



ARTÍCULO 4

Evaluación de seguridad de la meso-zeaxantina.

ABSTRACTO:

La meso-zeaxantina es un miembro de la familia de las xantofilas de los carotenoides. Al tener estructuras estrechamente relacionadas, la mesozeaxantina, la zeaxantina y la luteína tienen una alta concentración en la mácula y se cree que juegan un papel importante en la protección de los constituyentes de la retina de los radicales libres. Debido a las dificultades técnicas actuales en medición, la presencia de meso-zeaxantina en sangre o tejidos humanos no ha sido reportada excepto en los ojos humanos, lo que ha promovido el interés de los científicos en explorar los posibles beneficios de la meso-zeaxantina para la salud. Aquí, informamos una evaluación completa de seguridad toxicológica de meso-zeaxantina para su uso como ingrediente en alimentos, suplementos dietéticos y nutricionales, así como en alimentos médicos.

Se realizaron ensayos de toxicidad aguda, toxicidad genética (prueba de Ames, micro núcleo de eritrocitos de médula ósea de ratones y anormalidad de esperma de ratones) y toxicidad subcrónica de 90 días. En las pruebas de toxicidad oral aguda, la dosis máxima tolerable fue más de 10.0 g / kg pc en ratas SD y ratones ICR, y no mostró signos toxicológicos durante el periodo del estudio. Los resultados de las pruebas para tres términos de toxicidad hereditaria (prueba de Ames, ratones micro núcleo de eritrocitos de médula ósea y anormalidad de esperma de ratones) fueron negativos. Por 90 días alimentación de meso-zeaxantina a la dosis de 300 mg / kg / día en ratas SD machos y hembras, no hay notables efectos toxicológicos observados.

Por lo tanto, la meso-zeaxantina no tiene toxicidad aguda ni genotoxicidad y el uso de meso-zeaxantina es seguro a dosis de 300 mg / kg pc / día en ratas según el estudio de 90 días de alimentación. Después de la aplicación de un factor de seguridad de 100 veces, obtuvimos la IDR (ingesta diaria recomendada) con valor de 3 mg / kg de peso corporal por día.

Introducción:

Los pigmentos carotenoides de la mácula se conocen colectivamente como pigmentos maculares, compuestos de carotenoides oxigenados luteína y zeaxantina. El cuerpo humano no puede sintetizar los pigmentos maculares y dependen completamente de la ingesta de dieta (Landrum & Bone, 2001).

La meso-zeaxantina es un miembro único de la familia de las xantofilas de los carotenoides. A diferencia de otros carotenoides, la meso-zeaxantina y su estereoisómero, zeaxantina, y su isómero estructural, luteína, tienen altas concentraciones particulares en la mácula (Landrum & Bone, 2001). Se cree que la meso-zeaxantina, la zeaxantina y la luteína desempeñan papeles importantes en la protección de los componentes de la retina frente a los radicales libres (Li, Ahmed y Bernstein, 2010; Wooten y Hammond, 2002).

Los científicos se interesaron en explorar los posibles beneficios para la salud de la meso-zeaxantina porque generalmente no se encuentra meso-zeaxantina en la sangre humana u otros tejidos orgánicos,

pero puede ser encontrado en los ojos humanos, especialmente en la fovea. La meso-zeaxantina representa aproximadamente un tercio del pigmento macular total en la fovea de la retina, mientras que 15% en toda la retina (Bone, Landrum, Hime, Cains y Zamor, 1993; Chang, 2006; Landrum y Bone, 2001), lo que sugiere que la meso-zeaxantina podría surgir en los ojos en lugar de otros tejidos orgánicos (Bone et al., 1997; Loane, Kelliher, Beatty y Nolan, 2008; Neuringer, Sandstrom, Johnson y Snodderly, 2004).

Se ha reportado que el mecanismo de la meso-zeaxantina de proteger la salud de los ojos incluye al menos dos aspectos: absorción de luz azul dañina de alta energía y también posee fuertes propiedades antioxidantes. Como colorantes naturales y también por su papel en la salud humana, xantofilas como la luteína, (R, R) -zeaxantina y (R, S) - zeaxantina han atraído mucha atención de científicos e investigadores en los campos biomédico, químico y nutricional en años recientes (Bone, Landrum, Alvarez-Correa, Eeienne y Ruiz, 2003; Bone, Landrum, Cao, Howard y Alvarez-Calderon, 2007; Connolly et al., 2011; Connolly, Beatty, Loughman y Nolan, 2010; Firdous, Preethi y Kuttan, 2010).

Hace unos años, Chang (2006) examinó la toxicidad potencial de meso-zeaxantina en un estudio de 13 semanas consecutivas con alimentación por sonda con dosis de hasta 200 mg / kg en ratas Han Wistar y no encontraron signos de toxicidad. Aquí informamos nuestra evaluación exhaustiva y evaluación toxicológica de meso-zeaxantina en modelo de roedor, como genotoxicidad, toxicidad oral aguda, y sub-cronotoxicidad, para servir científicamente como datos seguros y sin nivel de efectos adversos observados (NOAEL) en mesozeaxantina de la misma forma.

2. Materiales y métodos

2.1. Preparación de meso-zeaxantina.

La meso-zeaxantina (lote # 100303) fue proporcionada por Zhejiang Medicine CO., Ltd., Xinchang Pharmaceutical Factory, Xinchang, Zhejiang, China. El contenido de meso-zeaxantina en las xantofilas totales es superior al 85%, que se ha cuantificado por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) utilizando una columna quiral (Chiral PAK AD-H 5 mm, 250 4,6 mm). Las condiciones de HPLC son las siguientes: fase móvil isocrática, n-hexano: etanol: isopropilo ¼ 80:10:10; temperatura de la columna, 35 ° C; caudal, 0,5 ml / min; longitud de onda, 453 nm; volumen de inyección, 20 ml. La sustancia se almacenó en el aire. recipiente hermético y resistente a la luz en un lugar frío a 4 C no más seis meses antes de su consumo

2.2. Animales y alojamiento de animales

Se compraron ratones ICR machos y hembras y ratas SD del centro de animales experimentales de la provincia de Zhejiang, China (licencia de reproducción de animales de laboratorio # SCXK (Z) 2008-0033). El alimento para los animales se compró a la misma compañía (estándar operativo # GB14924.1-2001). Los estudios se realizaron de conformidad con buenas prácticas de laboratorio (BPL) en el Centro para el Control de Enfermedades y Prevención de Zhejiang (ZJCDC) (permiso de uso de animales de laboratorio #SYXK [Z] 2008-0106). La temperatura se controló a 22 ° C 24 ° C; Se controló la humedad relativa al 50% a 70% y se controló la luz mantenido como un ciclo de luz oscura de 12 h durante todo el período de prueba. Todos los animales fueron examinados por sus condiciones físicas generales tras la adopción y aclimatado durante 3 días antes de cualquier prueba. Antes de administrar alimentación con meso-zeaxantina, los animales fueron ayunados durante la noche, con suministro de agua ilimitado.

2.3. Formulación de dosis

En este estudio, cada suspensión de dosificación se preparó individualmente mezclando meso-zeaxantina con agua destilada en un homogeneizador. Cada dosis está estandarizada a meso-zeaxantina pura en función de su pureza. Las formulaciones de dosificación se almacenaron a 4 ° C, se homogeneizaron diariamente durante al menos 2 minutos y se dejaron calentar a temperatura ambiente antes de la administración.

2.4. Diseños y métodos experimentales.

2.4.1 Prueba de toxicidad oral aguda en ratas SD

La prueba de dosis máxima tolerable (DMT) se realizó porque la meso-zeaxantina no había sido reportada por su toxicidad o efectos adversos en el ser humano. Veinte ratas SD, diez machos y diez hembras, que pesaron de 180 a 220 g, se usaron en esta prueba de DMT. La mesozeaxantina (50,0 g) se mezcló con agua destilada hasta un volumen total de 200 ml y se administró dos veces a intervalos de 4 h, 20 ml /kg pc para cada administración oral, la dosis acumulada de meso-zeaxantina fue igual a 10.0 g / kg pc. Los signos toxicológicos y la morbilidad se monitorearon y registraron diariamente durante un período de dos semanas después de la administración de sonda intragástrica (lg).

2.4.2 Prueba de toxicidad oral aguda en ratones ICR

Se realizó la prueba de dosis máxima tolerable (MTD). Se usaron veinte ratones ICR (diez machos y diez hembras), pesando entre 18 a 22 g. Se mezcló meso-zeaxantina (50,0 g) con agua destilada hasta un volumen total de 200 ml y fue administrado dos veces a intervalos de 4 h, 20 ml / kg de peso corporal para cada administración oral, la dosis acumulada de meso-zeaxantina fue de 10.0 g / kg de peso corporal. Los signos toxicológicos y morbilidad fueron monitoreados y registrados diariamente durante dos semanas después de administración de lg.

2.4.3 Prueba de Ames

La prueba de Ames se realizó con y sin activación metabólica. El sobrenadante S9 se obtuvo del hígado de rata SD inducido por PCB homogeneizado, y probado por 2-AF y 1,8-dihydroxiantraquinona para confirmar su bioactividad. Cuatro deficientes en histidina certificados cepas de Salmonella typhimurium TA97, TA98, TA100 y TA102 fueron proporcionados por el departamento de toxicología de los CDC de Shanghai, China. El método de incorporación de placa se utilizó en la prueba de Ames. La dosis máxima fue de 5000 mg / plato. 1 g de muestras de meso-zeaxantina y agua destilada se esterilizaron y se mezclaron para hacer 20 ml de solución de muestra con una concentración de 50,000 mg / ml.

La solución resultante (0,1 ml) se añadió a cada placa de Petri, que es equivalente a 5000 mg / plato. Las cuatro dosis de prueba de mesozeaxantina fueron 5000, 1000, 200 y 40 mg / plato, respectivamente.

Los grupos de control combinado, control negativo de solvente (agua destilada) y controles positivos específicos de la cepa se incluyeron en cada prueba. Todas las cepas se probaron usando tres placas por dosis. Las pruebas fueron repetidas bajo las mismas condiciones para confirmar los resultados. El número de colonias revertidas se contaron con o sin activación metabólica (S9) y en comparación con el número de colonias reversibles espontáneas del grupo de control en blanco y el grupo de control de solvente negativo, respectivamente. La sustancia de prueba se considera mutagénica si las colonias revertidas son dos pliegues o más que el número de colonias reversibles espontáneas en placas de control de solventes negativas. Se observó una relación dosis respuesta en al menos dos concentraciones

2.4.4 Ensayo de micro núcleos de eritrocitos de médula ósea en ratones

Cincuenta de los ratones ICR, que pesaron 25-30 g, veinticinco machos y veinticinco mujeres, se dividieron en cinco grupos al azar.

La ciclofosfamida (60 mg / kg pc) se administró como control positivo y agua destilada se utilizó como control negativo. Los niveles de dosis de mesozeaxantina de los grupos de prueba fueron 1.25, 2.5 y 5.0 g /kg de peso corporal, respectivamente. Las muestras de prueba se prepararon mezclando mesozeaxantina (2.5, 5.0 y 10.0 g) con agua destilada hasta un volumen total de 40 ml, para obtener las concentraciones de 0.0625, 0.125, 0.25 g / ml, respectivamente. Los materiales de prueba fueron administrados por Ig dos veces a 20 ml / kg de peso corporal a intervalos de 24 h. La luxación de la vértebra por ejecución vía cervical se realizó 6 h después de la última administración de dosis. Se extrajo el hueso del esternón y las células de la médula ósea fueron retiradas y mezcladas con suero fetal bovino inmediatamente siguiendo el sacrificio. Una gota de la mezcla se untó sobre un portaobjetos limpio y secado al aire. Los portaobjetos fueron brevemente flameados, luego reparados con inmersión en metanol al 95% durante 10 min, y teñidos ordinariamente en tinción de frascos con Giemsa Working Solution durante 15 min. Los portaobjetos se lavaron suavemente con ddH₂O (agua doblemente destilada), se secaron al aire y se cubrieron con un portaobjetos para su examen con microscopio. Todos los portaobjetos fueron codificados para garantizar que la evaluación fue cegada. Las frecuencias de micro núcleos se determinaron para cada animal contando 1000 de eritrocitos policromáticos (PCE) y la aparición de micro núcleos tasa por mil PCE se registró. La proporción de eritrocitos inmaduros (es decir, PCE) a eritrocitos totales (RBC) se determinó para cada animal contando un total de 200 eritrocitos. La SD media de la tasa de aparición de micro núcleos y relación PCE / RBC de cada grupo se comparó con el software SPSS11.0.

2.4.5.5. Prueba de anormalidad espermática en ratones

Treinta y cinco ratones machos ICR, pesando entre 25 y 30 g, se dividieron en cinco grupos al azar. Las muestras de prueba fueron preparadas por mezclar mesozeaxantina (2.5, 5.0 y 10.0 g) con agua destilada hasta un volumen total de 40 ml, para obtener las concentraciones de 0.0625, 0.125, 0.25 g / ml, respectivamente. La mitomicina C (MMC) (2.0 mg / kg pc) se usó como control positivo y se usó agua destilada como control negativo. Los niveles de dosis de mesozeaxantina de grupos de prueba fueron 1.25, 2.5, 5.0 g / kg de peso corporal, respectivamente. Se produjeron intubaciones diariamente a 20 ml / kg de peso corporal durante 5 días. Cinco ratones fueron seleccionados al azar en cada grupo. La ejecución se realizó a través de la vértebra cervical 35 días después de la administración de la primera dosis. Epidídimo se aisló y se colocó en un plato plano que contenía 2 ml de NaCl al 0,9% solución. El epidídimo se cortó mediante el uso de tijeras de oftalmología longitudinalmente una o dos veces, se dejaron asentar por 3e 5 min, vibró suavemente y se filtró con cuatro capas de papel de limpieza de microscopía. Una gota del filtrado se untó sobre un tobogán limpio y secado al aire. Los portaobjetos se repararon con inmersión en metanol al 95% durante 5 minutos, teñido con colorante de eosina al 1% durante 1 hora, se lavó suavemente con ddH₂O y se secó al aire. La morfología del espermatozoides fue examinado a gran aumento. Un total de 1000 espermatozoides fueron contados para cada animal en un microscopio óptico. El porcentaje de anomalías se calculó, primero como un total, luego clasificado en relación con la ubicación específica de cada anomalía en el espermatozoides.

2.4.6. Estudio de alimentación de 90 días

Ochenta ratas SD se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos, se utilizaron 20 ratas (10 machos y 10 hembras) en cada grupo. Las ratas eran enjauladas individualmente en jaulas de malla abierta de acero inoxidable, comiendo y bebiendo libremente durante el período de estudio. El experimento se realizó en

tres grupos de dosificación y un control negativo (destilado grupo de agua). Los niveles de dosis de mesozeaxantina fueron 300 (bajo grupo de dosis), 600 (grupo de dosis intermedia), 1200 mg / kg pc / día (grupo de dosis alta), respectivamente. Se tomaron muestras de 7,5 g, 15 gy 30 g medidas y diluidas con agua destilada hasta un volumen total de 250 ml para producir las concentraciones de 0.03, 0.06, 0.12 g / ml, respectivamente. Las soluciones de muestra de prueba se administraron con Ig a nivel de 10 ml / kg pc / día durante 13 semanas consecutivas. El volumen administrado se calculó en función de la medida más reciente de peso corporal. Los grupos de control fueron tratados con el mismo procedimiento. Se realizaron observaciones rutinarias en todos los animales una vez al día durante todo el período de estudio para el comportamiento general y signos toxicológicos. Peso corporal, consumo de alimento (alimento agregado / alimentación izquierda), así como exámenes físicos se realizaron semanalmente. En la mitad del estudio (día 42), los animales fueron sometidos a ayuno durante 16 h, se tomaron muestras de sangre de la vena caudal y se analizaron utilizando el contador automático de células sanguíneas MEK-6318K para medición hematológica, parámetros que incluyen hemoglobina (HB), sangre roja recuento de células (RBC) y recuento de glóbulos blancos (WBC). Muestras de sangre se recogieron del seno orbital y se analizó el suero utilizando el analizador de bioquímica automático TBA-40FR para medición de bioquímica clínica, parámetros que incluyen alanina aminotransaminasa (ALT), aspartato amino-transferasa (AST), urea en sangre nitrógeno (BUN), creatinina (Cr), lipoproteína (CHOL), triglicéridos (TG), glucosa en sangre, proteína total, albúmina y globulina (GLU). En el período posterior del experimento (un día después de la última dosis en día 90), los animales estuvieron en ayunas durante 16 a 18 h, luego se tomaron muestras de sangre recogidas y el análisis de hematología y bioquímica clínica se llevaron a cabo como se describe anteriormente. Necropsia luego de tomar las muestras de sangre se realizaron de forma exhaustiva y sistemática mediante la disección de las vísceras. Hígado, riñón, bazo, testículos / ovarios se pesaron y calcularon en relaciones de peso de órgano a cuerpo, e hígado, riñón, bazo, estómago, intestino y testículos / ovarios fueron examinados histopatológicamente (sección de parafina, H-E tinción, examen microscópico).

2.5. Análisis estadístico

El sistema estadístico SPSS se utilizó para analizar los datos de homogeneidad de varianza. Los datos homogéneos se analizaron utilizando un Análisis de varianza unidireccional (ANOVA), los datos heterogéneos se analizaron mediante la prueba de suma de rangos, y la importancia de las diferencias entre los grupos de control y tratamiento fue evaluada utilizando la prueba t para comparaciones por pares con el control grupo. Todas las pruebas estadísticas se realizaron a $P < 0.05$ y $P < 0.01$ de niveles de significancia.

3. Resultados

3.1. Prueba de toxicidad oral aguda en ratas SD

La exploración de la prueba de dosis máxima tolerable (MTD) fue realizada para examinar la toxicidad aguda en animales. Se realizó un estudio de toxicidad en 10 machos y 10 hembras de ratas SD con una dosis de 10.0 mg / kg de peso corporal. El peso corporal de los animales a el comienzo de la prueba fue 192.6 5.5 g para mujeres y 193.8 5.4 g para ratas macho. Al final de la prueba, el peso corporal para las ratas hembras fue de 277.9 11.8 gy para los machos 320.8 8.3 g. Allí no se observaron ratas muertas, significa que no hubo mortalidad en esta prueba y en el período de tiempo especificado de 14 días y el rango de dosificación aplicado. Por lo tanto, los resultados de la prueba de toxicidad oral aguda en ratas SD independientemente del perfil de género mostró que las ratas alimentadas con 10.0 g / kg de peso corporal de mesozeaxantina por administración de Ig no expresaron efectos toxicológicos y no se observó morbilidad en el período de monitoreo de 14 días. Por lo tanto, la toxicidad oral aguda MTD de mesozeaxantina en ambas ratas SD machos y hembras superan los 10,0 g / kg de peso corporal.

3.2. Prueba de toxicidad oral aguda en ratones ICR

Además de las ratas SD, la prueba de dosis máxima tolerable (MTD) fue también realizada en ratones ICR. La prueba de toxicidad oral aguda en ratones ICR, 10 hombres y 10 mujeres, tampoco han dado como resultado hallazgos de toxicidad. El peso corporal al comienzo de la prueba fue de 19.5 1.0 g para mujeres y 18.6 0.5 g para hombres, y peso corporal al final de prueba fue 30.1 1.9 g para hembras y 37.9 1.4 g para ratones machos. Los ratones ICR machos y hembras alimentados con 10,0 g / kg pc de mesozeaxantina por administración de Ig, se observaron sin efectos toxicológicos y sin morbilidad durante el período de observación. Por lo tanto, la toxicidad oral aguda MTD de meso-zeaxantina en hombres y mujeres ICR son más de 10.0 g / kg de peso corporal.

3.3. Prueba de Ames

La prueba de Ames es el método tradicional más utilizado para examinar la genotoxicidad de un compuesto o agentes. En nuestro estudio, la prueba se realizó en el sobrenadante S9 obtenido de PCB inducido de SD homogeneizado de hígado de rata. Los resultados de la prueba de Ames ilustrados en la Tabla 1 son dos grupos de datos de dos conjuntos completamente diferentes de experimentos. Los dos conjuntos de datos en la Tabla 1 mostraron explícitamente que no hubo hallazgos de citotoxicidad (tasa reducida de colonias espontáneas y adelgazamiento visible del césped bacteriano) en todas las dosis de prueba de meso-zeaxantina. El número medio de revertantes por placa de grupos de tratamiento con meso-zeaxantina en niveles de dosis de cuatro cepas, TA97, TA98, TA100 y TA102, con o sin S9 fueron negativos. Ninguno de los grupos tratados tiene dos pliegues o más recuentos que el control general y el solvente control, y no se observó relación dosis-dosis. Los controles positivos de los mutágenos indujeron el aumento de colonias revertantes, confirmando la validez del ensayo. Los resultados de la prueba de Ames indican que la mesozeaxantina no tiene toxicidad genética.

3.4. Ensayo de micro núcleos de eritrocitos de médula ósea de ratones.

Los resultados de los micro núcleos de eritrocitos de médula ósea de ratones en el ensayo se muestra en la Tabla 2. El micro núcleo de los grupos de tratamiento con meso-zeaxantina en todos los niveles de dosis y el control negativo grupo fueron significativamente más bajos que los del grupo de control positivo tratado con ciclofosfamida ($P < 0.01$), confirmando la validez del juicio. No hubo diferencias significativas de micro núcleos. entre el grupo de control negativo y la meso-zeaxantina en grupos de tratamiento ($P > 0.05$). La relación PCE / RBC de cada grupo fue dentro del rango normal. El resultado demuestra que la meso-zeaxantina no es mutagénica en el rango de dosificación probado.

3.5. Prueba de anormalidad espermática de ratones

Los resultados del ensayo de anormalidad espermática de ratones se mostraron en la tabla 3. La anormalidad espermática del tratamiento con meso-zeaxantina de los grupos en todos los niveles de dosis no tuvieron diferencias significativas en comparación con el grupo de control negativo ($P > 0.05$). La anormalidad de los espermatozoides en relación en todos los grupos de tratamiento y el grupo de control negativo fue significativamente menor que los del grupo de control positivo tratados con Mitomicina C (MMC) a 2.0 mg / kg ($P < 0.01$).

3.6. Estudio de toxicidad oral subcrónica de 90 días

3.6.1. Meso-zeaxantina en observaciones clínicas

Sin fallecimiento, sin comportamientos anormales, ni signos físicos de toxicidad se observaron para las ratas SD durante todo el periodo de experimento.

3.6.2. Efectos de la meso-zeaxantina en el peso corporal

En ratas SD, los efectos a largo plazo de la meso-zeaxantina en el peso corporal se enumeran en la Tabla 4, con resumen grupal e individual de datos de peso corporal. Los datos sin procesar fueron consistentes con los requisitos de homogeneidad de varianza ($P > 0.05$). Los pesos corporales de los grupos tratados con mesozeaxantina en todos los niveles de dosis no tuvieron resultados con diferencias significativas ($P > 0.05$) en comparación con el grupo de control negativo, mostrando que la meso-zeaxantina no tiene efectos sobre el peso corporal, siendo un biomarcador sin daños.

3.6.3. Efectos de la meso-zeaxantina en el consumo y eficiencia de alimentación.

Los datos de consumo y eficiencia de alimentación de ratas SD (Tabla 5 y datos suplementarios) en 90 días de estudio demostraron ser consistente con los requisitos de homogeneidad de varianza ($P > 0,05$). El consumo de alimento y la eficiencia alimenticia de los grupos de tratamiento con mesozeaxantina en todos los niveles de dosis no tuvieron resultados con diferencias significativas ($P > 0.05$) en comparación con las del control negativo grupo (Tabla 5 y más datos en materiales complementarios). Ahí no se han notado datos anormales en el consumo de alimento y la eficiencia de alimentación de ratas SD.

3.6.4. Efectos de la meso-zeaxantina en la eficiencia alimenticia total.

Los datos de eficiencia de alimentación total de ratas y ratones SD en trece semanas de estudio se muestran en la Tabla 5. De la Tabla 5 notamos que todos los datos en bruto, excepto aquellos de ratas hembras en 1 a 6 semanas fueron consistentes con los requisitos de homogeneidad de varianza ($P > 0.05$). Aunque los datos en bruto de las ratas hembras en 1 a 6 semanas fueron inconsistentes con los requisitos de homogeneidad de varianza después de la conversión, no hay diferencias (prueba de suma de rangos, $P > 0.05$) en comparación con el grupo de control negativo después de que se analizaron mediante la prueba de Rango-Suma. Datos de ganancia de peso corporal, consumo de alimento y eficiencia alimenticia de los grupos de tratamiento con meso-zeaxantina en todos los niveles de dosis no tuvieron diferencias significativas ($P > 0.05$) en comparación con el grupo de control negativo en el período de 1 a 6 semanas, 7 a 13 semanas y 1 a 13 semanas (ANOVA, $P > 0.05$).

3.6.5. Efectos de la meso-zeaxantina en la hematología.

Se examinaron los efectos de la meso-zeaxantina en la hematología en ratas SD (10 ratas hembras y 10 machos). Encontramos que todos los datos hematológicos estaban en el rango normal (Tabla 6 y materiales suplementarios). Los datos brutos fueron consistentes con los requisitos de homogeneidad de varianza ($P > 0.05$). HB, RBC y WBC de los grupos de tratamiento con meso-zeaxantina en todos los niveles de dosis no tuvieron diferencias significativas (ANOVA, $P > 0.05$) en comparación con el grupo de control negativo en los períodos medio y final del estudio de trece semanas, que indica que no hay efectos adversos de meso-zeaxantina en la hematología de ratas SD.

3.6.6. Efectos de la meso-zeaxantina en el WBC

En la categoría WBC, linfocitos, monocitos y granulocitos fueron examinados por su potencial anormalidad causada por meso-zeaxantina. Todos los parámetros de datos de WBC examinados en ratas SD fueron en el rango normal (datos ver datos en materiales suplementarios). los datos fueron consistentes con los requisitos de homogeneidad de varianza ($P > 0.05$). Linfocitos, monocitos y granulocitos de los grupos tratados con meso-zeaxantina en todos los niveles de dosis no tuvieron diferencias significativas (ANOVA, $P > 0.05$) en comparación con los grupos de control negativo en los períodos medio y final de las trece semanas estudiadas.

3.6.7. Efectos de la meso-zeaxantina en la bioquímica clínica de la sangre.

Se midieron los parámetros de bioquímica sanguínea clínica a mitad de camino y de terminación y los valores se muestran en la Tabla 7, todos los datos estaban en el rango normal y no se observaron efectos adversos. Los datos sin procesar fueron consistentes con los requisitos de homogeneidad de varianza (ANOVA, $P > 0.05$). Diez parámetros, a saber, ALT, BUN, Cr, COL, TG, glucosa en sangre, proteína total, albúmina, GLU y albúmina / GLU, de los grupos tratados con meso-zeaxantina en todos los niveles de dosis se mostraron sin diferencias significativas (ANOVA, $P > 0.05$) en comparación con el grupo de control negativo en el período medio de las trece semanas estudiadas. Observamos que los niveles de AST en todos los grupos de dosis de ratas hembras y en los grupos de ratas macho a dosis bajas e intermedias no tuvieron diferencias significativas (ANOVA, $P > 0.05$) en comparación con el grupo de control negativo, mientras que los niveles de AST solo a dosis altas (1200 mg / kg de peso corporal / día) en grupos de ratas macho tuvieron diferencias significativas (ANOVA, $P < 0.05$) en comparación con el grupo de control negativo. Los parámetros clínicos de bioquímica sanguínea en la terminación también fueron medidos y todos los datos estaban en el rango normal (datos mostrados en materiales suplementarios). Los datos sin procesar fueron consistentes con el requisito de homogeneidad de varianza ($P > 0.05$). De nuevo, se midieron diez parámetros, es decir, ALT, AST, BUN, Cr, CHOL, TG, glucosa en sangre, proteína total, albúmina, GLU y albúmina / GLU de los grupos tratados con mesozeaxantina en todos los niveles de dosis, incluido el nivel de AST en grupo de ratas macho con dosis altas, y no tuvieron diferencias significativas (ANOVA, $P > 0.05$), en comparación con el grupo de control negativo al final del período del estudio de trece semanas, y se indicó además que no hubo efectos adversos perjudiciales de la meso-zeaxantina, incluso a niveles tan altos de dosificación como 1200 mg / kg pc / día por rata.

3.6.8. Efectos de la meso-zeaxantina en relación de peso del órgano al cuerpo.

La Tabla 8 ilustra los resultados de los efectos de la meso-zeaxantina. en la relación de peso de órgano a cuerpo. Los datos sin procesar fueron consistentes con los requisitos de homogeneidad de varianza ($P > 0.05$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $P > 0.05$) en el peso del hígado, riñón, bazo y testículos / ovarios, y la proporción de peso de órgano a cuerpo, en comparación con el grupo de control negativo en el período final del estudio de trece semanas, no se demostró ningún efecto de la meso-zeaxantina en el peso del órgano examinado y la proporción de peso de órgano a cuerpo.

3.6.9. Efectos de la meso-zeaxantina en la histopatología.

No hubo anomalías significativas en el examen de anatomía evaluado por observación ocular. El examen patológico del hígado del estudio de alimentación de 90 días fue el siguiente: hígado estaba intacto; la estructura del lóbulo hepático era clara; placa de hígado no estaba en desorden; en regla de morfología nuclear, se puede ver el área portal de pequeños conductos biliares, vasos sanguíneos, vasos linfáticos; y no se observaron células especiales de Kupffer.

d. Se encontró congestión leve (Landrum & Bone, 2001) en tres ratas dentro de la vena central del lóbulo hepático en el grupo control (una rata macho y dos ratas hembra) y el número total de animales es 20,

expresado como $1 \frac{2}{20}$ (Wooten y Hammond, 2002) en el grupo de dosis alta: dos ratas machos y dos ratas hembras, el número total de animales es 20, expresado como $2 \frac{2}{20}$ (Li et al., 2010) en el grupo de dosis intermedia: una rata macho y una rata hembra, el número total de animales es 20, expresado como $1 \frac{1}{20}$ (Bone et al., 1993) en el grupo de dosis baja: dos ratas hembra, el número total de animales es 20, expresado como $2 \frac{2}{20}$. Se encontró una pequeña cantidad de ratas pequeñas y redondas distribuidas en vacuolas dentro de las células hepáticas del citoplasma (en el grupo de control: $1 \frac{1}{20}$; en el grupo de dosis intermedia: $1 \frac{1}{20}$; en el grupo de dosis baja: $2 \frac{2}{20}$); se encontró degeneración granular de células hepáticas individuales de rata, que muestra la distribución de parches (en el grupo de dosis intermedia: $1 \frac{1}{20}$); se encontró parte de las ratas degeneración de las células hepáticas, se encontraron vacuolas grandes, redondas y en trozos distribuidos dentro del citoplasma (en el grupo de dosis alta: $3 \frac{6}{20}$; en el grupo de dosis intermedia: $1 \frac{5}{20}$); parte de las ratas se encontraron infiltración de células inflamatorias dentro del lóbulo hepático (en el grupo de control: $2 \frac{2}{20}$; en el grupo de dosis alta: $3 \frac{5}{20}$; en el grupo de dosis intermedia: $2 \frac{1}{20}$; en el grupo de dosis baja: $1 \frac{3}{20}$); se encontró infiltración celular inflamatoria dispersa dentro del área portal hepática (en el grupo de control: $1 \frac{1}{20}$; en el grupo de dosis alta: $2 \frac{1}{20}$; en el grupo de dosis intermedia: $1 \frac{2}{20}$; en el grupo de dosis baja: $1 \frac{1}{20}$); se puede ver la vida de ratas en pequeñas cantidades necrosis de células hepáticas con infiltración celular inflamatoria (en el grupo control: $1 \frac{2}{20}$; en el grupo de dosis alta:

$3 \frac{2}{20}$; en grupo de dosis intermedia: $2 \frac{2}{20}$; en grupo de dosis baja: $1 \frac{2}{20}$). El examen patológico del riñón del estudio de alimentación de 90 días fue el siguiente: velamen renal intacto, corteza y médula en capas evidentes, sin fibrosis, glomérulo no encontrado glomérulos de relleno, atrofia, necrosis y otros cambios. la pelvis renal mucosa intacta, sin cambios anormales como la metaplasia. Parte de las células epiteliales tubulares renales puede verse una inflamación leve en una pequeña cantidad de ratas (en el grupo control: $2 \frac{2}{20}$; en el grupo de dosis alta: $2 \frac{3}{20}$; en el grupo de dosis intermedia: $1 \frac{2}{20}$; en baja grupo de dosis: $2 \frac{2}{20}$); parte del tejido vascular intersticial cortical renal puede encontrarse leve dilatación y congestión en pequeñas cantidades de ratas (en el grupo control: $1 \frac{1}{20}$; en el grupo de dosis alta: $1 \frac{1}{20}$; en el grupo de dosis intermedia: $1 \frac{1}{20}$; en grupo de dosis baja: $2 \frac{2}{20}$); La corteza renal se puede encontrar infiltración de células inflamatorias en una pequeña cantidad de ratas (en el grupo control: $1 \frac{1}{20}$; en el grupo de dosis alta: $1 \frac{1}{20}$; en el grupo de dosis baja: $1 \frac{1}{20}$). El examen patológico del bazo del estudio de alimentación de 90 días fue el siguiente: el bazo era normal, se puede observar pulpa roja y pulpa blanca, se puede ver pulpa blanca vaina arterial, se puede ver pulpa roja linfocitos dispersos y eritrocitos, la proporción de pulpa roja y pulpa blanca era normal. Las sinusoides del bazo se pueden encontrar con una leve dilatación y congestión en pequeñas cantidades de ratas (en el grupo de control: $1 \frac{1}{20}$; en el grupo de dosis alta: $1 \frac{1}{20}$; en el grupo de dosis baja: $1 \frac{1}{20}$). El examen patológico del estómago y el intestino (intestino delgado, duodeno) del estudio de alimentación de 90 días fue el siguiente: las células del epitelio de la mucosa eran normales; lámina propia, submucosa, muscularis y serosa no se encontraron hemorragia y edema; Las glándulas gástricas e intestinales no tenían atrofia, cambios proliferativos. El examen patológico espermático del estudio de alimentación de 90 días fue el siguiente: los túbulos seminíferos no se atrofiaron, la disposición de las células espermatogénicas fue normal, no hubo cambios anormales de mesenquimales. El examen patológico del ovario del estudio de alimentación de 90 días fue el siguiente: se pueden ver los niveles de folículo, sin cambios anormales de mesenquimales.

4. Discusión

Para obtener información de primera mano sobre la toxicidad oral aguda de la meso-zeaxantina, examinamos la MTD porque la meso-zeaxantina no se sabe si es tóxica o que efectos adversos causa en humanos según la literatura reportada. Para ratas SD machos y hembras y ratones ICR a 10.0 g / kg, la ausencia de síntomas y la falta de efectos negativos sobre el crecimiento ha sugerido que la meso-zeaxantina no es tóxica bajo estas condiciones de ensayo de toxicidad oral aguda. La MTD de mesozeaxantina en ratas SD y ratones ICR es superior a 10,0 g / kg de peso corporal. Según las clases

de toxicidad, la sustancia probada, meso-zeaxantina, se considera material de grado inofensivo y no tóxico. Elegimos la prueba de Ames y dos ensayos de evaluación de genotoxicidad in vivo. Nuestros resultados han demostrado que la meso-zeaxantina no es citotóxica ni mutagénica a 5 mg / placa y la ICH recomendó la dosis máxima de prueba y otras dosis diluidas de niveles de S.typhimurium TA97, TA98, TA100 y TA102 en ausencia y presencia de un sistema de metabolización microsomal. En los ensayos del micro núcleo de eritrocitos de médula ósea in vivo y anomalías espermáticas de ratones se encontró que a 5.0 g /kg, la meso-zeaxantina no aumentó el número de PCE micronucleados y espermatozoides anormales en las condiciones del experimento, ni afectó la proporción de PCE a los eritrocitos totales. Se seleccionó el enfoque de alimentación por sonda porque es la ruta de administración objetivo hacia los humanos. Combinando los resultados negativos en los dos estudios in vivo con los resultados negativos de la prueba de Ames nosotros concluimos que la meso-zeaxantina no tiene genotoxicidad bajo las condiciones de la prueba.

En el estudio de toxicidad subcrónica, los resultados mostraron que el peso corporal, consumo de alimentos, índice de utilización de alimentos, a mitad de camino (día 42) y las pruebas hematológicas de terminación (día 90) en ratas machos y hembras de cada grupo de nivel de dosis de prueba no tuvieron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control ($P > 0,05$). En los parámetros de la química sanguínea del estudio actual no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con las del grupo de control. Sin embargo, los niveles de AST en sangre de los grupos de ratas macho de 1200 mg / kg tuvieron diferencias significativas (ANOVA, $P < 0,05$) en comparación con el grupo de control negativo a mitad del experimento. La necropsia y el examen patológico mostraron caso de enfermedad con resultados histológicos de células hepáticas vacuolares, la degeneración aumentó significativamente en 1200 mg / kg y 600 mg / kg grupo de dosis, así como aquellos con infiltración celular inflamatoria dentro del lóbulo hepático y la necrosis de células hepáticas manchadas con infiltración celular inflamatoria aumentó significativamente en dosis de 1200 mg / kg en grupo comparado con el grupo de control negativo, otros índices no tuvieron toxicidad significativa en todos los niveles probados, lo que sugiere que meso-zeaxantina administrada a la dosis probada dentro del rango de 600 a 1200 mg / kg durante 90 días tiene hepatotoxicidad. El diario administración oral de meso-zeaxantina a una dosis de 300 mg / kg pc / al día fue bien tolerado en ratas. Además, los exámenes generales de órganos internos como el hígado, los riñones, el bazo, los testículos, los ovarios y las proporciones de peso corporal de los órganos también fueron normales. El nivel de efecto adverso no observado (NOAEL) de meso-zeaxantina en ratas es 300 mg / kg pc / día cuando se administra por vía oral durante 13 semanas consecutivas. Nuestro estudio es consistente con los resultados de la Fundación Howard, en la cual la meso-zeaxantina NOAEL fue > 200 mg / kg / día (Connolly et al., 2011).

5. Conclusión

En resumen, los hallazgos de ausencia de toxicidad aguda, ausencia de efectos mutagenicos y ausencia de efectos nocivos en hematología, química clínica e histopatología en esta evaluación de seguridad indica que el uso de la meso-zeaxantina es segura a dosis de 300 mg / kg pc / día en ratas. Los niveles de efectos adversos no observados (NOAEL) de meso-zeaxantina en las ratas son 300 mg / kg pc / día cuando se administran por vía oral durante 13 semanas consecutivas. Mediante la aplicación de un factor de seguridad de 100 veces a la rata en el estudio, el valor de IDA sugerido es de 3 mg / kg pc / día. Por lo tanto, tras confirmar estos hallazgos de ausencia de toxicidad, se recomendaría la evaluación de la seguridad de los ensayos clínicos en un estudio en animales a largo plazo y/o un año en humanos de meso-zeaxantina como suplementos dietéticos y para uso prolongado.

<https://macuhealth.com/wp-content/uploads/2015/09/Safety-evaluation.pdf>