo, hidroxiapatita se ha utilizado como una resina para purificación cromatográfica de proteínas y plásmidos de ADN [11], esta afinidad se debe a la superficie mineral que contiene los iones positivo Ca^{2+} y negativo PO_4^{3-} capaces de unirse electrostáticamente con moléculas biológicas básicas y ácidas, respectivamente.

La HAP es sensible a cambios de pH (morfología cristalina), temperaturas (cristalización) y a sustancias que promueven o inhiben el crecimiento de los cristales. La HAP presenta cambios morfológicos cuando es tratado a diferentes de pH (figura 7) mostrando que la HAP es un material químicamente activo.

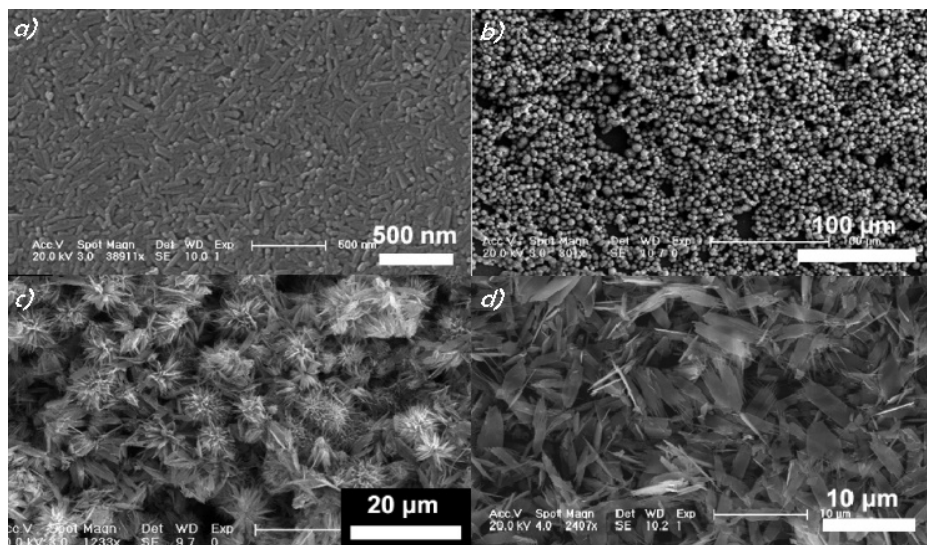


Figura 7. Imágenes SEM; a) nano-bastones pH 7.0; b) micro-esferas pH 5.0; c) micro-flores pH 4.5; d) micro-laminillas pH 4.0 [27].

El conocer como se reorganiza y estabiliza este mineral ayudara en conocer las propiedades mecánicas y físicas del hueso por ser un componente importante en la formación de este tejido, en su análisis con FT-IR para la micro esfera de ph 5 figura 8, indica la presencia de OH, H₂O, HPO₂⁴⁻, PO₃⁴⁻ y CO₂³⁻. Los picos en 3571 y 633 cm⁻¹ pertenecen a OH- ions, y el pico 879 cm⁻¹ es causado por los grupos HPO₂⁴⁻, el ancho de banda para 3416 cm⁻¹ es atribuida a las vibraciones del grupo O-H del H₂O que es absorbida [27].

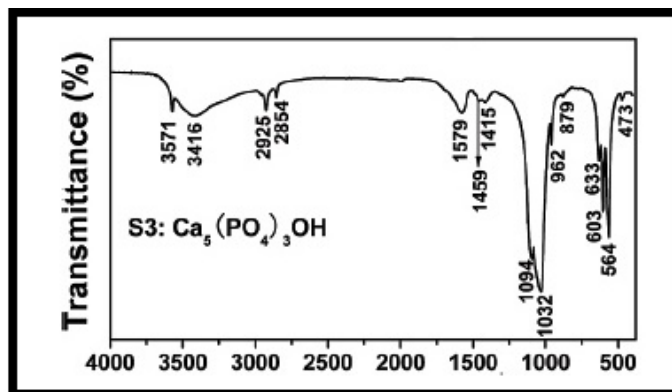


Figura 8. FT-IR, micro-esferas de $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$; pH 5.0 [27].

En picos 1459 y 1415 cm^{-1} es formado por los grupos CO_3^{2-} con la presencia de agua en ellos. Las bandas en el rango de $490\text{-}630\text{ cm}^{-1}$ ($564, 603\text{ cm}^{-1}$) pertenecen a las vibraciones de los enlaces de $(\text{PO}_4)^{-3}$. Las bandas ($900\text{-}1107\text{ cm}^{-1}$) en 1094 y 1032 cm^{-1} son adscritas a las vibraciones de los enlaces de los grupos PO_4 [22,32], la banda adicional en 2925 y 2854 cm^{-1} son de los grupos CH_2 , cadenas de surfactantes de materia orgánica ligada a las partículas de HAP.

Para moléculas orgánicas cortas como el pirofosfato y citrato inhiben el crecimiento de los cristales debido a que distorsionan la red cristalina, mientras que para moléculas largas como proteínas afectan directamente a los enlaces cuando los cristales crecen afectando no solo a las redes sino también las masa molar [29].

La forma de la red cristalina de las HAP varía por diferentes factores, las dos arreglos principales; monoclinica y hexagonal. La red monoclinica de HAP es más estable termodinámicamente que HAP hexagonal, la mayor diferencia entre estas dos, es la orientación de sus grupos hidroxilos. Mientras que la monoclinica tiene sus grupos hidroxilos en una sola dirección, la hexagonal los tiene distribuidos de manera que se le facilite su interacción con otras moléculas. Esto nos lleva a que los cristales de la monoclinica son más difíciles de disolver que la hexagonal y su crecimiento es más sistemático. La presencia de estas dos fases tiene un relevante impacto en el control de biomineralización y desmineralización.

Fase orgánica. La fase orgánica del hueso consiste principalmente en colágeno tipo I (90%) y otros tipos de colágeno menores (III y VI) al igual que una variedad de 200 proteínas no colagenosas (PsNC) como la osteocalcina, la osteonectina, la osteopontina y la sialoproteína que representan el 10% restante. La molécula de colágeno en el hueso tienen un diámetro aproximado de 1.5 nm y una longitud de 300 nm [15].

Las fibrillas de colágeno tienen un rango de 20 a 100 nm de diámetro, lo que sugiere que hay 200 a 800 moléculas de colágeno en una fibrilla [16]. Cada fibrilla está construida por tres cadenas de polipéptidos, formando una triple hélice con cerca de 1000 aminoácidos (Figura 9), ordenadas en paralelo entre sí de principio a fin con un hueco o "zona de orificio" entre cada fibrilla [17] (figura 10).

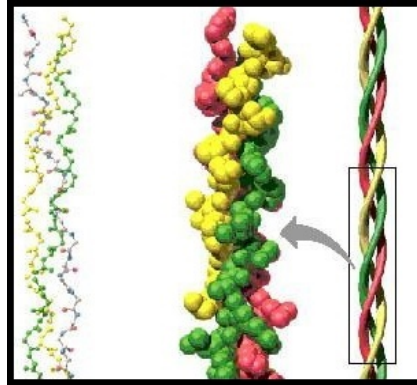


Figura 9. Molécula de colágeno[16].

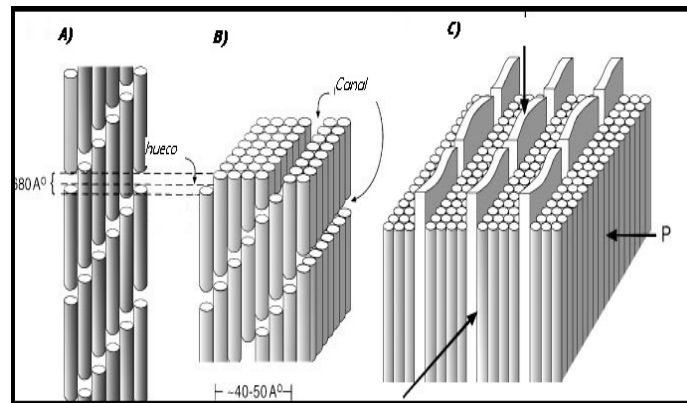


Figura 10. Ilustración (no a escala) ; A) trozos de fibrillas de colágeno superpuestas[17], B) conjunto de fibrillas de colágeno que asu vez forman canales[18], C) placas de cristales en los canales[19].

Las moléculas de colágeno suelen asociarse entre sus extremos, ello mediante enlaces (crosslinks) electrostáticos y/o covalentes (figura 11,) lo que nos lleva a un agrupamiento discontinuo entre las moléculas de colágeno en su eje longitudinal. Los enlaces que provienen de las fibrillas dan propiedades mecánicas como fuerza y visco-elasticidad, además se sabe que los crosslinks del colágeno son

concentraciones de grupos prostéticos, específicamente, residuos de peptidilo de lisina (Lys), hidroxilisina (Hyl) e histidina (His) [21].

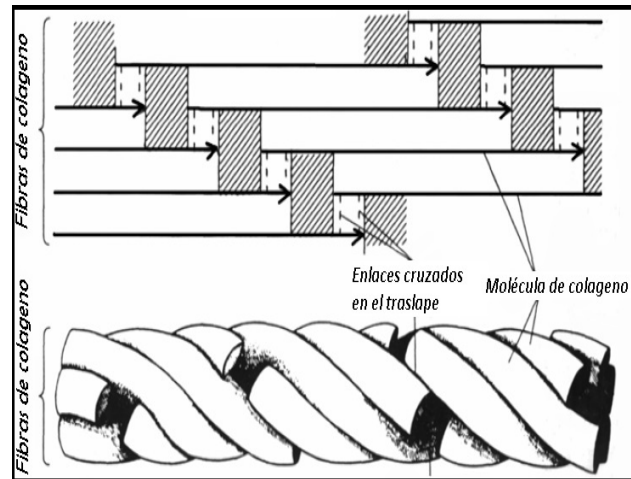


Figura 11. Esquema de enlaces cruzados en las fibras de colágeno [21].

Un factor importante dentro de las propiedades del colágeno es el grado de hidratación ya que le da propiedades visco-elásticas, influyendo en la desnaturalización y mineralización de la triple hélice de las fibrillas, por ejemplo presentan cambios de espacios entre fibrillas no mineralizadas húmedas de 1.55 nm a 1.1 nm mineralizadas húmedas. La cantidad de agua que se almacena en cada fibrilla de colágeno es de 48% de su volumen y en la zona de traslapes es el 35%. Las propiedades físicas del hueso, depende de dos aspectos muy importantes que son la cantidad de colágeno y la cantidad de minerales que está inmerso en el [21].

3.1.4 Proceso de mineralización.

La mineralización de tejido óseo ocurre de manera organizada ya que los minerales aparecen de forma específica en las regiones de huecos y traslapes de las fibras de colágeno, mineralizando esa zona, ocurriendo progresivamente la mineralización de la matriz principal, haciendo la aparición de cristales en toda la región de los huecos que posteriormente se solidificara en forma de fosfato de calcio convirtiéndose en HAP ósea, dando como resultado una fibrilla mineralizada [30], figura 12.

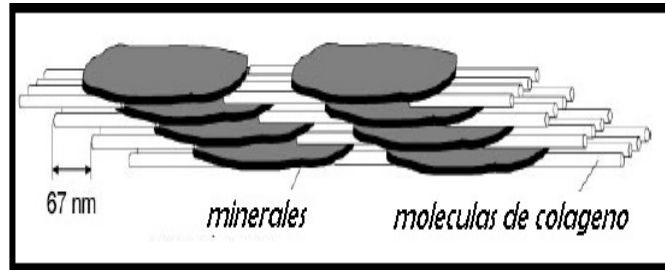


Figura 12. Minerales presentes entre el espacio intermolecular de las Fibras de colágeno [20].

Este grado de mineralización consta de dos fases: la primera llegara al 70% de su tope dentro los primeros 13 días y el segundo con el 30 % restante lo recabara al transcurso del tiempo [23,24].

Estas partículas (minerales) son muy pequeñas del orden de apenas unos cuantos nanómetros, tanto el arreglo y densidad de estas influye en las propiedades físicas del hueso [21] en los estudios mediante EDX o qBEI, los grados de asimilación de esta mineralización en el tejido óseo depende de la especie, con una variación entre 30 a 55 % o 50 a 74 % del volumen [21]. A pesar de que la cantidad de minerales no es homogénea y que esta función ayuda al remodelado de hueso (intercambio de tejido viejo por nuevo) el tejido óseo se mineraliza por paquetes dependiendo de la edad del tejido (figura 13) [22].

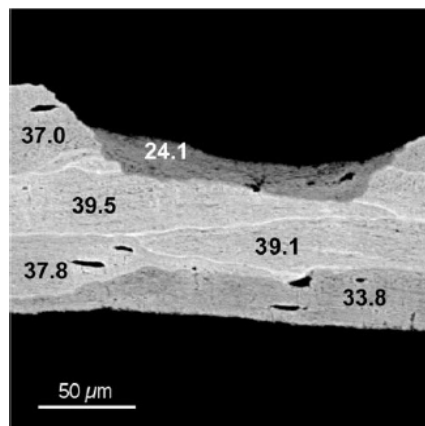


Fig.13.qBEI de hueso donde se muestra el número de minerales contenidos en porcentaje de volumen [22].

Otras moléculas como los biofosfanatos ayudan a incrementar el grado de mineralización de los diferentes paquetes tras un cambio brusco (fractura del hueso) de las moléculas mineralizadas. La densidad de distribución del hueso mineralizado (DDBM) es un método que reporta la edad y la forma de paquetes de moléculas mineralizadas independientemente de la edad, el género y tipo de hueso [25], cabe aclarar que estos cambios de mineralización ocurren in-vivo. El tamaños de estos paquetes de mineralización van de rangos de 2 a 7 nm, una longitud de 15 a 200 nm y un grosor de 10 a 80 nm, en forma de platos e incluso también se reportan en forma de agujas [25].

Debido a la forma en que se da el proceso de la mineralización, ésta le proporciona ciertas propiedades mecánicas al hueso que lo hace ser un sistema anisotrópico ya que estas dependen del grado de remodelación y mineralización. En estudios reportados[21, 28,29] concluyen que hay una relación entre el grado de mineralización con la rigidez y esta a su vez con la susceptibilidad a romperse. El método por el cual también se puede ver el grado de mineralización del tejido es mediante espectroscopia IF-IR.

El tejido oseo es formado por celulas que al ser alteradas mediante estumulos metabolicos como mala alimentación o estrés, propician el envejecimiento y muerte de estas.

3.2 Estrés.

Desde un punto de vista biomédico, el estrés es el mecanismo general del organismo para adaptarse a influencias, cambios, exigencias y tensiones a los que podría estar expuesto [31], también es llamado como conjunto de procesos causados por mantener la homeostasis [32], a esta adaptación se le atribuye el término de Síndrome General de Adaptación (SGA) que son respuestas fisiológicas estereotipadas del organismo que se produce ante un estímulo estresante, sin importar que lo provoca [33].

Ante cualquier estímulo que perturbe el estado de homeostasis del individuo, se requiere la participación de corazón, músculos y cerebro, la participación de todos estos órganos dan lugar a una serie de procesos fisiológicos, como la activación del sistema nervioso simpático, medula adrenal, sistema hipotalámico-pituitaria-adrenal (HPA), también se presenta un incremento del metabolismo basal mediado por la duración del factor estresante durante este proceso [32].

A través de la activación del sistema nervioso simpático se estimula la secreción de hormonas simpato-neuronales y simpato-adrenomedulares (catecolaminas y glucocorticoides) [34].

Clínicamente el estrés se clasifica de acuerdo a:

- a). Generadores: Físico, psicológico, social, cambio repentino,cardio-muscular, metabólico y químico.
- b). Duración: Agudo y crónico. El estrés agudo es simple, intermitente y de tiempo limitado de exposición, mientras que el crónico es una exposición continuamente larga e intermitentemente.

Durante el estrés crónico la activación simpática supone la secreción de catecolaminas a través del sistema neuronal. Estas hormonas-neurotransmisoras son las encargadas de mantener la homeostasis.

La médula suprarrenal responde a diferentes factores estresantes como la inmovilización, hipoglucemia, angustia emocional, shock y miedo [35], activando respuestas como la dilatación de las pupilas, vasodilatación muscular y vasoconstricción cutánea [32].

Los efectos de estímulos estresores en los niveles de catecolaminas adrenomedularias han sido determinados por estudio que exponen episodios de inmovilización durante dos horas [36], presentando un decremento entre el 15% y el 20% del total de epinefrina (E) o adrenalina, sin cambios significantes en norepinefrina (NE) o noradrenalina.

La adrenalina es segregada por la médula suprarrenal, especialmente en casos de estrés psíquico, crónico y/o por ansiedad, por otro lado la noradrenalina es segregada por las terminaciones nerviosas simpáticas con un aumento de su concentración en el estrés de tipo físico y en situaciones de alto riesgo o de agresividad [32].

Ante numerosos estímulos estresantes físicos y emocionales se generan alteraciones; ciclo sueño/vigilia, alimentación y en neurotransmisores como la adrenocórticotropa (ACTH), serotonina, NA, GABA y endorfinas. Estos neurotransmisores estimulan al hipotálamo, específicamente a los núcleos paraventriculares, para que sinteticen y secreten la hormona liberadora de la corticotropina (CRH) a la sangre. A través de la sangre, la CRH actúa sobre la adenohipófisis estimulando la síntesis y secreción de hormona adeno córticotropa (ACTH), la cual entra al sistema sanguíneo y actúa sobre la zona fascicular de la corteza suprarrenal, aumentando principalmente los niveles del glucocorticoide cortisol. Cuando existe una repetición del mismo parámetro de estrés, los niveles de catecolaminas regresan a lo normal y restablecen un alto nivel basal (parámetros de homeostasis) [37].

También se ha reportado que al aplicar diariamente por una persona y por varias semanas el estrés mediante inmovilización en ratones, los niveles de catecolamina son elevados [38] pero a la inducción repetitiva con periodos de descanso estas se estabilizan [39], bajando los niveles de adrenalina y adrenocórticotropa pero no bajando los niveles de noradrenalina [40]. En contraste, cuando el estrés es producido por diferentes personas en el mismo ratón, la adrenalina se incrementa igual que la noradrenalina, estas mismas son controladas por los sistemas simpato-adrenomedular y simpato-neural [41].

Cuando el estrés induce una descarga hormonal de corticotropina proveniente del núcleo paraventricular del hipotálamo, la ACTH es liberada de la glándula pituitaria y glucocorticoide, agudizando la hiperplasia en la zona de la corteza adrenal, entonces el estrés crónico no solo afecta al ACTH sino también a la corteza adrenal, cuando los animales son expuestos a un continuo o intensivo estímulo estresante la glándula ACTH gradualmente regresa a su normalidad. Además ante cualquier tipo de estímulos los niveles de glucocorticoides son altos y por ende los individuos presentan un incremento de cortisol basal [42]. En el sistema nervioso central - SNC produce catecolaminas al metabolizar estos

proceso y la producción de estas son una fuente importante de *radicales libres*, tal paso es catalizado por la monoamina al oxidarse (MAO), durante la ruptura metabólica de serotonina y noradrenalina (NA), se produce peróxido (H_2O_2) generando un estrés oxidativo [43].

3.3 Radicales libres.

Los radicales libres (RL) son especies químicas con uno o dos electrones sin aparear, el electrón desemparejado es altamente reactivo ya que busca emparejarse con un electrón libre, esto da lugar a la producción de otro RL. El radical libre recientemente producido es inestable en la mayoría de los casos y como resultado también puede reaccionar con alguna molécula para producir uno más. De este modo, puede producirse una reacción en cadena de RL's, dando lugar a reacciones cada vez más perjudiciales. La mayoría de los RL que dañan los sistemas biológicos son los del nitrógeno, hidrógeno y oxígeno además de otras especies de oxígeno reactivo, que son subproductos formados en las células de los organismos aeróbicos [72].

El daño celular producido por las especies reactivas del oxígeno ocurre sobre diferentes macromoléculas:

- 1.- Lípidos. Es aquí donde se produce el daño mayor en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica, afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, ya que se altera la permeabilidad de la membrana celular produciéndose edema y muerte celular. La peroxidación lipídica o enranciamiento oxidativo representa una forma de daño histórico que puede ser desencadenado por el oxígeno, el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Los ácidos grasos insaturados son componentes esenciales de las membranas celulares, por lo que se cree son importantes para su funcionamiento normal, sin embargo, son vulnerables al ataque oxidativo iniciado por los radicales libres del oxígeno [72].

Los factores que influyen en la magnitud de la peroxidación lipídica son:

- a) La naturaleza cualitativa y cuantitativa del agente inicializador.
- b) Los contenidos de la membrana en ácidos grasos poliinsaturados y su accesibilidad.
- c) La tensión de oxígeno.
- d) La presencia de hierro.
- e) El contenido celular de antioxidantes (betacarotenos, alfatocoferoles, glutatión).
- f) La activación de enzimas que pueden hacer terminar la cadena de reacción como es el caso de la glutatión peroxidasa (GSH-Prx).

Una vez que se inicia, el proceso toma forma de “cascada”, con producción de radicales libres que lleva a la formación de peróxidos orgánicos y otros productos, a partir de los ácidos grasos insaturados; una vez formados, estos radicales libres son los responsables de los efectos citotóxicos [44].

- 2.- Proteínas. Hay oxidación de un grupo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina; además se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, y por último hay formación de grupos carbonilos.
- 3.- Ácido desoxirribonucleico (ADN). Ocurren fenómenos de mutaciones y carcinogénesis, hay pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes. El daño se puede realizar por la alteración inactivación/pérdida de algunos genes supresores de tumores que pueden conducir a la iniciación, progresión, o ambas de la carcinogénesis). Los genes supresores de tumores pueden ser modificados por un simple cambio en una base crítica de la secuencia del ADN.

Los radicales libres (radicales de hidroxilo y peróxido) y las formas altamente reactivas del oxígeno, son producidos en el cuerpo durante las reacciones metabólicas normales del ser vivo, esto también se produce durante el estrés fisiológico, contaminación del aire, el tabaco, la exposición a productos químicos o la exposición a rayos ultravioleta (UV) estos también llamados *pro-oxidantes* [71]

Los fagocitos también pueden generar un exceso de radicales libres. Los radicales pueden dañar el ADN, las proteínas y las membranas lipídicas. El daño oxidativo por los radicales se ha relacionado con el envejecimiento, la aterogénesis, lesión por isquemia-reperfusión, retinopatía infantil, degeneración muscular, carcinogénesis y osteoporosis [44].

Existen varios sitios de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS): transporte de electrones mitocondrial, ácido graso peroxisomal, citocromo P-450 y células fagocíticas [45] además que el estrés también produce ROS, creando una descompensación de Antioxidantes- RL's.

3.4 Antioxidantes.

Un antioxidante es una sustancia química, presente a bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable (biomolécula), retardando o previniendo la oxidación de sustrato.

El antioxidante al interactuar con el RL le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un RL débil no tóxico y que en algunos casos como la vitamina E, puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros

antioxidantes. No todos los antioxidantes actúan de esta manera, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que a su vez reaccionan con los RL [72].

Existen dos tipos de antioxidantes: exógenos o antioxidantes que ingresan a través de la cadena alimentaria y endógenos que son sintetizados por la célula (Tabla 1. 1.)

Origen	Acción
1. Exógenos	
Vitamina E	- Neutraliza el oxígeno singlete - Captura radicales libres hidroxilo - Captura O ₂ - Neutraliza peróxidos
Vitamina C	- Neutraliza el oxígeno singlete - Captura radicales libres de hidroxilo - Captura O ₂ - Regenera la forma oxidada de la vitamina E
Retacarotenos Flavonoides, Licopenos	Neutraliza el oxígeno singlete
2. Endógenos	
Enzimáticos	Cofactor
Superóxido dismutasa (SOD)	Cobre, sodio, manganeso
Catalasa (CAT)	Hierro
Glutación peroxidasa (GPx)	Selenio
3. No enzimáticos	
Glutación	Barreras fisiológicas que enfrenta el oxígeno a su paso desde el aire hasta las células
Coenzima U	Transportadores de metales (transferrina y ceruloplasmina)
Ácido Tioctico	

Tabla 1.1 . Tipos de antioxidantes

Varios tipos de antioxidantes estimulan la oxidación de los lípidos, esto puede tener mérito en mejorar el síndrome metabólico [47, 48,49]. Un tratamiento antioxidante exogenos (naturales y/o sintéticos) tiene por lo tanto gran promesa en el alivio de algunos de los efectos producidos por el estrés oxidativo [46]. Los antioxidantes naturales presentes en los vegetales y en algunos animales han sido estudiados por su papel en la protección de diversas enfermedades como ciertos tipos de cáncer, enfermedades del corazón y la degeneración muscular relacionada con la edad. Evidencia experimental sugiere que estos compuestos son importantes en la protección de macromoléculas biológicas contra el daño oxidativo [50,51].

Una dieta en antioxidantes carotenoides (Tabla 1. 2), pueden ayudar a prevenir enfermedades humanas. Los carotenoides son potentes antioxidantes biológicos que interaccionan con el electrón libre del oxígeno [52,53].

Presencia de carotenoides en diferentes alimentos.	
Carotenoides mayoritarios	Fuente
α - y β -caroteno	Zanahoria (<i>Daucus carota</i>)
Licopeno	Tomates (<i>Lycopersicum spp</i>)
Luteína/Zeaxantina	Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>), maíz (<i>Zea mays</i>), cempasúchil (<i>Tagetes erecta</i>), huevo de gallina
Violaxantina, β -criptoxantina, luteína/ zeaxantina	Naranja (<i>Citrus sinensis</i>)
Astaxantina	Salmón (<i>Salmo spp</i>), crustáceos, microalgas y levaduras
Cantaxantina	Crustáceos
Crocentina	Azafrán (<i>Crocus sativus</i>)

Tabla 1. 2. Presencia de carotenoides en algunos alimentos [54].

La astaxantina es el principal pigmento carotenoide encontrado en animales acuáticos como el salmón, trucha, besugo, camarones, langosta y huevos de peces aun que también están presentes en aves como los flamencos y codornices [55]. Además la astaxantina está estrechamente relacionada con otros carotenoides, tales como β -caroteno, zeaxantina y luteína.

En estudios relacionados con la luteína y la densidad ósea en ratones [70], se encontró un aumento significativo en masa ósea femoral en ratones tanto in vivo como in vitro, derivado de un aumento en la producción de osteoblastos maduros concluyendo que los antioxidantes carotenoides como la luteína promueve una mineralización ósea y por ende cambia las propiedades físicas intrínsecas del hueso como la rigidez, flexibilidad y dureza.

Por lo tanto la presencia del hidroxilo en cada anillo de ionona (figura 14) en los carotenoides, explica algunas características únicas, como la capacidad de esterificado o mayor actividad antioxidante [56], atribuyéndole muchos de los factores metabólicos y fisiológicos funcionales de los carotenoides.

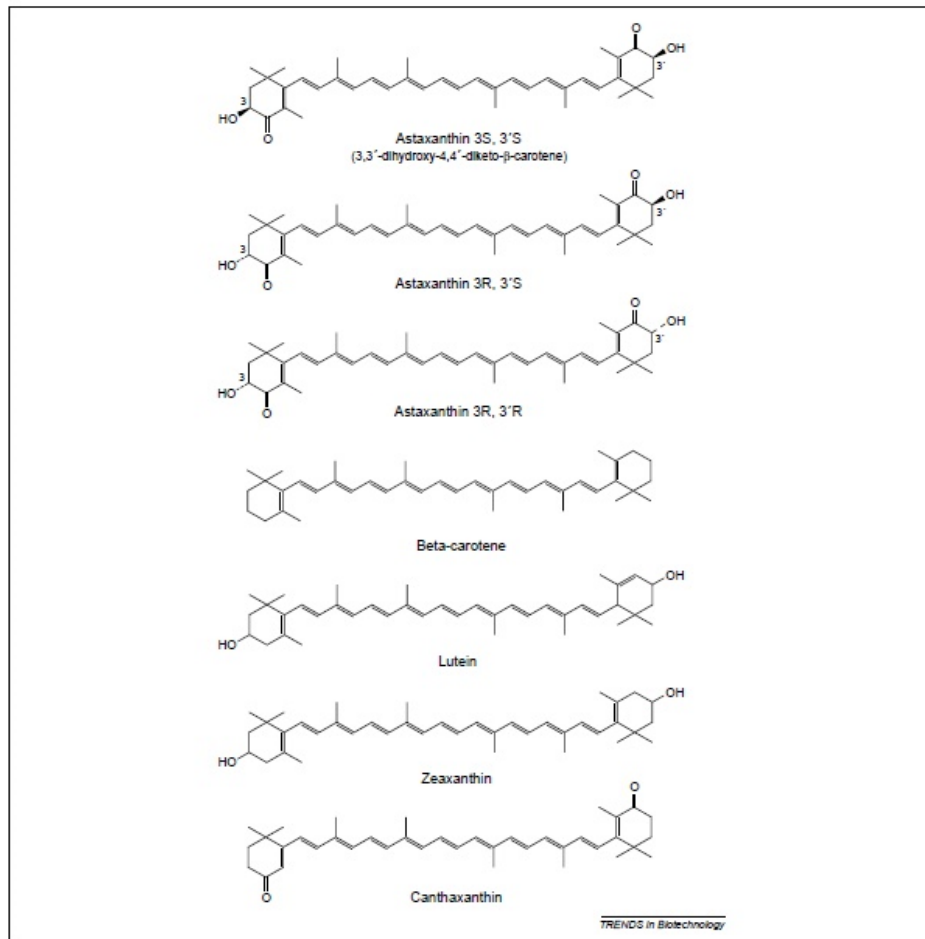


Figura 14. Estructura de diferentes carotenoides [56].

La metodología para evaluar componentes inorganicos de la matriz ósea se realizara mediante la microdureza.

3.5 Microdureza.

Algunas de las propiedades mecánicas más importantes de un material son la resistencia, ductibilidad, rigidez y la dureza [58]. Para poder caracterizar cada una de ellas se requiere aplicar técnicas muy específicas dependiendo de varios aspectos o consideraciones, por ejemplo, es indispensable primero tomar en cuenta la respuesta de los materiales a las fuerzas aplicadas, esto es:

- 1.- Tipo de enlace (tablas 2 y 3).

- 2.- Disposición estructural de los átomos o moléculas.
 3.-Tipo y número de imperfecciones, que están siempre presentes en los sólidos.

	Enlaces primarios o químicos		
Tipo de enlace:	<i>Iónico o electrostático</i>	<i>Covalente, atómico u homopolar</i>	<i>Metálico</i>
Naturaleza del enlace:	Entre iones opuestos.	Se comparten electrones.	Iones positivos inmersos en electrones libres.
Carácter del enlace::	No direccional. (fuerza de Coulomb – atractiva).	Direccional.	No específico y no direccional.
Energía de enlace: (kcal/mol)	140-250	15-170	27-83
Elementos involucrados:	Metal - no metal		Elementos metálicos
Presente en:	Materiales cerámicos	Materiales poliméricos	Metales y aleaciones

Tabla 2. Tipos de enlaces atómicos primarios (químicos) [59].

	Enlaces secundarios (fuerzas intermoleculares)	Energía de enlace: (kcal/mol)
Tipos de enlace:	Efecto de dispersión o polarizabilidad (fuerzas de Van der Waals-London).	Hasta 10
	Fuerzas de dipolo a dipolo.	Hasta 5
	Efecto de dipolo a dipolo inducido.	Hasta 0.5
	Enlace de hidrógeno.	Hasta 12

Tabla 3. Tipos de enlaces atómicos secundarios [59].

La energía de enlace presente en cada una de las tablas 3 y 4 es la energía mínima que se requiere para formar o romper el enlace, en consecuencia los materiales que tienen una energía de enlace grande también tiene una resistencia y una temperatura de fusión alta.

Hay otras propiedades que se pueden considerar en la relación entre fuerza-distancia y energía, por ejemplo el módulo de elasticidad E de un material, que es la pendiente de la curva de esfuerzo- deformación en la región elástica (figura15), este módulo es llamado también como “modulo de Young”.

Una pendiente grande en módulo de elasticidad se relaciona con una mayor energía de enlace y un mayor punto de fusión, esto equivale a una mayor fuerza

necesaria para estirar el enlace; en consecuencia, el material tiene un módulo de elasticidad grande [60].

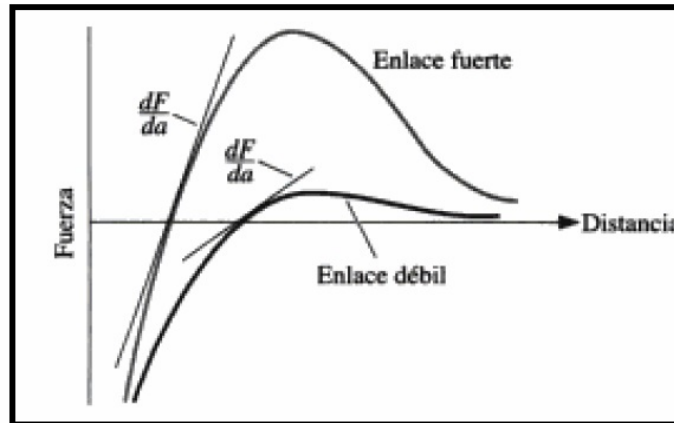


Figura 15. Curva fuerza- distancia para dos materiales, donde se observa la relación entre enlazamiento atómico y modulo de elasticidad, con una pendiente df/da muy pronunciada que determina un modulo grande [60].

Material	Esfuerzo de compresión para rompimiento (N/mm ²)	Esfuerzo de tensión para rompimiento (N/mm ²)	Módulo de Young (x 10 ² N/mm ²)
Acero duro	552	827	2070
Porcelana	552	55	-
Hueso compacto	170	120	179
Granito	145	4.8'	517
Roble	59	117	110
Concreto	21	2.1'	165
Hueso trabecular	2.2'	-	0.76'

Tabla 4. Fortaleza del hueso y otros materiales comunes [61].

Las fuerzas entre los enlaces moleculares (fuerzas de atracción y repulsión entre los átomos que las componen), son las que determinan el comportamiento elástico del material. La elasticidad es entonces la capacidad de un material para absorber energía en el límite elástico, representando la relación entre la energía que se pierde al recuperarse su estado antes de la deformación, y la energía necesaria para producirla. En los materiales elásticos perfectos esta proporción debe ser igual a uno, pero en los materiales reales, siempre existe alguna cantidad de energía que se disipa en forma de calor, por fricción interna del material. Para

tener una gran elasticidad, el material debe poseer una notable resistencia al esfuerzo mínimo de deformación y un modulo de elasticidad bajo [59].

Las pruebas de microdureza miden la resistencia de la superficie de un material a la penetración (indentación) con un objeto duro, a lo cual es una medida cualitativa de la resistencia del material, el principio de la microindentación consiste en aplicar un carga(10-1000 gf) y posteriormente medir las dimensiones de la impresión que queda en el material una vez que se ha retirado [60,61].

La microdureza del material se define entonces como la relación entre la carga de microindentación, el parámetro representativo de el área de la impresión residual y la geometría del indentador(figura 16).

Área de proyección de la indentación

$$A = cD^2$$

c: Constante de indentación

$$c = \frac{(\tan(\beta/2))}{(2\tan(\alpha/2))} \approx 0.070296347$$

Figura 16. Calculo del área de indentación [63].

Para calcular la profundidad de indentación se utiliza la relación (figura 17)

:

h: Profundidad de la indentación

$$h = \frac{1}{2} \sqrt{\left(\frac{Dd}{(\tan \gamma \tan \varphi)}\right)}$$

$$\gamma = \alpha/2; \varphi = \beta/2$$

d: Longitud de la diagonal menor

Figura 17. Cálculo de profundidad de indentación [63].

Como ya se mencionó, la geometría del indentador tiene un factor importante por ejemplos en la prueba de microdureza Knoop (figura 18).

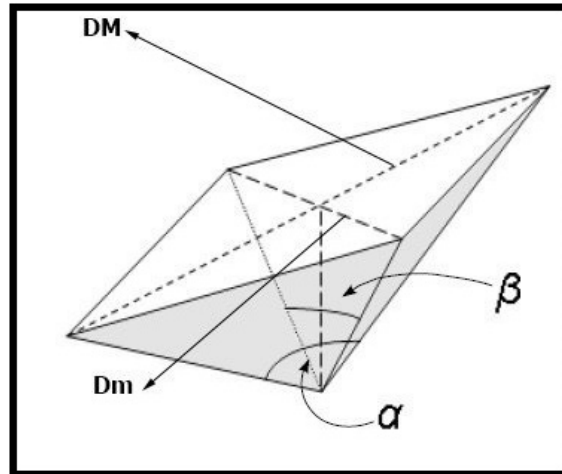


Figura 18. Geometría del indentador knoop .
Dm: diagonal menor, DM: Diagonal mayor, α :
ángulo asociado a la diagonal mayor (172.5°), β :
ángulo asociado a la diagonal menor(130°) [63].

El cálculo de la dureza Knoop (HK) se considera apartir de la longitud del guión impreso en el material y la carga (figura 19).

Ecuación para encontrar dureza knoop:

$$HK = 1.451 \frac{F}{D^2}$$

F: Fuerza de prueba [N]
D: Longitud de la diagonal mayor [mm]
HK: Dureza Knoop [MPa]

Figura 19. Ecuación para el Cálculo de dureza tipo knoop [63].

Para nuestro caso, las pruebas de indentación se utilizan para mapear las propiedades biomecánicas del hueso cortical, el subyacente como el hueso trabecular que está cerca de las articulaciones diartrotrópicas o hueso adyacente a los implantes. Las propiedades biomecánicas de hueso en estas regiones son clínicamente importantes en los estudios de la progresión de la osteoartritis y el reemplazo de la articulación artroplástica. La dureza del hueso se estima como la carga máxima dividida por el área de la sección transversal del indentador (tabla 5).

	L. Feng, et al. (2012)	L. Yin, et al. (2010)	Jäger y Fratzl (2000)	Sevostianov y Kachanov (2000)
Tipo de hueso:	porcino	cordero	valores típicos	fémur humano
Técnica:	nanoindentaciones	microindentaciones	---	ultrasonido
Dureza	200 – 1,200	300 – 450		
Módulo de Young	8,000 – 27,000		10,000 – 20,000	
Rigidez elástica				4,740 – 30,000

Tabla 5. Algunas propiedades del hueso.

Se utilizara el estudio mediante IR para analizar los componentes tanto organicos como inorganicos del hueso.

3.6 Infrarrojo.

La espectroscopia infrarroja es sin duda una de las técnicas analíticas más importantes disponibles para los científicos de hoy. Una de las grandes ventajas de esta espectroscopia es que prácticamente cualquier muestra en cualquier estado puede ser estudiada (líquidos, soluciones, pastas, polvos, películas, fibras, gases) prácticamente todas las superficies pueden ser examinadas con una elección juiciosa de la técnica de muestreo. La espectroscopia infrarroja es una técnica basada en las vibraciones de los átomos de una molécula.

Un espectro de infrarrojo se obtiene comúnmente pasando radiación de infrarrojo a través de una muestra y determinando qué fracción de la radiación incidente se absorbe a una energía en particular, la energía de un pico en el espectro absorción corresponde a la frecuencia de una vibración de una parte de una muestra molécula [57].

El espectro infrarrojo abarca los rangos de infrarrojo medio (2.5-25 micrómetros = $4000-400\text{ cm}^{-1}$) y el infrarrojo lejano (25 -1000 micrómetros = $400-10\text{ cm}^{-1}$) es en estas regiones en donde la mayoría de las moléculas presentan una absorción o emisión por el cambio de bandas debido a la interacción con la radiación del campo. La cantidad de energía absorbida o emitida es equivalente a la diferencia de energía entre los estados de baja vibración y los estados electrónicos base de la molécula [57].

Para sacar los espectros, se requiere una mínima cantidad de muestra por lo cual es una medición no destructiva, facilitando así la evaluación espectral de los compuestos, por lo tanto es una información concentrada de la composición, constitución de algunas propiedades físicas de la muestra [57].

3.6.1 Absorción infrarroja.

La espectroscopia infrarroja está basada en el fenómeno de absorción infrarroja por vibraciones moleculares. Para que sea posible la absorción de la energía infrarroja por parte de una sustancia, es necesario que la energía que incide sobre ella sea del mismo valor que la energía de vibración que poseen las moléculas de la sustancia [57].

En una molécula existen diferentes átomos que forman distintos enlaces, en el espectro de infrarrojo aparecerán bandas de absorción a distintos valores de frecuencia y de longitud de onda [57].

Por ejemplo, la región situada entre 1400 y 4000 cm^{-1} , es de especial utilidad para la identificación de la mayoría de los grupos funcionales presentes en las moléculas orgánicas. Las absorciones que aparecen sobre esta zona, proceden fundamentalmente de las vibraciones de estiramiento. La zona situada a la derecha de 1400 cm^{-1} es por lo general compleja, debido a que en ella aparecen vibraciones de estiramiento de flexión. Cada compuesto tiene una absorción característica en esta región, es por ello que se le denomina como la región de las huellas dactilares [57].

El momento dipolar eléctrico de una molécula puede cambiar durante la vibración. Es decir la interacción de radiación infrarroja con la molécula puede ser entendida en términos de los cambios dipolares moleculares asociados con la vibración o rotación de estas (figura 20).

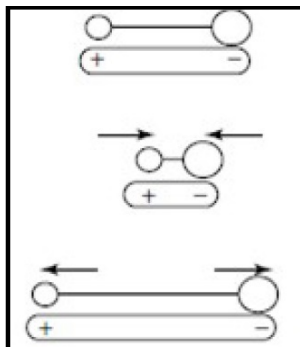


Figura 20. El momento dipolar de la molécula cambia conforme los enlaces se expanden o se contraen [57].

Los átomos en las moléculas se mueven relativamente de un lado a otro, la longitud de los enlaces puede variar de un átomo a otro. Por lo que también se toma en cuenta que puede moverse también fuera del plano [57].

3.6.2 Modos vibraciones.

La interacción de radiación infrarroja con la materia puede ser entendida en términos de los cambios de los dipolos moleculares asociados con las vibraciones y rotaciones [57].

Por ejemplo para modelos básicos de las moléculas, puede verse como un sistema de masas unidas por enlaces con ciertas propiedades. Para el primer caso de moléculas diatómicas se tiene tres grados de libertad: traslacional y dos grados de libertad rotacional, para esta molécula solo hay una vibración posible correspondiente al estiramiento o contracción de los enlaces [57]. La vibración puede involucrar algún cambio en la longitud del enlace (estiramientos) o el ángulo de enlace (figura 21), también existe más movimientos llamados flexión (figura 22).

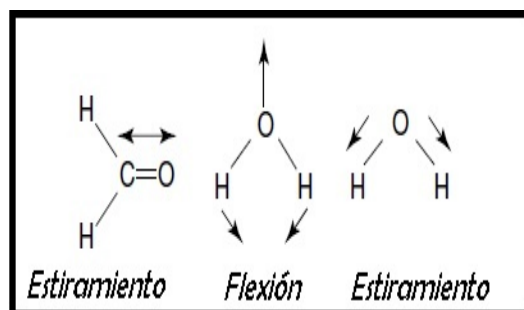


Figura 21. Modos de vibración [57].

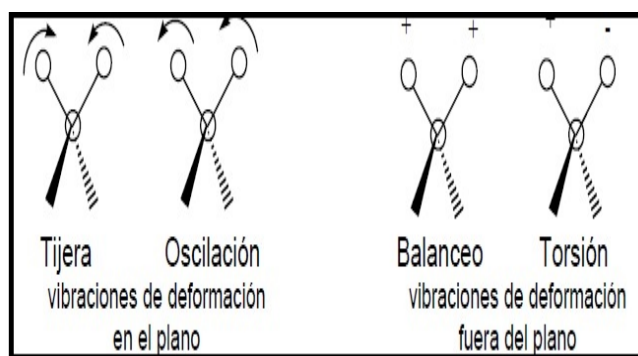


Figura 22. Vibración de flexión, donde + y - se refiere a vibraciones Perpendiculares al plano [57].

En moléculas poliatómicas que contienen N átomos tendrán $3N$ grados de libertad, tabla 6. Los grupos de moléculas triatómicas pueden ser distinguidas en dos grandes grupos, lineal y no lineal (figura 23) [57].

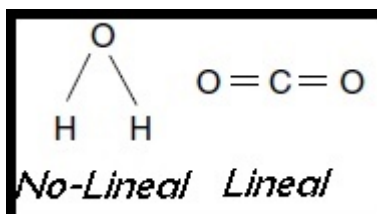


Figura 23. Grupos de moléculas triatómicas.

<i>Tipo de grado de libertad</i>	<i>Lineal</i>	<i>no-Lineal</i>
<i>Traslacional</i>	3	3
<i>Rotacional</i>	2	3
<i>Vibracional</i>	$3N - 5$	$3N - 6$
<i>Total</i>	$3N$	$3N$

Tabla 6. Grados de libertad de moléculas [57].

En términos generales y para comprender más rápidamente a los sistemas físicos se considera que una molécula diatómica solo tiene un modo de vibración correspondiente a movimiento de estiramiento, para moléculas del tipo triatómico no-lineal (A-B-A) tiene tres modos, dos que le corresponden por cada movimiento de estiramiento y el resto de modos le corresponde a movimiento de flexión. Una molécula triatómica del tipo no-lineal tiene 4 modos: dos que tienen una misma frecuencia y dos más para el estado degenerado [57].

Algunos enlaces pueden estirarse en fase (estiramientos simétricos) o fuera de fase (estiramientos asimétricos) (Figura 24).

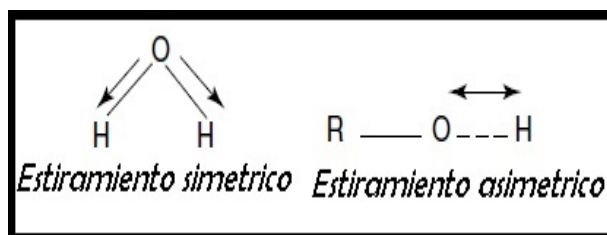


Figura 24. Tipos de estiramiento [53].

El espectro infrarrojo puede ser dividido en tres principales regiones. Infrarrojo lejano ($< 400 \text{ cm}^{-1}$), infrarrojo medio ($4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$), infrarrojo cercano ($13\ 000\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$) [64].

3.6.3 Infrarrojo medio.

El espectro del infrarrojo medio se divide en 4 regiones. Región de estiramiento X-H ($4000\text{--}2500 \text{ cm}^{-1}$), enlace triple ($2500\text{--}2000 \text{ cm}^{-1}$), doble enlace ($2000\text{--}1500 \text{ cm}^{-1}$), huella dactilar ($1500\text{--}600 \text{ cm}^{-1}$) (figura 25).

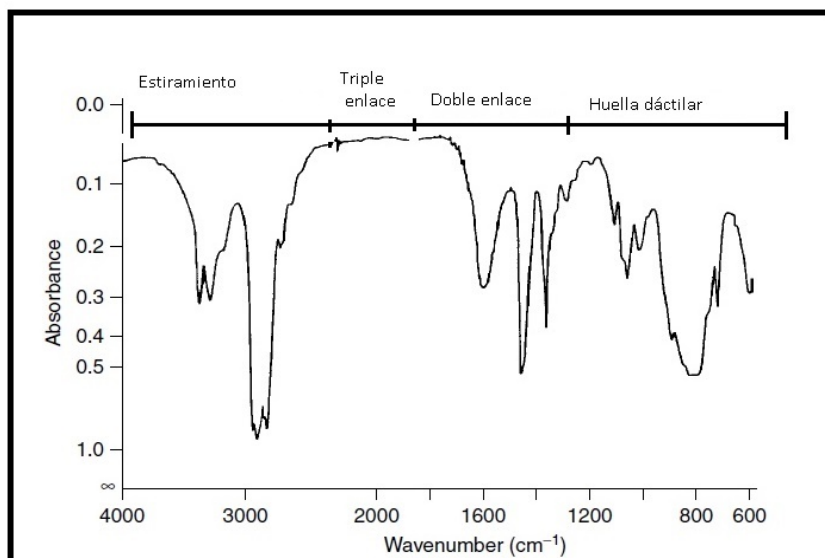


Figura 25. Espectro de infrarrojo de hexilanima con regiones delimitadas [57].

Las vibraciones en la región ($4000\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$) pertenecen a estiramientos de pares como O-H, C-H y N-H, el estiramiento O-H se produce particularmente con un rango de ancho de banda de $3700\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$, para el estiramiento N-H es usualmente observado entre $3400\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$, el estiramiento de banda del C-H como los compuestos alifáticos ocurre en el rango de $3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$. Si el enlace C-H es adyacente a un doble enlace o a un anillo aromático el estiramiento C-H incrementa el número de onda y es absorbida entre 3100 y 3000 cm^{-1} [57].

El estiramiento de los triples enlaces se da en la región $2500\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$, por ejemplo los enlaces $\text{C}\equiv\text{C}$ absorben el IR entre 2300 y 2500 cm^{-1} mientras que el grupo nitrilo ($\text{C}\equiv\text{N}$) entre $2300\text{-}2200\text{ cm}^{-1}$. En esta región se pueden distinguir los estiramientos $\text{C}\equiv\text{C}$ ya que son normalmente muy débiles mientras que el estiramiento $\text{C}\equiv\text{N}$ es medianamente intenso, además hay absorciones que pueden cruzarse con algunos estiramientos de absorción del tipo X-H, donde X es un átomo más masivo que el fósforo o el silicio sucediendo particularmente cerca de 2400 y 2200 cm^{-1} [57].

Las bandas de absorción en la región $2000\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ pertenecen a estiramientos de enlaces pares como C=C y C=O. El estiramiento del grupo carbonilo es una de las absorciones más fáciles de reconocer en el espectro infrarrojo, ya que es usualmente intensa en el espectro. El tipo de enlace C=O ocurre en la región de $1830\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ pero si existe la presencia de algún metal en el grupo carbonilo éste puede absorber sobre 2000 cm^{-1} . El estiramiento C=C es

mucho más débil y ocurre alrededor 1650 cm^{-1} , pero esta banda es a menudo ausente en espectro debido a la simetría del momento dipolar aun que también en esta región ocurre el estiramiento C=N [57].

En principio el espectro de bandas bien comportadas es asignado por la deformación en particular de las moléculas, sin embargo para un espectro en donde las bandas que no son bien comportadas se debe a que hay varios números de onda para moléculas similares, esta simplificaciones pueden ser vibraciones de flexión perteneciente a la región $1500\text{--}650\text{ cm}^{-1}$ [57].

3.6.4 Puente de hidrogeno.

La presencia de puentes de hidrogeno en moléculas biológicas es de gran importancia debido a que la actividad del acido desoxirribonucleico (DNA) presenta este tipo de enlace. Los puentes de hidrógeno se establecen entre un átomo de hidrógeno que está unido a un elemento muy electronegativo y con radio iónico pequeño (como el oxígeno y/o nitrógeno) el cual es atraído por un segundo elemento con características similares de manera que el hidrógeno queda compartiendo uno de sus electrones entre cada uno de los átomos. En estas condiciones el átomo de H se encuentra sin uno de sus electrones y se comporta como un H^+ . El puente de hidrógeno puede formarse entre moléculas diferentes o iguales. Entre las interacciones débiles el puente de hidrógeno es una de las más fuertes. Estas interacciones son fundamentales en el mantenimiento de los niveles estructurales superiores de proteínas y ácidos nucléidos. Un ejemplo se puede apreciar en el H_2O y también entre grupos OH y NH_2 en algunas moléculas [57] (figura 26).

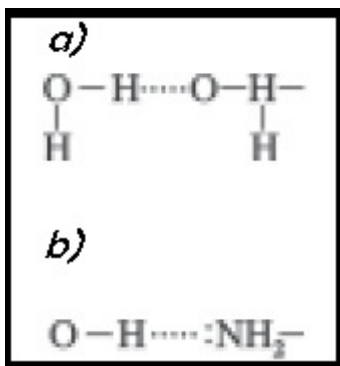


Figura 26. Puentes de hidrogeno en algunas moléculas; a) agua, b) OH-NH₂ [57].

Los grupos OH son enlaces de hidrogeno que absorben a una frecuencia de 3500 cm^{-1} . Si se analiza el espectro de un compuesto en que no hay uniones

de hidrogeno, la absorción presenta un pico nítido centrado en esta frecuencia; por el contrario, si hay enlaces de hidrogeno, el pico se ensancha considerablemente y el centro se desplaza a una frecuencia más baja. El ensanchamiento del pico de absorción es característico del puente de hidrogeno [27]. Los enlaces de hidrogeno tienen un importante efecto en la espectroscopia infrarroja ya que éstos influyen en la rigidez y algunas otras alteraciones presentes en las frecuencias de vibraciones.

3.6.5 IR- FT en el hueso.

Los espectros de infrarrojo (IR) proporcionan información cualitativa sobre todos los componentes que tienen vibraciones IR activas, en el caso del hueso esto incluye las proteínas, el fosfato mineral, los lípidos y carbonatos. La información estructural relacionada con el mineral a menudo se obtiene mediante espectroscopia IR. El espectro de IR se puede usar para determinar la naturaleza de la fase de fosfato de calcio presente, la cristalinidad de la apatita, la presencia de hidróxido y el contenido de carbonato de los minerales [65] (tabla7 y figura 27).

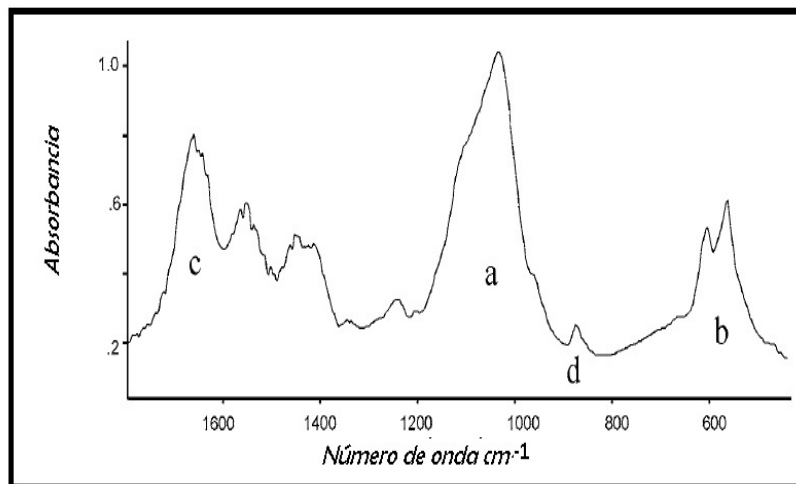


Figura 27. Regiones del espectro de IR de hueso de ciervo; a y b(absorción de fosfatos), c (absorción de proteínas y amidas I) y d (carbonatos) [65].

Grupo	Número de onda	Descripción
Amida A	3300	NH ESTIRAMIENTO
Amida B	3100	NH ESTIRAMIENTO
Amida I	1600-1690	C=O ESTIRAMIENTO
Amida II	1480-1575	CN ESTIRAMIENTO,NH FLEXION
Amida III	1229-1301	CN ESTIRAMIENTO,NH FLEXION
Amida IV	625-767	OCN FLEXION
Amida V	640-800	NH FLEXION FUERA DEL PLANO
Amida VI	537-606	C=O FLEXION FUERA DEL PLANO
Amida VII	200	TORCION
Agua y HAP	3700, 2700	O-H ESTIRAMIENTO
Hidroxilo	3437	O-H LIBRE ESTIRAMIENTO
Agua	1635	FLEXION
FOSFATO	1110, 1029	P-O ESTIRAMIENTO ASIMETRICO
FOSFATO	602, 560	ESTIRAMIETO Y FLEXION
HIDROXILO	631	FLEXION
CARBONATOS	1540, 1455	FLEXION
CARBONATOS	1450, 1410	INTERCAMBIO OH POR CO
HIDROGENOFOSFATO	875	INTERCAMBIO PO POR CO FLEXION
SILICATOS	890, 830, 750	FLEXION
HAP	601, 574	FLEXION

Tabla 7. Regiones de absorción de diferentes moléculas presentes en el hueso [66-69].

4 Metodología.

Se emplearon 8 ratones machos CD-1 de 9-10 semanas de edad con un peso de 30-35 gramos, obtenidos del Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) Xochimilco, los cuales se distribuyeron en 4 grupos experimentales (n= 2) aleatoriamente de la siguiente manera:

- Control
- Estrés crónico
- Esquema de suplementación de Astaxantina
- Estrés crónico y suplementación de Astaxantina

El trabajo experimental con los animales fue sometido a consentimiento para su aprobación por parte comisión de bioética de la Facultad de Medicina UAE-Mex.

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

Para el modelo de estrés por restricción de movimiento, se hizo de la siguiente manera; Los ratones se colocaron en un tubo de acrílico de 2 pulgadas por 10 cm de longitud con adecuada ventilación, el cual limita el movimiento rotacional de los animales, esta limitación fue por 3 horas por día, dos veces a la semana, durante 12 meses. La limitación del movimiento es limitado dentro del tubo pero sin provocar inmovilidad. Los animales se mantuvieron en las mismas condiciones que los animales control, antes y después del periodo de estrés.

En el esquema de suplementación con astaxantina se realizó mediante la administración del fármaco vía oral a través la sujeción de los animales de experimentación, con cuidado para evitar el estrés por manipulación, la suplementación se inició en los ratones desde las 10 semanas de edad hasta concluir el proyecto, mediante una dosis de microperlas al 2% de astaxantina a razón de 4 mg/kg de peso, dos veces por semana. Para alcanzar su liposolubilidad, la astaxantina previamente fue homogenizada en Tween 20 al 2%.

Una vez concluidos los 12 meses de seguimiento, se realizó la eutanasia de los animales mediante cámara de CO₂, con una presión de 20 mmHg y un flujo de 2 a 2.5 litros/minuto de dióxido de carbono (CO₂). Cabe mencionar que este método está avalado por la Asociación Americana de Medicina Veterinaria ya que disminuye el efecto estresante en el roedor.

Posteriormente, se realizó un corte trasversal a la altura de los músculos abdominales anteriores para extraer la extremidad derecha de cada animal y se colocaron en una caja de Petri con 1 mililitro de solución salina.

Las extremidades se almacenaron por separado en contenedores rotulados y se fijaron en formol tamponado al 10% con pH neutro; para ajustar el formol al 10% con las siguientes características de la solución :

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

Las muestras de hueso cortical con las que se trabajó, se obtuvieron del fémur (figura 28); siendo este el dominante en el material óseo compacto.

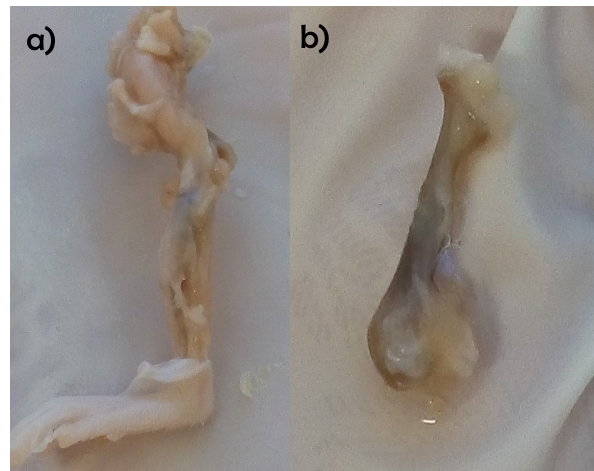


Figura 28. a) Extremidad de ratón, b) obtención del fémur.

La obtención de muestras adecuadas para el análisis de la microdureza así como para el análisis de IR, representa una parte importante de esta tesis, ya que con ello se facilitó el trabajo, al igual que la interpretación de los resultados que se obtuvieron, como se explica a continuación.

El tejido graso fue removido con ayuda de un cepillo de cerdas suaves y jabón neutro pH 7, la utilización de estos es el ideal para el limpiado de las muestras, para la remoción de jabón y grasas se utilizó agua destilada ya que cuenta con un pH 5.6. El proceso de limpiado se llevó a cabo mediante ciclos de abrasión y enjuagues hasta que el hueso se encontrara limpio (Figura 29).



Figura 29. Hueso limpio del fémur.

Una vez que las muestras se limpiaron se procedió a medir y anotar la longitud de cada una (Figura 30).

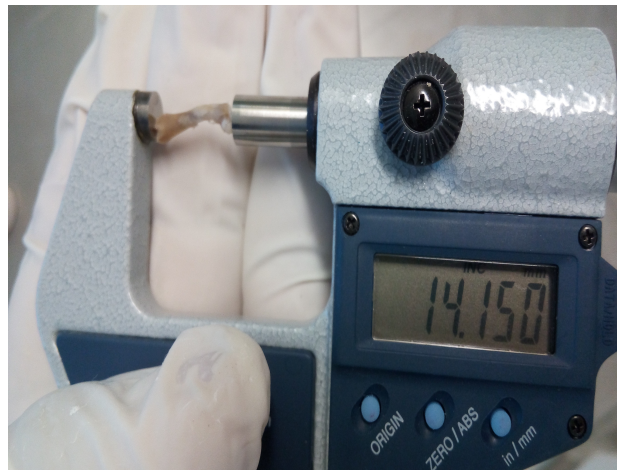


Figura 30. Medición de la longitud del hueso.

Después de limpiar la parte exterior del hueso se procedió a realizar los primeros cortes para retirar las epífisis ya que solo se trabaja con la diáfisis, estos cortes se hicieron con una navaja y con ayuda de una aguja se extrajo la médula ósea o cualquier otro material (sangre, hueso esponjoso) que se encontró dentro de éste ya que esto repercutía en el posterior análisis (figura 31).



Figura 31. Corte del fémur con una navaja.

Posteriormente se etiquetaron las muestras con las características particulares de cada una de ellas (control, estrés, astaxantina y estrés+astaxantina) y se formaron dos grupos (microdureza, IR).

4.1 Microdureza.

Para la medición de microdureza del hueso se utilizó la resina e-poxi ya que es un polímero termoestable que se endurece cuando se mezcla con un catalizador o endurecedor, brindando una mejor superficie de agarre al pulir, además se crea una base más estable para la realización de las indentaciones.

Se preparó cantidad suficiente de e-poxi: 5 partes de resina por una parte de endurecedor, y se vació la mezcla en recipientes donde se encontraban las muestras dejando endurecer por un periodo 48 horas. Para poder obtenerla capsula de los recipientes una vez que esta se endurece fue necesario primero humectar los recipientes en los cuales se vació la mezcla.

Para remover el excedente de resina sobre la superficie del hueso, se utilizaron lijas de agua con un tamaño de grano de 200-400 granos/pulgada². Una vez que se aproximó a la superficie del hueso se continuó con lija de grano de 800-1200 granos/pulgada² y se finalizó con la utilización de una lija de 1400-4000 granos/pulgada².

El proceso de pulido final se realizó mediante la ayuda de una pulidora eléctrica BUEHLER, MetaServ 2000 y con una solución como lubricante-abrasivo de 750 ml de agua destilada con 4 grs. de Alúmina Gamma de 0.05 micras. Variando la velocidad de pulido de forma progresiva de 50 a 500 Rev./min.

Una vez terminado el pulido se procedió al proceso de indentación mediante un indentador con punta tipo knoop, colocando la muestra (capsula) de bajo de la punta tomando en cuenta que estuviera alineada la parte donde está la

muestra de hueso con la punta de indentador, para que la parte de hueso este exactamente debajo de la punta (Figura 32).

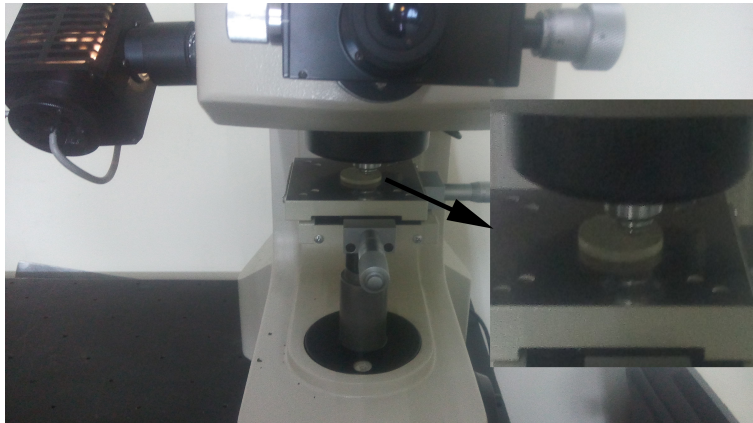


Figura 32. Indentación de la muestras de fémur mus mussum con ayuda del Microdurometro MICROMET 5101 - BUEHLER.

Se seleccionó el tiempo de indentación de 5 seg y una fuerza de 0.1 gf, posteriormente se midió la región indentada con ayuda del objetivo del microdurómetro (figura 33) registrando las medidas en una bitácora haciendo un total de 296 indentaciones por hueso (figura 34).

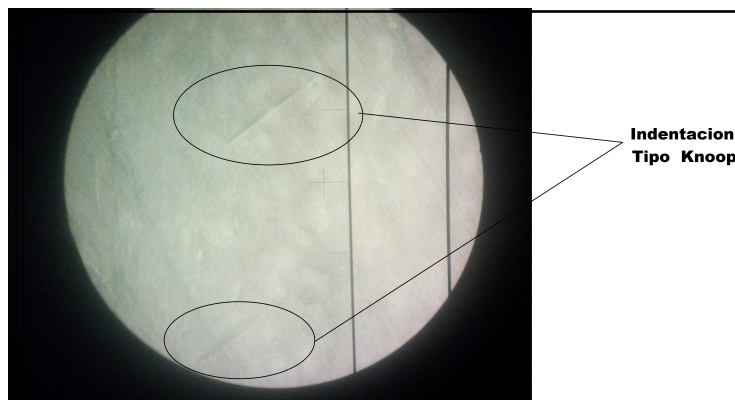


Figura 33. Huella de indentacion en el hueso.

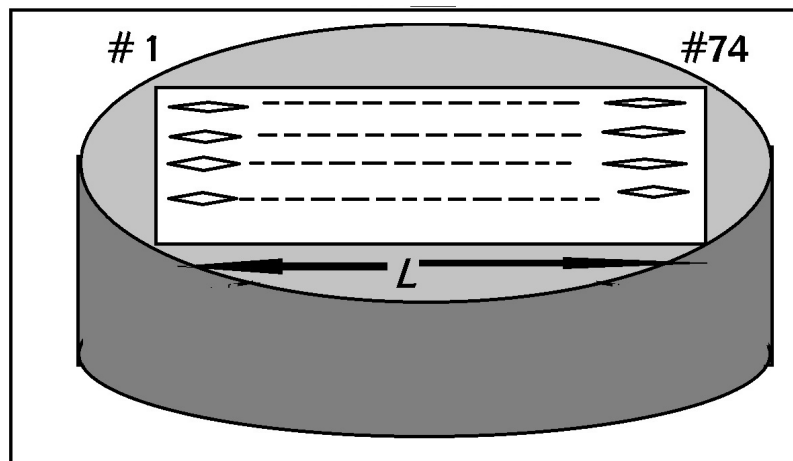


Figura 34. Esquema de indentación por hueso: tomando 74 indentaciones longitudinal por línea (4).

4.2 Infrarrojo.

Para el análisis del hueso mediante espectroscopia infrarroja, se molieron las muestras con un mortero de ágata, posteriormente se secaron todas las muestra durante 24 horas previas al análisis en una estufa a una temperatura de $220\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5$ para eliminar al máximo la presencia de agua en las muestra.

Una vez secadas las diferentes muestras y el KBr se pesa para hacer una mezcla con una proporción de 0.002 grs de hueso con 0.2 grs de KBr y una muestra aparte de 0.2 grs de KBr puro para la muestra base (blanco) y la determinación de absorbancia y/o transmitancia de las muestras óseas.

Se elaboraron pequeñas pastillas de las mezclas y el blanco mediante encapsulado a presión.

Las pastillas fueron caracterizadas mediante espectroscopia FT-IR en el rango de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ utilizando un dispositivo de la marca Bruker serie tensor 27.

5 Resultados y análisis de resultados.

5.1 Microdureza.

A partir de los datos obtenidos en donde se midió la diagonal mayor de la indentación con ayuda del microdurometro y con la ecuación presente en la figura 19, se graficó y se suavizó la grafica obtenida para poder apreciar mejor el comportamiento de la curva de microdureza de cada una de las muestras.

Como se puede observar en el grafico 1, la microdureza en la región aproximada a hueso sacro desciende de 3.6 MPa a 2.7 MPa en las primeras indentaciones, pero al acercarse a la parte media (indentación 23) la microdureza aumenta hasta 4.6 MPa, rebasando la microdureza máxima registrada en la región proximal y de acuerdo a los valores subsecuentes registrados, se forma lo se puede llamar como un “hombro” en la curva dando a entender que este se debe a una mayor concentración de hueso compacto puesto que en esta zona se encuentra el centro de masa longitudinal del femur . Una vez que se acerca a la patela (zona distal) la microdureza comienza a descender a valores aproximados a los registrados en la parte proximal, concluyendo que en los dos extremos presenta una microdureza promedio de 3.5 MPa ya que hay mas presencia de hueso esponjoso en estas dos zonas.

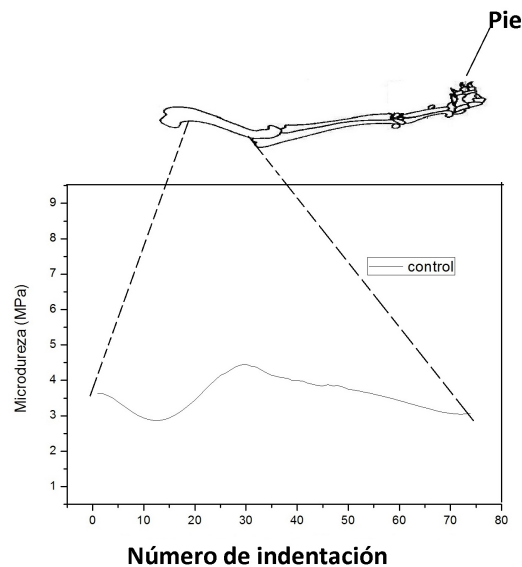


Gráfico 1. Curva de microdureza longitudinal de la muestra obtenida del individuo control.

En el grafico 2 , la microdureza de la muestra de hueso con astaxantina (antioxidante) es de 2.2 MPa en la parte cercana (proximal), despues tiene un comportamiento decendente (de 0.25 MPa) dentro de las primeras 5 indentaciones y adquiere una pendiente positiva de microdureza de 1.0 MPa aproximadamente en 10 indentaciones posteriores, en la parte media se mantiene en un rango de 2.5-3.0 MPa, pero en la zona lejana adquiere una fluctuacion de 0.5 MPa, ésta es debido a la remineralizacion (por zonas en forma de paquetes) en la parte superficial en esa zona. En la zona distal se registró un incremento de 1.0 MPa en comparación a la central y de 2.0 MPa con la proximal, estos incrementos podrian relacionarse con el efecto de los antioxidantes en el hueso debido a que promueve la mineralizacion atravez del incremento de osteoblastos maduros presentes en el hueso.

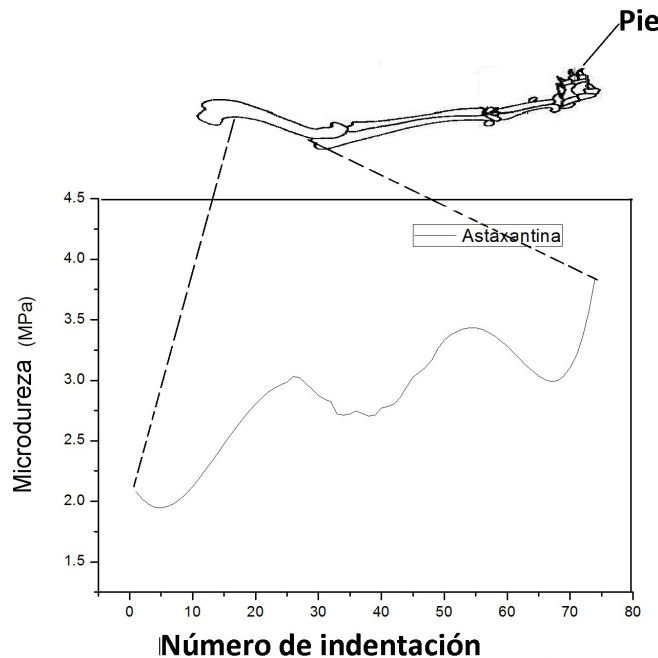


Gráfico 2. Curva de microdureza de la muestra obtenida del individuo al que se suplementó con astaxantina.

De acuerdo al gráfico 3, se aprecia un aumento de 2.9 MPa hasta 3.5 MPa de la microdureza en la parte cercana dentro de las primeras 13 indentaciones iniciales, además se observa una disminución drástica de 1.0 MPa conforme nos vamos acercando a la parte central y una disminución de 0.5 MPa con respecto

a las primeras indentaciones hechas en la parte proximal, los valores de la microdureza se mantienen más o menos uniformes (bajos en comparación a la zona anterior) en la parte media, éste valor bajo de la microdureza es relacionada a la pérdida de materia orgánica e inorgánica atribuida a los efectos del estrés en el hueso, tal vez debido a la interacción de los radicales libres en este sistema. Al acercarse a la parte distal, la microdureza va aumentando con una razón de cambio suave y muestra una región cuyos valores son aproximadamente iguales a los de la primera región.

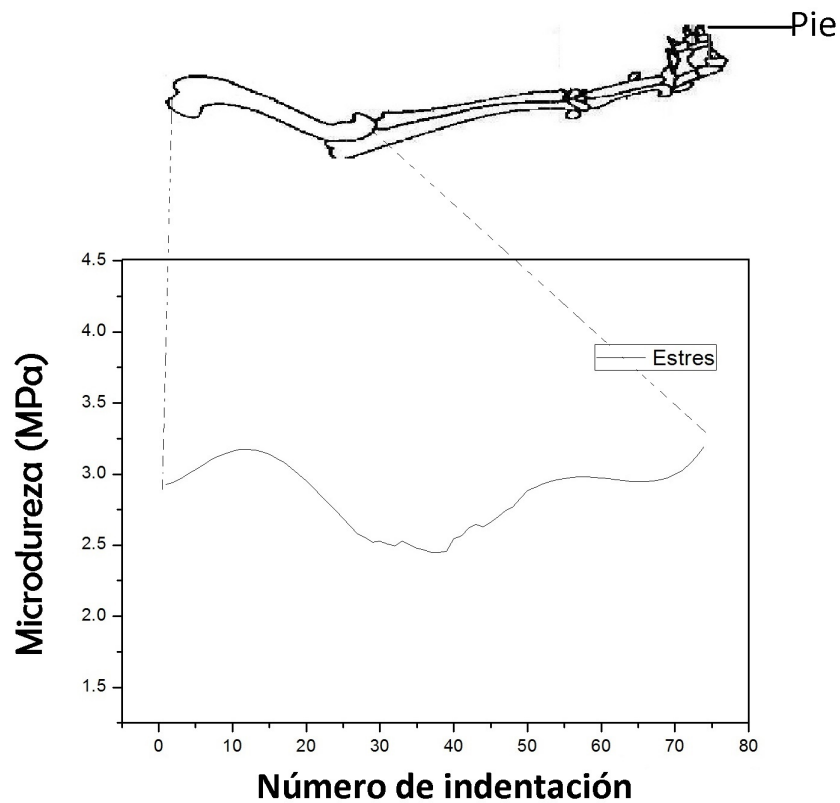


Gráfico 3. Curva de microdureza de la muestra obtenida del individuo al que se le indujo estrés.

En el gráfico 4 se observa un descenso en la microdureza en la parte cercana de 6.0 a 3.5 MPa dentro de las primeras quince indentaciones este efecto es debido a un mecanismo compensatorio del cuerpo en el sistema óseo cuando se le suplementa un antioxidante cuando está estresado, además ocurre una

estabilización casi linealmente con una fluctuación de 0.2 MPa apartir de la 20a indentación hasta llegar a las 60 indentaciones aproximadamente. Dicho comportamiento corresponde desde la zona media y hasta parte de la zona lejana, con una disminución de la microdureza en la indentación número 70 pero recobrando la microdureza promedio dentro de las últimas cuatro. Este comportamiento lineal se puede considerar que es debido a una estabilización de la absorción uniforme de los minerales principales a lo largo de parte longitudinal del hueso.

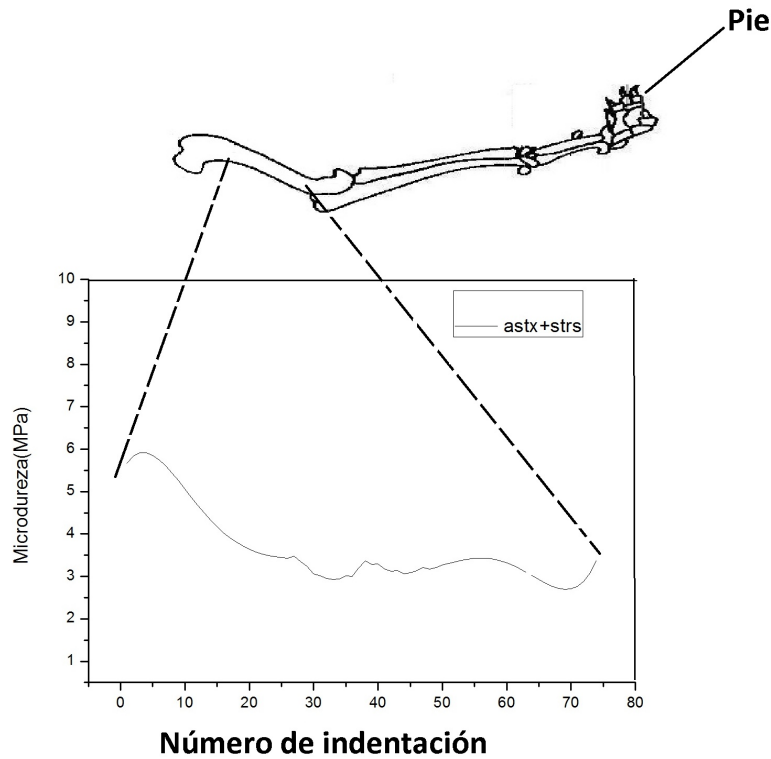


Gráfico 4. Curva de microdureza de la muestra obtenida del individuo al que se le indujo estrés y se le administró astaxantina.

La distribución de la microdureza (gráfico 5) a lo largo del fémur presenta un comportamiento asimétrico ya que la mineralización del sistema óseo se da por paquetes sólo en los lugares que se necesiten [23,24,65], por otro lado, se presenta notable disminución de la microdureza en la región media del fémur de los ratones a los cuales se les sometió a: estrés, astaxantina y estrés +

astaxantina en comparación del espécimen control, interpretando que el sistema óseo es susceptible a cambios de sus propiedades físicas como la microdureza por la suplementación de antioxidantes y al estar estresado, además el ratón con astaxantina presenta un aumento de la densidad ósea atribuida al uso de antioxidantes [70] afectando la microdureza intrínseca del hueso porque adquiere una concentración de minerales provocando un incremento de rigidez y por lo tanto aumentando su fragilidad cuando se le somete una fuerza. La curva de microdureza ósea del fémur en el ratón estresado presenta una disminución con respecto a los demás ratones sugiriendo un efecto del estrés en el sistema óseo y este efecto se puede aminorar pero no del todo con el uso de astaxantina puesto que los ratones a los que se le suministró el antioxidante y también fue estresado tiene una curva de microdureza por arriba de ésta, este efecto protector es atribuido por las propiedades de los antioxidantes ante un estímulo estresante [70].

Las consecuencias del estrés en el cuerpo comprenden un sinnúmero de variaciones dependiendo de las características en particular de cada individuo, sin embargo el estrés puede llegar a afectar de manera considerable cada uno de los tejidos. En el hueso, por ejemplo, se comprobó que el estrés afecta a nivel de la microdureza, disminuyendo casi 2/3 partes en comparación con el individuo control, dando a entender que toda la fisiología del estrés conlleva a un desgaste físico, biológico, químico y psicológico, provocando o disminuyendo la actividad ósea, esto se debe a que el organismo concentra todos los recursos a las zonas más demandadas.

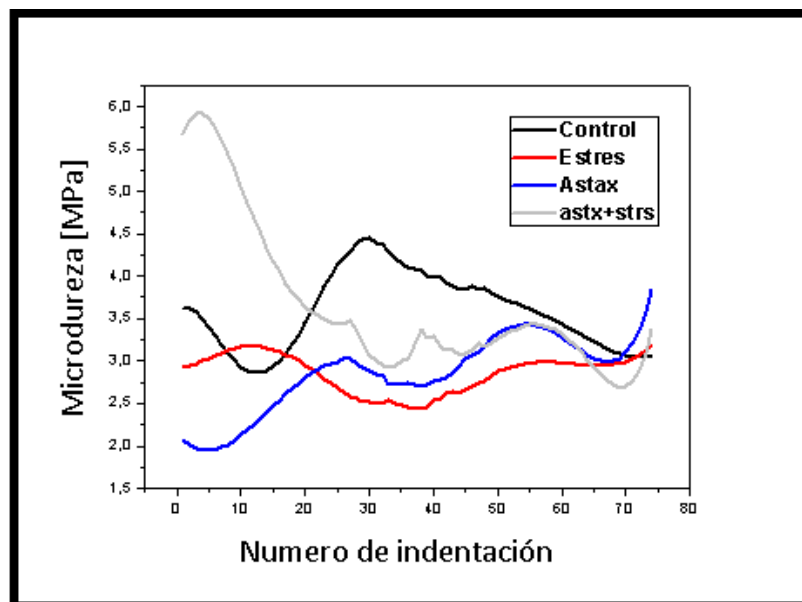


Gráfico 5. Comparación del comportamiento de la microdureza.

5.2 Infrarrojo.

El espectro de la muestra control (grafico 6) de hueso del ratón, contiene picos en 569 cm^{-1} y 611 cm^{-1} por la presencia de la molécula de HAP con un modo de vibración de flexión, específicamente, por los fosfatos quienes describen un movimiento de estiramiento y flexión. El pico en 882 cm^{-1} es debido a los movimientos de flexión de moléculas de hidrogeno-fosfatada ocasionados por el intercambio de PO por CO. El correspondiente a 1031 cm^{-1} se debe a moléculas de fosfato del tipo de enlace P-O presentando un modo de vibración de estiramiento asimétrico. En 1255 cm^{-1} se identifica la presencia de Amida III C-N con estiramiento junto con una flexión de NH. Para los picos en 1455 cm^{-1} y 1547 cm^{-1} se les asocian a la presencia de carbonatos con un modo de vibración de flexión. La presencia de amida I del grupo C=O con estiramiento es identificada en 1658 cm^{-1} . En el pico 2386 cm^{-1} se presenta el triple enlace $\text{C}\equiv\text{C}$ con su vibración de estiramiento y en la banda 3284 cm^{-1} se presenta una absorción debida al estiramiento de la amida del grupo NH.

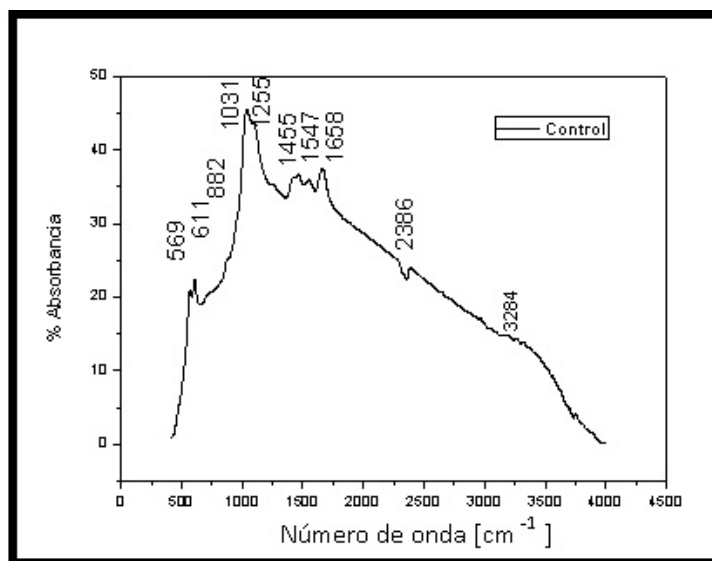


Grafico 6. IR - Espectro de absorbancia de la muestra del individuo control.

El ratón con astaxantina muestra el espectro de IR dado en el grafico 7; contiene picos en 566 cm^{-1} por la presencia de la molécula de HAP con un modo de vibración- flexión y de flexión en 603 cm^{-1} específicamente por fosfatos. El pico en 877 cm^{-1} es debido por la flexión de las moléculas hidrogeno-fosfatada cuando intercambia PO por CO. La molécula de fosfato P-O presenta un modo

de vibración de estiramiento asimétrico en 1031 cm^{-1} . El estiramiento junto con la flexión de NH de la molécula de amida III C-N tiene un pico en 1247 cm^{-1} . En 1411 cm^{-1} se presentan los carbonatos que intercambian el grupo OH por CO y en 1457 cm^{-1} esta misma presenta un modo de Flexión. Por otro lado, la amida I del grupo C=O manifiesta un estiramiento en 1658 cm^{-1} y en 2386 cm^{-1} se presenta el triple enlace $\text{C}\equiv\text{C}$ con un estiramiento y además a la posición en 3384 cm^{-1} se le atribuye a una absorción debida al estiramiento de la amina del grupo NH.

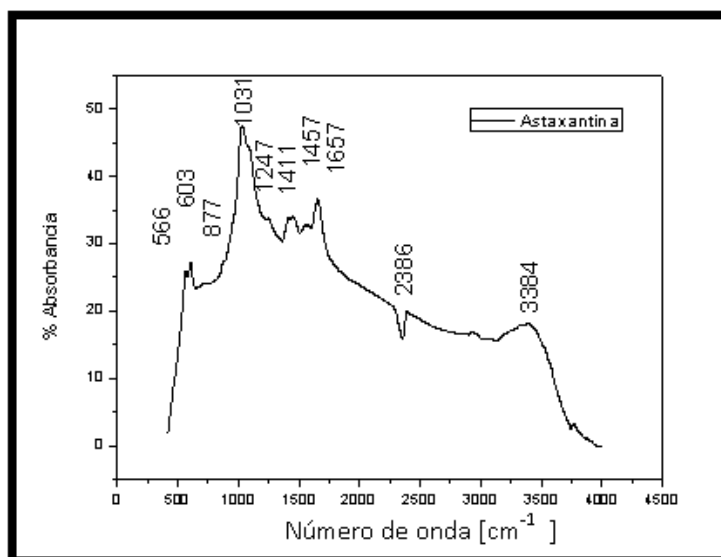


Grafico 7. IR - Espectro de absorbancia de la muestra del individuo suplementado con astaxantina.

El hueso del ratón con estrés (grafico 8) muestra un espectro con el siguiente comportamiento: en 565 cm^{-1} se presenta vibración de flexión de la molécula de HAP por los fosfatos con una descripción de movimiento de estiramiento. Para 607 cm^{-1} se representa la absorbancia de la amida VI. Por otro lado, la amida del tipo IV del grupo OCN aparece con flexión en 704 cm^{-1} , mientras que en 885 cm^{-1} ocurre la flexión de las moléculas de silicatos. El enlace P-O de la molécula de fosfato presenta un modo de vibración de estiramiento asimétrico en el pico 1030 cm^{-1} y 1090 cm^{-1} . La presencia de amida III CN con estiramiento-flexión del NH se ve reflejado en 1245 cm^{-1} . El pico de absorbancia en 1447 cm^{-1} es ocasionado por los carbonatos cuando intercambian el OH por CO y en 1578 cm^{-1} se da la presencia de la amida del tipo II. Para el grupo C=O de la amida I con estiramiento se representa en 1667 cm^{-1} . En 2390 cm^{-1} ocurre el triple estiramiento del enlace $\text{C}\equiv\text{C}$ y el estiramiento de la amina A del grupo NH se da alrededor de 3359 cm^{-1} .

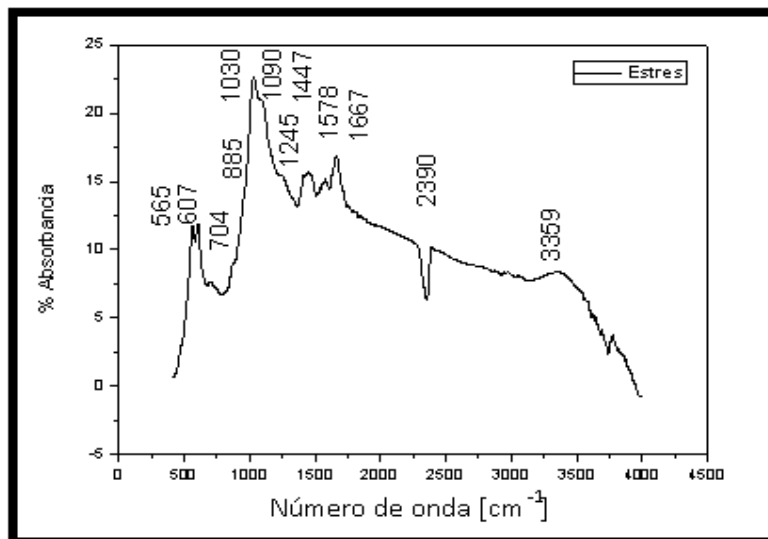


Grafico 8. IR - espectro de absorbancia de la muestra del individuo estresado.

El espectro de la muestra de hueso del ratón con estrés y suplementado con astaxantina (grafico 9) contiene picos en 561 cm^{-1} que corresponde a la molécula de HAP con un modo de vibración de flexión, concretamente por la presencia de fosfatos con una descripción de movimiento de estiramiento. En 605 cm^{-1} se produce el enlace C=O con flexión fuera del plano. Para el pico en 881 cm^{-1} se presentan movimientos de flexión de silicatos. Moléculas de fosfatos del tipo de enlace P-O presentan un modo de vibración del tipo de estiramiento asimétrico abarcando los picos 1040 cm^{-1} y 1105 cm^{-1} . Los carbonatos intercambian el grupo OH por CO en 1412 cm^{-1} y en 1466 cm^{-1} se flexionan. Además, se encontró el estiramiento a la amida I del grupo C=O debido a la absorbancia en 1666 cm^{-1} . En el pico 2395 cm^{-1} que representa el triple enlace C≡C con su vibración de estiramiento presenta una absorción- estiramiento de la amina del grupo NH.

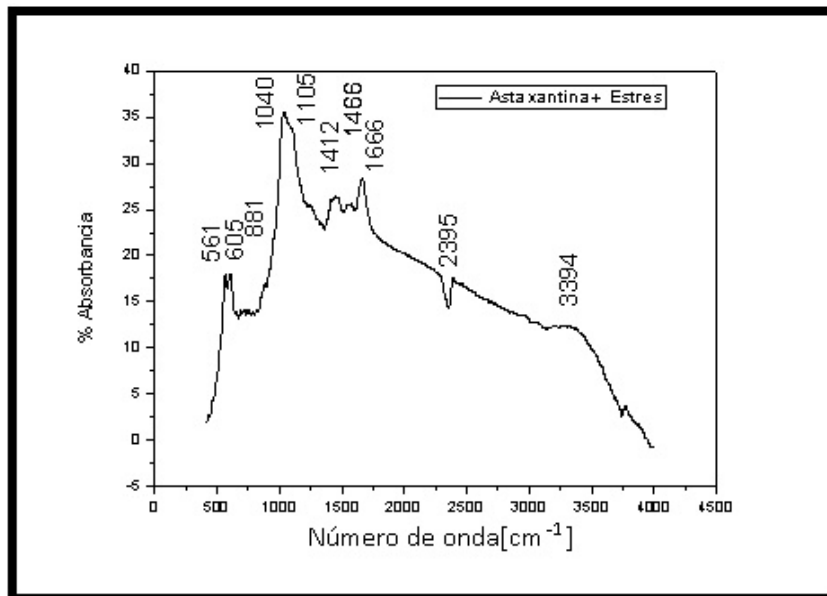


Grafico 9. IR - espectro de absorbancia de la muestra del individuo estresado y suplementado con astaxantina.

El grafico 10 nos muestra el comportamiento de los espectros IR con la presencia de las absorbancias de los grupos principales del hueso, en donde se puede observar que el uso de la astaxantina presenta un mayor porcentaje de absorción en moléculas minerales (fase inorgánica) del hueso como los fosfatos, hidroxilos y los carbonatos hidrogeno-fosfatada atribuidos a un aumento de mineralización de estas al hueso y una disminución en las amidas (fase orgánica), concluyendo que la astaxantina interactua mejor con la fase mineral. Además, la concentración de las moléculas principales disminuye dos terceras partes en los ratones estresados en comparación del ratón control, reafirmando los efectos que tiene el estres en este sistema, al igual que en la pruebas de microdureza el uso de la astaxantina cuando el individuo está estresado retrasa la perdida de minerales asi como colageno pero no por completo.

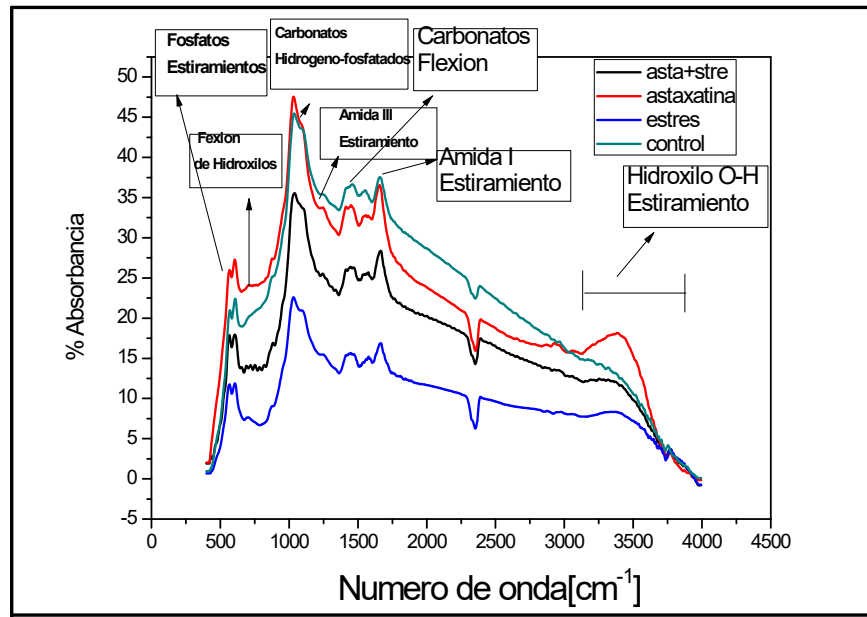


Grafico 10. IR - espectro de absorbanca de las muestras.

Los efectos del estrés oxidativo en el sistema óseo es poco estudiado pero se conoce que hay repercusiones en los otros sistemas [43-53] y como se puede observar mediante el análisis mediante IR y Microdureza el tejido óseo no es la excepción, considerando que el estrés oxidativo representa un daño a la salud que se tiene controlar/ tratar, este daño es por la muerte y envejecimiento de las células atribuidas a los radicales libres [72].

La propiedades protectoras de los antioxidantes carotenoides (astaxantina) ante los efectos del estrés oxidativo están por demás estudiadas [70] ya que se suele administrar el fármaco cuando el daño ya está presente, pero nunca sea estudiado a que grado retrasa este efecto. Mediante la comparación con una muestra patrón, se encontró que para el análisis estructural de los grupos funcionales y de la microdureza propia del sistema óseo, presenta una propiedad protectora aun que no del todo.

El hueso in-vivo es un sistema capaz de regenerarse automáticamente [71] por ende el uso de astaxantina puede producir la remineralización ante condiciones de estrés, es importante tomar en cuenta, la concentración suministrada y el tiempo de exposición, dado que la astaxantina puede llegar a producir un grado de sobremíneralización del hueso y provocar problemas de aumento de la microdureza y rigidez que facilitara la fractura de este, a si como un cambio estructural en los enlaces y concentraciones moleculares, además, no se recomienda el uso de antioxidantes en un organismo como se observa tanto en las graficas 5 y 10 ya que hay un cambio con el uso de la astaxantina en un individuo sano.

El presente trabajo demostró a groso modo las consecuencias del estrés en el hueso y el uso de astaxantina como protector del hueso, sin embargo aún queda mucho camino por recorrer ya que solo se utilizó una muestra de hueso para cada técnica de análisis, pero el grado de información que se obtuvo fue amplio, así que se deja el tema abierto para su posterior análisis con un mayor número de muestras para cada técnica y de este modo complementar la información de este trabajo a modo de establecer los rangos por los que se mueve cada uno de los parámetros (control, astaxantina, estrés, estrés + astaxantina) ayudaría a cuantificar de mejor manera las consecuencias del estrés y al mismo tiempo el uso de la astaxantina como protector.

6 Conclusiones.

- El estrés en el organismo tiene efectos significantes en el sistema óseo ya que promueve la desmineralización y baja actividad ósea 2/3 partes.
- El uso de antioxidantes como la astaxantina tiene la función de protector ante estímulos estresantes en el hueso debido a que disminuye los efectos en 1/3 parte.
- El estrés disminuye la microdureza en la parte central y el grado de concentración de grupos de moléculas funcionales presentes en el hueso.
- La suplementación de astaxantina estimula principalmente la fase inorgánica a la orgánica del sistema óseo debido a que los fosfatos presentes en el hueso interactúan con los grupos hidroxilos del antioxidante.
- La microdureza en el centro del hueso no se recupera al igual que las concentraciones de los grupos funcionales con la astaxantina ante el estrés.
- El estrés disminuye los picos de absorción de IR de los grupos funcionales del hueso a causa del efecto desmineralización en el hueso.

7 Bibliografía.

- [1] J.-Y. Rho et al. / *Medical Engineering & Physics* 20 (1998) 92–102.
- [2] P. Fratzl, R. Weinkamer / *Progress in Materials Science* 52 (2007) 1263–1334.
- [3] Carter DR, Hayes W. The compressive behavior of bone as a two-phase porous structure. *J Bone JtSurg* 1977;59A:954–62.
- [4] Gibson LJ. The mechanical behavior of cancellous bone. *J Biomech* 1985;18:317–28.
- [5] Bullough P. *Atlas of orthopaedic pathology*. New York: Gower Medical Publishing, 1992.
- [6] Ascenzi A, Bonucci E. The tensile properties of single osteons. *Anat Rec* 1967;158:375–86.
- [7] Katz LJ. Mechanical properties of bone. *ASME* 1981; AMD vol 45:171–184.
- [8] Marotti G. A new theory of bone lamellation. *Calcif Tissue Int* 1993;53(supple 1):S47–56.
- [9] Gong, J. K., Arnold, J. S., and Cohn, S. H. (1964), Composition of trabecular and cortical bone, *Anat. Rec.* 149:325–332.
- [10] Lowenstam, H. A., and Weiner, S. (1989), *On Biomineralization*, Oxford University Press, New York.
- [11] Jongpaiboonkit, L., Franklin-Ford, T., & Murphy, W. L. (2009). Growth of hydroxyapatite coatings on biodegradable polymer microspheres. *ACS applied materials & interfaces*, 1(7), 1504-1511.
- [12] Krajewski, A.; Mazzocchi, M.; Buldini, P. L.; Ravaglioli, A.; Tinti, A.; Taddei, P.; Fagnano, C. J. *Mol. Struct.* 2005, 744-747, 221-228.
- [13] Müller, F. A., Müller, L., Caillard, D., & Conforto, E. (2007). Preferred growth orientation of biomimetic apatite crystals. *Journal of Crystal Growth*, 304(2), 464-471.
- [14] Bernabéu Martínez, E., López-Oliva Muñoz, F., Larena Pellejero, A., Tur Gil, A., de la Piedra Gordo, M. C., & Montero Escobar, M. (2006). Estudio de la composición ósea para su apropiada regeneración con materiales implantados. *Patología del aparato locomotor*, 4(3), 202-207.
- [15] Delmas PD, Tracy RP, Riggs BL, Mann KG. 1984. *Calcif. Tissue Int.* 36:308.

- [16] <http://t0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQ18JaucN077OomKuCiGhwfZNQAAdyCcePCbX8aM5nF6VZyPYI5pc4oI4X0.54>
- [17] Hodge AJ, Petruska JA. 1963. In *Aspects of Protein Structure*, ed. GN Ramachandran, pp. 289–300. New York: Academic
- [18] Weiner, S., & Wagner, H. D. (1998). The material bone: structure-mechanical function relations. *Annual Review of Materials Science*, 28(1), 271-298.
- [19] Otsubo, K., Katz, E. P., Mechanic, G. L., & Yamauchi, M. (1992). Crosslinking connectivity in bone collagen . . . brils: the carboxy-terminal locus of free aldehyde. *Biochemistry*, 31(2), 396-402.
- [20] Landis, W. J., Hodgens, K. J., Arena, J., Song, M. J., & McEwen, B.F. (1996). Structural relations between collagen and mineral in bone as determined by high voltage electron microscopic tomography. *Microscopy research and technique*, 33(2), 192-202.
- [21] Fratzl, P., Gupta, H. S., Paschalis, E. P., & Roschger, P. (2004). Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nano-composite in bone. *Journal of materials chemistry*, 14(14), 2115-2123.
- [22] E. F. Eriksen, D. W. Axelrod and F. Melsen, in *Bone Histomorphometry*, Raven Press, New York, 1994.
- [23] B. M. Misof, P. Roschger, F. Cosman, E. S. Kurland, W. Tesch, P. Messmer, D. W. Dempster, J. Nieves, E. Shane, P. Fratzl, K. Klaushofer, J. Bilezikian and R. Lindsay, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2003, 88, 150–156.
- [24] Akkus, A. Polyakova-Akkus, F. Adar and M. B. Scherer, *J. Bone Miner. Res.*, 2003, 18, 1012–1019.
- [25] P. Roschger, S. Rinnerthaler, J. Yates, G. A. Rodan, P. Fratzl and K. Klaushofer, *Bone*, 2001, 29, 185–191.
- [26] P. Fratzl, N. Fratzl-Zelman and K. Klaushofer, *Biophys. J.*, 1993, 64, 260–266.
- [27] Zhang, C., Yang, J., Quan, Z., Yang, P., Li, C., Hou, Z., & Lin, J. (2009). Hydroxyapatite nano- and microcrystals with multiform morphologies: controllable synthesis and luminescence properties. *Crystal Growth and Design*, 9(6), 2725-2733.
- [28] Seeman E. Bone quality. *Osteoporos Int.* 2003;14Suppl 5:3-7.
- [29] Romberg, R. W., Werness, P. G., Riggs, B. L., & Mann, K. G. (1986). Inhibition of hydroxyapatite-crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins. *Biochemistry*, 25(5), 1176-1180.

- [30] Buckwalter, J. A., Glimcher, M. J., Cooper, R. R., & Recker, R. (1995). Bone biology. *J Bone Joint Surg Am*, 77(8), 1256-1275. 55
- [31] Levi, L. (1971). Society, stress and disease. En *The psychosocial environment and psychosomatic diseases*. London: Oxford University Press. Vol. I.
- [32] McEwen BS: Sex, stress, and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiol Aging* 2002; 23: 921–939
- [33] Selye, H. (1956). *The stress of life*. Nueva York: McGraw-Hill.
- [34] Pacák K, Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev*. 2001;22(4):502-48.
- [35] Goldstein, D. S. (2003). Catecholamines and stress. *Endocrine Regulations*, 37, 69–80.
- [36] Kvetnansky, R., & Miculaj, L. (1970). Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinology*, 87(4), 738-743.
- [37] Kvetnansky, R., Weise, V. K., & Kopin, I. J. (1970). Elevation of adrenal tyrosine hydroxylase and phenylethanolamine-N-methyl transferase by repeated immobilization of rats. *Endocrinology*, 87(4), 744-749.
- [38] Kvetnansky, R., Nemeth, S., Vígás, M., Oprsalova, Z., & Jurcovicova, J. (1984). Plasma catecholamines in rats during adaptation to intermittent exposure to different stressors. *Stress: The role of catecholamines and other neurotransmitters*, 1, 537-562.
- [39] Stone, E. A., & McCarty, R. (1983). Adaptation to stress: Tyrosine hydroxylase activity and catecholamine release. *Neuroscience & Behavioral Reviews*, 7(1), 29-34.
- [40] Dobráková, M., Kvetnanský, R., Opršalová, Z., & Jeová, D. (1993). Specificity of the effect of repeated handling on sympathetic-adrenomedullary and pituitary-adrenocortical activity in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 18(3), 163-174.
- [41] Weinshilboum, R. M., Kvetnansky, R., Axelrod, J., & Kopin, I. J. (1971). Elevation of serum dopamine hydroxylase activity with forced immobilization. *Nature*, 230(17), 287-288.
- [42] Zavala, L. E., Cierco, M., Gutiérrez, A., del Rosario Garrido, M., & Israel, A. (2007). Papel del sistema renina angiotensina en la respuesta simpática inducida por la prueba presora al frío en humanos. *Investigación Clínica*, 48(2).

- [43] Ortiz, G. G., Moisés, F. P. P., Mireles-Ramírez, M., Flores-Alvarado, L. J., González-Usigli, H., Sánchez-González, V. J., ...&Rivero-Moragrega, P. (2017). Chapter One-Oxidative Stress: Love and Hate History in Central 56 Nervous System. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 108, 1-31.
- [44] Papas, A. M. (Ed.). (1998). *Antioxidant status, diet, nutrition, and health* (Vol. 9). CRC press.
- [45] Gemma, C., Vila, J., Bachstetter, A., & Bickford, P. C. (2007). Oxidative stress and the aging brain: from theory to prevention.
- [46] Finkel T. Radical medicine: treating ageing to cure disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:971–6.
- [47] Kim MS, Park JY, Namkoong C, Jang PG, Ryu JW, Song HS, et al. Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2004;10:727–33.
- [48] Klaus S, Pultz S, Thone-Reineke C, Wolfram S. Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation. *Int J Obes (Lond)* 2005;29:615–23.
- [49] Ridinger MH. Nutraceuticals: miracle or meme? *ClinPharmacolTher* 2007;82:352–6.
- [50] Kamel NS, Gammack J, Cepeda O, Flaherty JH. Antioxidants and hormones as antiaging therapies: high hopes, disappointing results. *Cleve Clin J Med*.
- [51] Jáuregui, M. E. C., Carrillo, M. D. L. C. C., & Romo, F. P. G. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos latinoamericanos de nutricion*, 61(3), 233.
- [52] Mortensen, A. et al. (1997) Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. *FEBS Lett.* 418, 91–97
- [53] Beutner, S. et al. (2001) Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of b-carotene in antioxidant functions. *J. Sci. Food Agric.* 81, 559–568.
- [54] Melendez-Martinez AJ, Vicario IM, Heredi FJ. Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Arch LatNutr.* 2004; 54(2): 209-215.
- [55] Lorenz, R.T. and Cysewski, G.R. (2000) Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin. *TrendsBiotechnol.* 18, 160–167

- [56] Guerin, M., Huntley, M. E., & Olaizola, M. (2003). Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *TRENDS in Biotechnology*, 21(5), 210-216. 57
- [57] Stuart, Barbara, H. *INFRARED SPECTROSCOPY: FUNDAMENTALS AND APPLICATIONS*. University of Technology, John Wiley & Sons, Ltd., Sydney, Australia, 2004.
- [58] Callister, W. D. (2002). *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales (Vol. 1)*. Reverté.
- [59] Jastrzebski, Z.D. *Naturaleza y propiedades de los materiales para ingeniería*. Segunda edición, Interamericana, Mexico, 1979.
- [60] Askeland, D. R., & Phulé, P. P. (1998). *Ciencia e Ingeniería de los Materiales (Vol. 3)*. International Thomson Editores.
- [61] Pina Barba, Maria Cristina. *La Física en la Medicina*. Segunda edición, La Ciencia paratodos, 1998.
- [62] Chicot, D., Mercier, D., Roudet, F., Silva, K., Staia, M. H., & Lesage, J. (2007). Comparison of instrumented Knoop and Vickers hardness measurements on various soft materials and hard ceramics. *Journal of the European Ceramic Society*, 27(4), 1905-1911.
- [63] *BUEHLER MICROMET5101, Microindentation Hardness Tester*.
- [64] Schrader, B. (Ed.). (2008). *Infrared and Raman spectroscopy: methods and applications*. John Wiley & Sons.
- [65] Cowin, S. C. (Ed.). (2001). *Bone mechanics handbook*. CRC press.
- [66] Kumar, A. R., & Kalainathan, S. (2008). Growth and characterization of nano-crystalline hydroxyapatite at physiological conditions. *Crystal Research and Technology*, 43(6), 640-644.
- [67] Petibois, C., Gouspillou, G., Wehbe, K., Delage, J. P., & Déléris, G. (2006). Analysis of type I and IV collagens by FT-IR spectroscopy and imaging for a molecular investigation of skeletal muscle connective tissue. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 386(7-8), 1961-1966.
- [68] Paschalis, E. P., Mendelsohn, R., & Boskey, A. L. (2011). Infrared assessment of bone quality: a review. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 469(8), 2170-2178.
- [69] Sequeda, L. G., Díaz, J. M., Gutiérrez, S. J., Perdomo, S. J., & Gómez, O. L. (2012). Obtención de hidroxapatita sintética por tres métodos diferentes y su caracterización para ser utilizada como sustituto óseo. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 41(1), 50

- [70] Takeda, H., Tominari, T., Hirata, M., Watanabe, K., Matsumoto, C., Grundler, F. M., ...&Miyaura, C. (2017). Lutein Enhances Bone Mass by Stimulating Bone Formation and Suppressing Bone Resorption in Growing Mice. *Biological and Pharmaceutical Bulle.*
- [71] Ross, M. H., & Pawlina, W. (2007). *Histology: Interactive Atlas to Accompany Histology: a Text and Atlas; with Correlated Cell and Molecular Biology.* CD-ROM. Lippincott, Williams & Wilkins.
- [72] Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de medicina militar*, 31(2), 126-133.