



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

Evaluación de la quercetina en dos modelos de cirrosis hepática experimental

Tesis que presenta:

Q.F.B. Sael Casas Grajales

Para obtener el Grado de:

Maestro en Ciencias

En la especialidad de:

Farmacología

Director de Tesis:

Dr. Pablo Muriel de la Torre

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Farmacología, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría del Doctor Pablo Muriel de la Torre.

Se contó además con una beca proporcionada por el CONACYT para estudios de posgrado con clave: **511350**.

AGRADECIMIENTOS

*Al **Doctor Pablo Muriel de la Torre**, quien, en primera instancia aceptó que realizara en su laboratorio mi proyecto, además por brindarme apoyo, comprensión, consejo, enseñanzas y sobre todo amistad que recordaré en mi futuro con mucho aprecio, a usted Doctor mi estima, agradecimiento y admiración por su obra en el departamento de Farmacología.*

*A la **Doctora Liliana Favari Perozzi**, por el apoyo recibido en su laboratorio a través de todo este tiempo, también porque de usted aprendí a realizar mi trabajo con calidad.*

*Al **Doctor Víctor Tsutsumi Fujiyoshi**, por la asesoría y apoyo que recibí de su parte durante la realización de mi proyecto.*

*A la **Doctora Mineko Shibayama Salas**, quien a pesar de no tener responsabilidad directa en este proyecto, siempre mostró interés y apoyo en la realización del mismo, le agradezco por su tiempo, consejos y amistad.*

*A la **Lic. en Enf. Rosa Elena Flores Beltrán** y a la **C. P. Elvia Leyva Sánchez** quienes siempre me han dado apoyo tanto personal como laboral y cuidarme como si fueran mi segunda madre.*

*A los señores **Luis Ramón Hernández Guadarrama**, **Benjamín Salinas Hernández** y la **Lic. en Enf. Laura Dayana Buendía Montaña**, por ser buenos amigos y brindarme excelentes momentos durante mi estancia, sin su ayuda y apoyo este proyecto no hubiese podido salir adelante.*

*A la señora **Ma. Teresa García Camacho** y la **Q.F. B. Silvia Galindo Gómez**, por su invaluable consejo, apoyo técnico recibido en sus respectivos laboratorios y amistad durante la realización del presente proyecto.*

*A mis compañeros el **I.B.Q. Luis Francisco Vázquez Flores**, los **Q.F. B. Daniel Cuervo Zanatta**, **Silvia Refugio Zapata Mondragón**, **Edna Milagros Silva García**, **Luis Adolfo Leonhart Ávalos**, **Marisol Martínez Correa**, **Octavio Lugo Navarro**, la **I. F. Mónica Lizbeth Sosa Pacheco**, las **M. C. Erika Ramos Tovar** y **Erika Hernández Aquino** por su*

amistad, gratos momentos juntos y por soportar todas mis travesuras para con ustedes, sin su ayuda mi estancia en este lugar no hubiese sido buena.

A la Auxiliar de Investigación, Doctora Jacqueline Ivette Acosta García por su apoyo en técnicas de análisis de resultados y búsqueda en bases de datos.

A los M.V.Z. Rafael Leyva Muñoz, Ricardo Gaxiola Centeno y Benjamín E. Chávez Álvarez por su apoyo técnico en el cuidado y mantenimiento de los animales de experimentación en el UPEAL.

DEDICATORIAS

El presente trabajo lo dedico con todo mi cariño y respeto:

A Dios:

Gracias por brindarme la templanza necesaria durante los momentos de soledad, angustia, duda y sobre todo por cuidar siempre de lo más importante...mi familia.

A mis padres:

*Por estar siempre conmigo cuando más los necesité, enseñarme que con el trabajo duro y dedicación todo es posible, a superarme siempre y no ser conformista con los proyectos que realice a lo largo de mi vida, a tener valores los cuales rigen mi forma de ser y de ver el mundo, pero sobre todo mostrarme mi filosofía de vida: “**Retroceder nunca...rendirse jamás**”.*

A mi hermano:

Por ser mi primer amigo y confidente, darme su apoyo y comprensión desde pequeños, cuidarme como el hermano mayor que eres y por quererme desde que supiste de mi existencia.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Aspectos generales y anatomía del hígado.....	5
2.2 Funciones del hígado	6
2.3 El lobulillo hepático	8
2.3.1 Acino hepático	9
2.3.2 Lobulillo portal.....	9
2.4 Sinusoides hepáticos	10
2.5 Sistema biliar	10
2.6 Tipos celulares presentes en el lobulillo hepático	11
2.6.1 Hepatocitos.....	11
2.6.2 Células de Kupffer (KC).....	12
2.6.3 Células estelares hepáticas (HSC) o células de Ito	13
2.6.4 Células de Pit	15
2.6.5 Células endoteliales sinusoidales (LSEC).....	15
2.7 Daño al hígado.....	16
2.7.1 Fibrosis hepática.....	17
2.7.1.1 Origen y diagnóstico	19
2.7.1.2 Patogénesis de la fibrosis hepática.....	20
2.7.1.3 Citocinas clave en el desarrollo de la fibrosis.....	22
2.7.1.4 FR y su relación con la fibrosis.....	23
2.7.2 Cirrosis hepática.....	23
2.7.2.1 Causas de la cirrosis	24
2.7.2.2 La regresión de la cirrosis	24
2.7.2.3 Terapias antifibrogénicas	25

2.7.2.4	<i>Modelos experimentales de daño hepático</i>	26
2.8	Estrés oxidativo	29
2.8.1	Radicales libres (FR)	29
2.8.1.1	<i>ROS</i>	31
2.8.1.2	<i>RNS</i>	32
2.8.1.3	<i>RSS</i>	32
2.9	Antioxidantes	32
2.9.1	Flavonoides	34
2.9.1.1	<i>Quercetina (Q)</i>	36
3.	HIPÓTESIS	39
4.	JUSTIFICACIÓN	40
5.	OBJETIVOS	41
5.1	Objetivo general	41
5.2	Objetivos particulares	41
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	42
6.1	Materiales.	42
6.2	Diseño experimental para evaluar la capacidad de la Q para prevenir la cirrosis experimental inducida con la TAA.	42
6.3	Diseño experimental para evaluar la capacidad de la Q para prevenir la cirrosis experimental inducida con el CCl₄.	43
6.4	Determinaciones bioquímicas en plasma e hígado.	43
6.5	Técnicas	45
6.5.1	Determinación de la actividad de la enzima FA	45
6.5.2	Determinación de la actividad de la enzima γ-GTP	46
6.5.3	Determinación de la actividad de la enzima ALT	47
6.5.4	Determinación de la cantidad de proteínas hepáticas por el método de Bradford	48

6.5.5	Determinación del grado de peroxidación lipídica.....	49
6.5.6	Determinación de los niveles de GSH.....	50
6.5.7	Determinación del glucógeno hepático.....	51
6.5.8	Determinación del contenido de colágena (HP).....	52
6.5.9	Histología.....	54
6.5.10	Análisis estadístico.....	56
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
7.1	Modelos de lesión hepática crónica inducida mediante el uso de la TAA y el CCl ₄	57
7.1.1	Determinación de la actividad de las enzimas indicadoras de colestasis	57
7.1.1.1	<i>Actividad enzimática de la fosfatasa alcalina</i>	57
7.1.1.2	<i>Actividad enzimática de la γ-glutamil transpeptidasa</i>	59
7.1.2	Determinación de los indicadores de necrosis	61
7.1.2.1	<i>Actividad enzimática de la alanina aminotransferasa</i>	61
7.1.2.2	<i>Tinción de H&E</i>	62
7.1.3	Determinación de los indicadores de estrés oxidativo celular	65
7.1.3.1	<i>Medición del grado de peroxidación lipídica</i>	65
7.1.3.2	<i>Cuantificación del contenido de glutatión reducido</i>	67
7.1.4	Valoración del indicador de funcionalidad del hígado	70
7.1.4.1	<i>Determinación de la cantidad del contenido de glucógeno</i>	70
7.1.5	Determinación de los indicadores del grado de fibrosis	72
7.1.5.1	<i>Cuantificación del contenido de colágena (hidroxiprolina)</i>	72
7.1.5.2	<i>Tinción TM</i>	73
8.	CONCLUSIÓN.....	76
8.1	Conclusiones particulares	76
8.2	Conclusión general.....	76
9.	PERSPECTIVAS	77
10.	REFERENCIAS	78
11.	APÉNDICES	93

12.1	Curva de calibración de la FA	93
12.2	Curva de calibración de γ-GTP	94
12.3	Curva de calibración de ALT	95
12.4	Proteínas	96
12.5	GSH	97
12.6	Colágena (HP)	98

ÍDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía hepática. Se muestran el ligamento falciforme, la vesícula biliar, el lóbulo derecho, izquierdo y caudado.....	6
Figura 2. Estructura de un lobulillo hepático, se muestran las placas celulares, la vena central, los sinusoides y el espacio portal.....	9
Figura 3. Diferentes zonas de los hepatocitos dentro del lobulillo dependiendo del flujo sanguíneo.....	10
Figura 4. Localización de los tipos celulares presentes en el hígado. Se muestran los hepatocitos, HSC, KC, LSEC y células de Pit.	16
Figura 5. Esquema de los tipos de daño que se presentan en el hígado ante algún agente etiológico y tiempo de exposición.	17
Figura 6. Iniciación y perpetuación de las HSC. Características fenotípicas que adquieren después de una lesión.	21
Figura 7. Posibles blancos terapéuticos. Enfoques antifibróticos y candidatos para tratamientos combinados.....	26
Figura 8. Metabolismo del CCl ₄ por tres isoformas del Citocromo P450.	28
Figura 9. Formación de metabolitos de la TAA	29
Figura 10. Generación de diversas ROS por transferencia de energía o reducción secuencial univalente desde el estado triplete del O ₂	31
Figura 11. Producción del O ₂ ^{*-} por parte de la xantina oxidasa. Mecanismo encargado de eliminarlo involucrando a las enzimas SOD, CAT y GPx.....	34
Figura 12. Estructura básica de un flavonoide y de sus derivados.	35
Figura 13. Estructura general de la Q mostrando sus posibles sustituciones y derivados	36
Figura 14. Representación de la absorción, metabolismo y excreción de la Q en mamíferos.....	38
Figura 15. Esquema representativo del protocolo a seguir	44
Figura 16. Formación del compuesto para-nitrofenol a partir del para-nitrofenilfosfato.....	45
Figura 17. Formación de la para-nitroanilina. Reacción catalizada por la γ -GTP.....	46

Figura 18. Reacción de la formación de la 2,4-dinitrofenilhidrazona a partir del piruvato y la 2,4-DNHP.	47
Figura 19. Esquema de la reacción entre malondialdehído y ácido tiobarbitúrico.	49
Figura 20. Reacción de formación del compuesto colorido TNB.....	50
Figura 21. Reacción de condensación entre el furfural y la antrona.....	51
Figura 22. Oxidación y descarboxilación de HP a pirrol.....	52
Figura 23. Histología de hígados de ratas después de los diferentes tratamientos (tinción de H&E).....	62
Figura 24. Histología de hígados de ratas después de diferentes tratamientos (tinción TM)	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores parácrinos envueltos en la iniciación de la activación de las HSC.	14
Tabla 2. Asas autócrinas y parácrinas envueltas en la perpetuación de la activación de las HSC.....	15
Tabla 3. Factores genéticos y ambientales asociados con la progresión de la fibrosis en diversos tipos de enfermedades crónicas hepáticas.....	19
Tabla 4. Aleatorización de ratas Wistar macho en ocho grupos experimentales	43
Tabla 5. Curva de calibración de la FA.....	93
Tabla 6. Curva de calibración de γ -GTP	94
Tabla 7. Curva de calibración de ALT.....	95
Tabla 8. Curva de calibración de proteínas	96
Tabla 9. Curva de calibración de GSH.....	97
Tabla 10. Curva de calibración de HP.....	98

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Determinación de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina en el hígado de las ratas sanas (control), tratadas con tioacetamida (TAA), TAA y quercetina (Q) y tratadas con Q sola.	57
Gráfica 2. Determinación de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina en el hígado de las ratas sanas (control), tratadas con tetracloruro de carbono (CCl ₄), CCl ₄ y quercetina (Q) y tratadas con Q sola.	58
Gráfica 3. Determinación de la actividad enzimática de la γ -glutamyl transpeptidasa en el hígado de las ratas sanas (control), tratadas con tioacetamida (TAA), TAA y quercetina (Q) y tratadas con Q sola.	59
Gráfica 4. Determinación de la actividad enzimática de la γ -glutamyl transpeptidasa en el hígado de las ratas sanas (control), tratadas con tetracloruro de carbono (CCl ₄), CCl ₄ y quercetina (Q) y tratadas con Q sola.	59
Gráfica 5. Determinación de la actividad enzimática de la alanina aminotransferasa en el hígado de las ratas sanas (control), tratadas con tioacetamida (TAA), TAA y quercetina (Q) y tratadas con Q sola.	61
Gráfica 6. Determinación de la actividad enzimática de la alanina aminotransferasa en el hígado de las ratas sanas (control), tratadas con tetracloruro de carbono (CCl ₄), CCl ₄ y quercetina (Q) y tratadas con Q sola.	61
Gráfica 7. Determinación del grado de peroxidación lipídica en el hígado de las ratas sanas (control), tratadas con tioacetamida (TAA), TAA y quercetina (Q) y tratadas con Q sola.	65
Gráfica 8. Determinación del grado de peroxidación lipídica en el hígado de las ratas sanas (control), tratadas con tetracloruro de carbono (CCl ₄), CCl ₄ y quercetina (Q) y tratadas con Q sola.	65
Gráfica 9. Determinación del contenido de glutatión reducido en el hígado de las ratas sanas (control), tratadas con tioacetamida (TAA), TAA y quercetina (Q) y tratadas con Q sola.	67

Gráfica 10. Determinación del contenido de glutatión reducido en el hígado de las ratas sanas (control), tratadas con tetracloruro de carbono (CCl ₄), CCl ₄ y quercetina (Q) y tratadas con Q sola.....	67
Gráfica 11. Determinación del contenido de glucógeno en el hígado de ratas sanas (control), tratadas con tioacetamida (TAA), TAA y quercetina (Q) y tratadas con Q sola.	70
Gráfica 12. Determinación del contenido de glucógeno en el hígado de ratas sanas (control), tratadas con tetracloruro de carbono (CCl ₄), CCl ₄ y quercetina (Q) y tratadas con Q sola.	70
Gráfica 13. Determinación del contenido de colágena en el hígado de ratas sanas (control), tratadas con tioacetamida (TAA), TAA y quercetina (Q) y tratadas con Q sola	72
Gráfica 14. Determinación del contenido de colágena en el hígado de ratas sanas (control), tratadas con tetracloruro de carbono (CCl ₄), CCl ₄ y quercetina (Q) y tratadas con Q sola.	72
Gráfica 15. Curva de calibración para la FA.	93
Gráfica 16. Curva de calibración de γ -GTP.....	94
Gráfica 17. Curva de calibración de ALT	96
Gráfica 18. Curva de calibración de proteínas.....	97
Gráfica 19. Curva de calibración de GSH.....	98
Gráfica 20. Curva de calibración de HP.	99

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-dinitrofenilhidracina	2,4-DNPH
2-nitro-tiobenzoico	TNB
5,5'-Ditio- <i>bis</i> -(2-Ácido nitrobenzoico)	DTNB
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄
Ácido tiobarbitúrico	TBA
Adenosín trifosfato	ATP
Alanina aminotransferasa	ALT
Alcohol deshidrogenasa	ADH
Aldehído deshidrogenasa	ALDH
Angiotensina II	Ang II
Anión nitroxilo	NO ⁻
Anión superóxido	O ₂ *-
Antígeno linfocítico citotóxico T tipo-4	CTLA-4
Apolipoproteína E	Apo E
Catalasa	CAT
Catecol- <i>O</i> -metiltransferasa	COMT
Células de Kupffer	KC
Células endoteliales sinusoidales	LESC
Células estelares	HSC
Endotelina-1	ET-1
Epóxido hidrolasa microsomal	MEH
Especies reactivas de azufre	RSS
Especies reactivas de nitrógeno	RNS
Especies reactivas de oxígeno	ROS
Esteatohepatitis no alcohólica	NASH
Factor de crecimiento de tejido conectivo	CTGF

Factor de crecimiento derivado de plaquetas	PDGF
Factor de crecimiento epidérmico	EGF
Factor de crecimiento transformante- β	TGF- β
Factor de necrosis tumoral- α	TNF- α
Factor promotor de los miocitos-2	Mef-2
Flavín monooxigenasa	FMO
Fosfatasa alcalina	FA
Gen hereditario de hemocromatosis	HFE
Glutación peroxidasa	GPx
Glutación reducido	GSH
Haplotipos de antígeno leucocitario humano tipo-2	HLA-2
Hematoxilina y eosina	H&E
Hidroxi prolina	HP
Inhibidor de metaloproteínas de tejido tipo-1	TIMP-1
Interleucina-1	IL-1
Interleucina-10	IL-10
Interleucina-6	IL-6
Lipoproteínas de baja densidad	LDL
Malondialdehído	MDA
Matriz extracelular	ECM
Metaloproteínas	MMP
Natural killer	NK
Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato	NADPH
Óxido nítrico	NO
Óxido nítrico sintasa	NOS
Óxido nítrico sintasa endotelial	eNOS
Óxido nítrico sintasa inducible	iNOS
Óxido nítrico sintasa neuronal	nNOs
Oxígeno singulete	$^1\text{O}_2$
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Peroxinitrito	ONOO^-

Proteína quimiotáctica de monocito tipo-1	MCP-1
Proteína quimiotáctica de monocito tipo-2	MCP-2
Quercetina	Q
Radical hidroxilo	OH ⁻
Radical nitrosonio	NO ⁺
Radical triclorometilo	CCl ₃ [*]
Radicales libres	FR
Superóxido dismutasa	SOD
Superóxido dismutasa isoforma con cobre	CuSOD
Superóxido dismutasa isoforma con hierro	FeSOD
Superóxido dismutasa isoforma con manganeso	MnSOD
Superóxido dismutasa isoforma con zinc	ZnSOD
Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico	TBARS
Tetracloruro de carbono	CCl ₄
Tinción tricrómica de Masson	TM
Tioacetamida	TAA
Tioacetamida disulfóxido	TASO ₂
Tioacetamida sulfóxido	TASO
Transportador asociado a procesamiento de antígeno tipo-2	TAP-2
Virus de la hepatitis B	HBV
Virus de la hepatitis C	HCV
Xantina oxidasa	XO
α-actina de músculo liso	α-SMA
γ-glutamyl transpeptidasa	γ-GTP
Factor de crecimiento de fibroblastos básico	bFGF
Factor de crecimiento insulínico tipo-1	IGF-1
Factor de crecimiento de tejido conectivo	CTGF
Factor estimulante de colonias de macrófagos	M-CSF
Proteína quimiotáctica de monocitos-1	MCP-1

RESUMEN

Gran número de estudios realizados sugieren que el estrés oxidativo tiene un papel fundamental en la patogénesis del daño hepático, tanto en modelos experimentales como en humanos. El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de la quercetina (Q) administrada por ocho semanas a la dosis de 50 mg/Kg i.p. o p.o., diaria, para prevenir el estrés oxidativo en dos modelos de cirrosis experimental, inducida por la exposición a dos agentes prooxidantes: tioacetamida (TAA) a la dosis de 200 mg/Kg de peso i.p., y tetracloruro de carbono (CCl₄) a la dosis de 400 mg/Kg de peso i.p., ambas tres veces por semana por ocho semanas en ratas Wistar macho, los animales fueron administrados de forma concomitante con la Q, con controles respectivos. Se evaluó la integridad del hígado mediante la medición de la enzima alanina aminotransferasa (ALT) como marcadora de necrosis, mientras que las enzimas fosfatasa alcalina (FA) y la γ -glutamyl transpeptidasa (γ -GTP), se utilizaron como marcadoras de colestasis, todas ellas cuantificadas en plasma. Para evaluar el estado del sistema antioxidante hepático, se cuantificó la cantidad del glutatión reducido (GSH) y el grado de peroxidación lipídica mediante la determinación del malondialdehído (MDA). Por otro lado, la capacidad biosintética del hígado fue medida a través de las concentraciones de glucógeno. También se evaluó la fibrosis mediante la cuantificación del contenido de hidroxiprolina hepática (HP). La inducción de la cirrosis por parte de la TAA y el CCl₄ estuvo asociada con un aumento en la actividad de la ALT, FA, γ -GTP, así como de los niveles de MDA y HP, mientras que se observó una disminución de la cantidad del GSH y el glucógeno. El tratamiento con la Q previno de forma importante estas alteraciones, demostrando capacidad antioxidante así como hepatoprotectora. Por lo tanto, este estudio muestra que los efectos para prevenir la cirrosis por parte de la Q son debidos a sus propiedades antioxidantes y posiblemente a los efectos inmunomoduladores.

ABSTRACT

A great number of studies suggest that oxidative stress plays a main role into the pathogenesis of liver injury, both experimental models as well as in humans. The aim of this study was to evaluate the capacity of quercetin (Q) as an antioxidant and antifibrotic agent in experimental cirrhosis. Quercetin was administrated for eight weeks in a daily dose of 50 mg/Kg i.p. or p.o., to prevent the oxidative stress in two models of experimental cirrhosis. Thioacetamide (TAA) was administered at a dose of 200 mg/Kg of body weight i.p. and carbon tetrachloride (CCl₄) at a dose of 400 mg/Kg of body weight i.p., both of them three times a week for eight weeks to male Wistar rats; Q was administrated concomitantly with TAA or CCl₄. The respective controls were performed. The liver integrity was evaluated by determining the enzymes alanine aminotransferase (ALT) as necrosis'-markers, and alkaline phosphatase (AP) and γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) as cholestasis'-markers, all quantified in plasma. To evaluate the liver redox system, the glutathione (GSH) was quantified as well as the rate of liver lipid peroxidation through the measurement of MDA levels. On the other hand, the biosynthetic capacity of liver was measured using the glycogen concentrations. Also, the fibrosis was evaluated determining the content of hydroxyproline (HP), all of performed in liver samples. Cirrhosis induction by the TAA and CCl₄ was associated with an increase in the activity of ALT, AP, γ -GTP, as well as MDA and HP levels, while a decrease in the amount of GSH and glycogen was observed. The Q treatment prevented importantly these alterations, demonstrating the antioxidant, antifibrotic and antinecrotic capacity of Q. Thus, this study demonstrates that the effects of Q to prevent the experimental cirrhosis are due mainly to its antioxidant properties, and maybe for its immunomodulatory effects.

1. INTRODUCCIÓN

El daño constante en el hígado producido por diversos factores tales como medicamentos, abuso en la ingestión de bebidas alcohólicas, infecciones por virus, alteraciones del conducto biliar, etc. conducen a una hepatopatía llamada cirrosis¹. En esta enfermedad se producen diversos cambios, que incluyen incrementos en los niveles séricos de enzimas como la ALT, la FA y la γ -GTP, lo cual está asociado a la pérdida de la integridad del hepatocito, además, se ven agotados los niveles de GSH y glutatión peroxidasa (GPx), mientras que a la par se incrementan los niveles de MDA²⁻⁴. Por otra parte, a nivel del órgano se produce un proceso inflamatorio, dado por el aumento de citocinas proinflamatorias y profibrogénicas tales como la interleucina-1(IL-1), la interleucina-6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF),⁵ proteínas de matriz extracelular como la colágena y seguido a esto un proceso de fibrosis, que se caracteriza por cicatrices en el tejido del hígado. Sin embargo, no existen enfoques terapéuticos exitosos para tratar las enfermedades hepáticas, a pesar del alto índice de mortalidad anual debido a ellas⁶. Por ello, se debe enfocar la investigación a diversas moléculas de origen natural o sintético que tengan la capacidad de ejercer un efecto benéfico sobre dichas patologías y que pudiesen ser futuros agentes terapéuticos.

Por ello, se han propuesto diversos compuestos que puedan ejercer un efecto positivo sobre la cirrosis, un ejemplo de estos son los flavonoides, estos se encuentran ampliamente distribuidos en diversas plantas, semillas y frutas, aportando grandes beneficios hacia la salud, debido en parte a su capacidad antioxidante, ya que protegen contra los radicales libres (FR). La actividad que presentan los flavonoides como antioxidantes resulta de la combinación de sus propiedades quelantes de los metales de transición, así como la capacidad de poder capturar FR⁷, además de la inhibición de las enzimas oxigenasas tales como: lipooxigenasas, ciclooxigenasas, mieloperoxidasa y xantina oxidasa,⁸ de este modo, evitan la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de hidroxiperóxidos orgánicos, así como de la

inhibición del metabolismo del ácido araquidónico, de este modo, los flavonoides muestran propiedades antiinflamatorias y antitrombogénicas.⁹ Sin embargo, no solo pueden inhibir enzimas, también poseen la capacidad de activarlas, tal es el caso de la superóxido dismutasa (SOD), la GPx y la catalasa (CAT).¹⁰

Se ha reportado que la Q (3,5,7,3',4'-pentahidroxiavona) posee una amplia gama de propiedades farmacológicas, tales como la supresión de la proliferación celular, la prevención de la agregación plaquetaria, la estabilización de las células del sistema inmunológico, la actividad carcinostática, la antiviral, la protección de los lípidos de baja densidad (LDL) y la actividad antioxidante; debido a esta última propiedad, previene el daño causado por el estrés oxidativo.¹¹

2. ANTECEDENTES

2.1 Aspectos generales y anatomía del hígado

El hígado es el segundo órgano más grande del ser humano, siendo solo superado por la piel, además es la glándula de mayor tamaño, tiene un peso aproximado en el adulto de 1300 a 1700 Kg, sin embargo, sólo representa del 2 a 3 % de la masa corporal y consume del 25 al 30 % del oxígeno que requiere el organismo, esto depende tanto del género como del volumen del individuo,¹² es de color rojo pardo y presenta forma semi-ovoidea. Se encuentra localizado en el hipocondrio derecho (clasificación francesa) o en el cuadrante superior derecho (clasificación americana) debajo del diafragma y por encima del estómago, de los vasos del intestino delgado, el riñón derecho y una porción del hipocondrio izquierdo.¹⁴ La anatomía clásica del hígado comprende la división del mismo en un lóbulo derecho y un lóbulo izquierdo, separados por el ligamento falciforme, además presenta dos caras, la anterosuperior y la anteroposterior, así como un borde anterior y uno posterior (Figura 1), cada uno con dos extremidades, la derecha y la izquierda, en la cara posteroinferior presenta el lóbulo cuadrado por delante y el lóbulo caudado por detrás.¹³ Comprende tres compartimentos peritoneales llamados: compartimento subfrénico derecho o hepático, compartimento subfrénico izquierdo o esplénico y compartimento medio o celiaco. El hígado es una masa parenquimatosa continua parecida a una esponja, penetrada por túneles que contienen redes interdigitantes de venas aferentes y eferentes.¹⁵ Este órgano se encuentra recubierto por una membrana fibrosa (colágena) llamada cápsula de Glisson, la cual es resistente y delgada, por su cara externa se adhiere al peritoneo mientras que por su cara interna envía tabiques conjuntivos entre los lobulillos y los lóbulos, está cubierta por una monocapa de células mesoteliales.¹³

Es un órgano altamente irrigado por sangre, éste la recibe de dos fuentes principales, la sangre oxigenada que llega a través de la arteria hepática, mientras que la rica en nutrientes llega a través de la vena porta.¹⁴

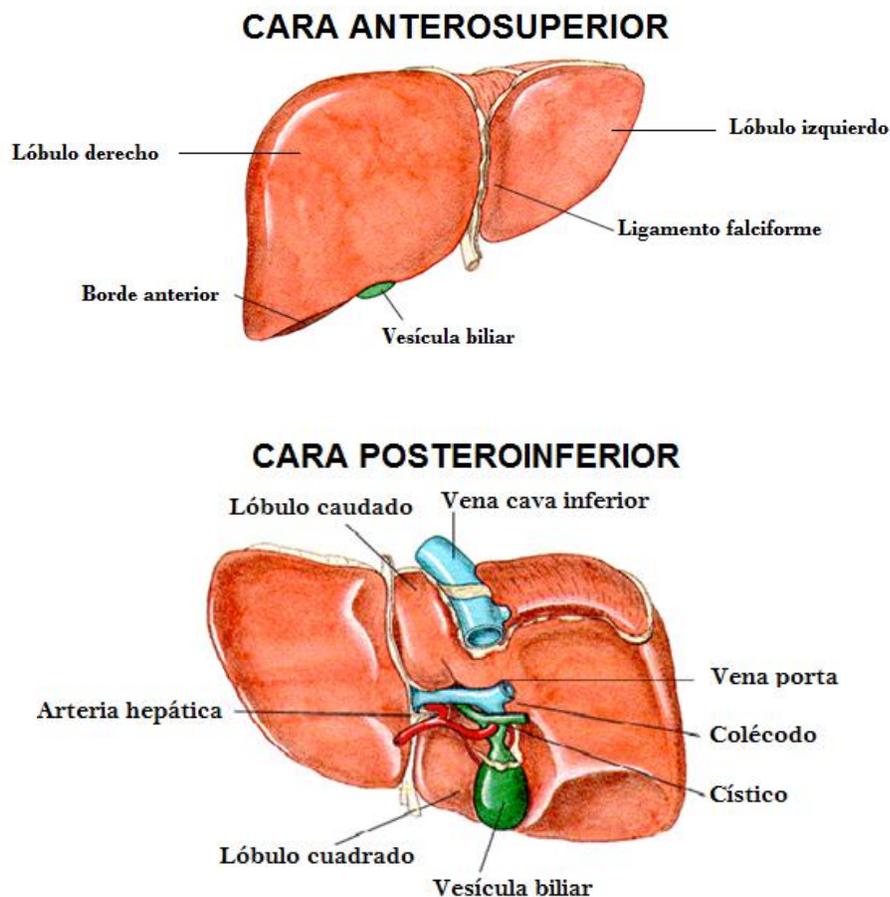


Figura 1. Anatomía hepática. Se muestran el ligamento falciforme, la vesícula biliar, el lóbulo derecho, izquierdo y caudado.

2.2 Funciones del hígado

El hígado cumple diversas funciones dentro del organismo, siendo una de las más importantes la secreción de la bilis, debido a que ésta contiene sales biliares y bilirrubina, actuando como un emulsificante de las grasas, y con esto, el organismo es capaz de absorber los alimentos con altos contenidos lipídicos, además, cumple otras funciones metabólicas vitales tales como: metabolismo de los carbohidratos, de los lípidos, de las proteínas, de los xenobióticos, excreción de la bilirrubina y almacenamiento.

Metabolismo de los carbohidratos: El hígado es el encargado de mantener los niveles glucémicos sanguíneos adecuados, ya que, al ingerir los alimentos, la glucosa que se absorbe es utilizada para la síntesis del glucógeno (principal forma de almacenamiento de la glucosa en el organismo), es por ello que cuando la glucemia es

baja, el glucógeno hepático es catabolizado para formar monómeros de glucosa que son liberados al torrente sanguíneo subsecuentemente. Además, el hígado puede convertir ciertos aminoácidos, ácido láctico, fructosa y galactosa en glucosa cuando se presenta un estado de hipoglucemia severo.

Metabolismo de los lípidos: Algunas de las células del hígado son capaces de procesar lípidos para diversos procesos metabólicos, tal es caso de los hepatocitos que almacenan triglicéridos, degradan ácidos grasos para producir adenosín trifosfato (ATP) y sintetizan lipoproteínas, que serán las encargadas de transportar a los ácidos grasos, triglicéridos y colesterol hacia otras células del organismo, además, las células estelares (HSC) se encargan de almacenar vitamina A, la cual participa en diversos procesos fisiológicos.

Metabolismo de las proteínas: Los hepatocitos cumplen diversos procesos metabólicos, dentro de estos destaca la desaminación de los aminoácidos, este proceso se lleva a cabo para que los aminoácidos una vez desaminados se puedan utilizar en la producción de ATP o ser convertidos a carbohidratos o grasas; el amoníaco resultante de la desaminación es convertido en otra molécula menos tóxica llamada urea, ésta es excretada subsecuentemente por la orina. Además, los hepatocitos son los encargados de la síntesis de diversas proteínas como las plasmáticas, la albumina, alfa y beta globulinas, así como protrombina y fibrinógeno.

Metabolismo de los xenobióticos: El hígado es el principal órgano detoxificador del cuerpo, es por ello que se encarga del metabolismo de diversos xenobióticos tales como fármacos, alcohol y compuestos presentes en alimentos como los conservadores y otros insumos, esto es llevado a cabo principalmente por el Citocromo P450 y las reacciones de fase 1 y 2.

Excreción de la bilirrubina: La bilirrubina es un pigmento biliar de color amarillo-anaranjado que deriva del grupo hemo de los eritrocitos reciclados; dicha degradación se produce en el bazo para luego ser conjugada en el hígado. Ésta es almacenada en la vesícula biliar formando parte de la bilis, siendo excretada posteriormente al duodeno y dando el color característico a las heces.¹⁶

Almacenamiento: Además del glucógeno, en el hígado se almacenan otras biomoléculas esenciales para el organismo, tales como las vitaminas (A, B₁₂, D, E y K) y metales (hierro y cobre), que se liberan del hígado cuando son requeridos.

Fagocitosis: Las células de Kupffer (KC) son uno de los tipos celulares en el hígado encargado de la degradación de agentes vivos nocivos para el cuerpo, como las bacterias, además realizan la función de limpieza de la sangre al eliminar a los leucocitos y eritrocitos viejos.

2.3 El lobulillo hepático

Es la unidad funcional del hígado, tiene la forma de un hexágono y mide aproximadamente 2 mm (Figura 2). Éstos están limitados por el tejido conectivo interlobulillar, además, en la periferia de los lobulillos, donde varios de ellos se unen, se observan las tríadas portales o espacios portales, que constan de las ramas de la vena porta, la arteria hepática y el conducto biliar. Los lobulillos están compuestos por cordones de hepatocitos que se organizan de forma radial a la vena central hasta la periferia y están separados por los sinusoides.

Los sinusoides comunican las ramificaciones terminales de la vena porta y de la arteria hepática con la vena central, que representa el comienzo de las venas hepáticas. Entre las placas de hepatocitos, se encuentran los espacios por los que transcurren los sinusoides, separados de las placas de hepatocitos por el espacio de Disse. En la porción periférica, el lobulillo está cerrado contra el espacio periportal por una placa continua de hepatocitos, la cual posee únicamente pequeños orificios para las ramificaciones terminales de la arteria hepática, la vena porta y el conducto biliar.¹⁷

El lobulillo está organizado dentro de áreas espaciales distintas a lo largo del eje porto-centrolobulillar conocidas como zonas metabólicas. Debido a esto, las funciones metabólicas del hígado, las realizan distintos grupos de hepatocitos, así el nivel de agresión a los cuales sean sometidos, dependerá de su posición dentro del lobulillo.¹⁸

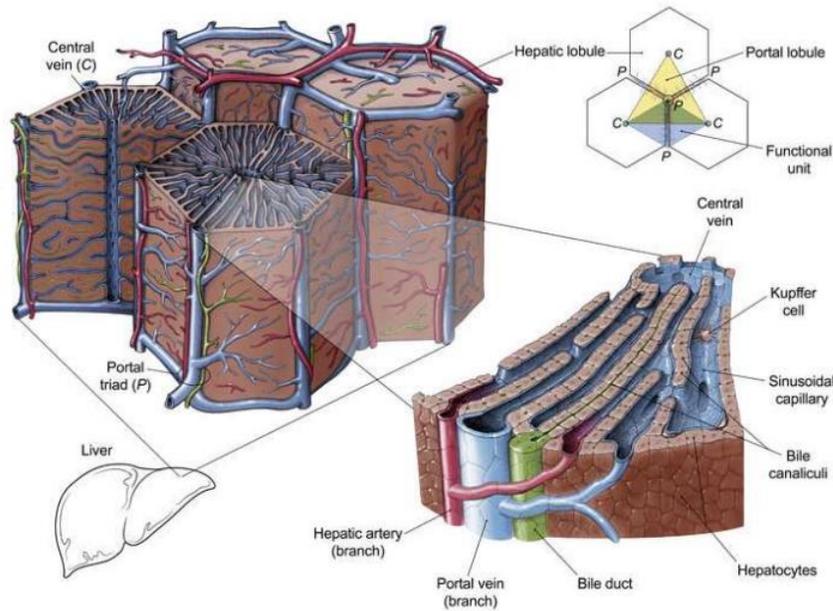


Figura 2. Estructura de un lobulillo hepático, se muestran las placas celulares, la vena central, los sinusoides y el espacio portal

2.3.1 Acino hepático

También llamado lobulillo de Rappaport (Figura 3) representa la unidad mínima funcional relacionada con la irrigación sanguínea del hígado. Se define como una estructura romboidal, cuyos vértices giran en entono a dos venas centrales e incluye un eje compuesto por ramificaciones terminales de la arteria hepática, la vena porta y un conducto biliar. Se distinguen tres zonas de diversa actividad metabólica entre el eje y la vena central, los hepatocitos más cercanos al eje vascular o zona 1 son irrigados por sangre rica en oxígeno y rica en nutrientes, los hepatocitos localizados en la zona 2 o intermedia reciben sangre de menor calidad en ambos rubros, mientras que los más alejados o de la zona 3 reciben el menor aporte de oxígeno y de nutrientes, esto es debido a que en la zona 1, la vena porta y la arteria hepática vierten la sangre que circula por ellas, por lo que a medida que la sangre llega a la zona 3, ésta pierde gran parte de su calidad.^{17, 19}

2.3.2 Lobulillo portal

Es una unidad funcional centrada alrededor del conducto biliar del espacio porta (Figura 3), está relacionada con la secreción exocrina del hígado, además de que es

una estructura triangular compuesta por el parénquima hepático de tres lobulillos hepáticos adyacentes cuyos vértices son las venas centrales.¹⁷

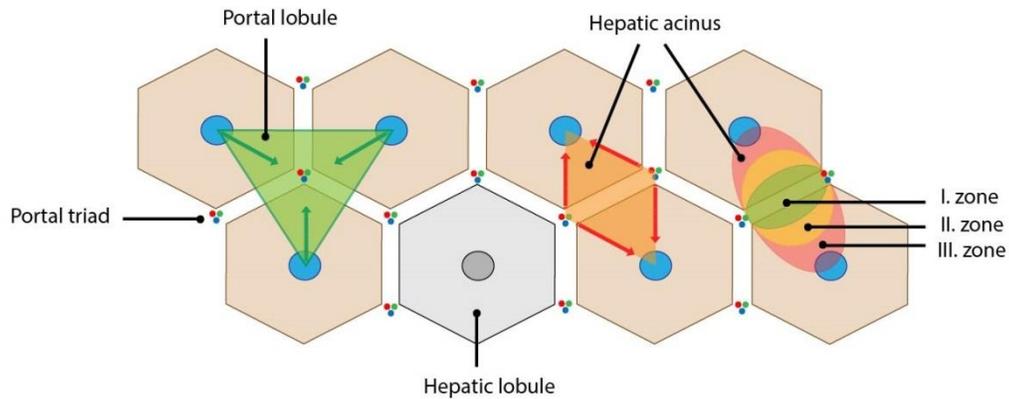


Figura 3. Diferentes zonas de los hepatocitos dentro del lobulillo dependiendo del flujo sanguíneo

2.4 Sinusoides hepáticos

Son más grandes y más irregulares que los capilares y poseen una pared celular muy delgada separada de las placas de células hepáticas por el espacio perisinusoidal con su red de fibras reticulares. La pared sinusoidal se compone de células endoteliales (LSEC) discontinuas mientras que en el interior de la luz sinusoidal se ubican las HSC. Por los sinusoides circulan unos 1,500 mL de sangre por minuto, que proviene de una circulación doble, por un lado, la arterial a alta presión y por el otro, la portal a baja presión, ambas se mezclan en el compartimento sinusoidal para ser drenadas posteriormente a la circulación cava a través de las venas suprahepáticas.^{12,17}

2.5 Sistema biliar

La bilis es un líquido producido por los hepatocitos que se almacena en la vesícula biliar, es de coloración pardo-amarillenta o verde oliva, de sabor amargo, un pH de 7.6-8.6 y desempeña la función de emulsificar a los ácidos grasos para que estos puedan ser absorbidos posteriormente. Está constituida por sales biliares (componente encargado de la emulsificación), proteínas, colesterol, pigmentos biliares, hormonas, varios tipos de iones, bilirrubina (también funge como su pigmento principal) y de agua.

La bilis secretada por los hepatocitos (entre 800 a 1000 mL) entra en un sistema de flujo que empieza en los canalículos biliares, que son estrechos conductos intercelulares que desembocan en los conductillos biliares, desde los cuales pasa a los conductos biliares en la periferia de los lobulillos. Los conductos biliares emergen y forman una bifurcación (derecho e izquierdo), los cuales se unen y abandonan el hígado formando el conducto biliar común, éste a su vez se une al conducto cístico de la vesícula biliar para formar el colédoco.

Las funciones de la vesícula biliar son el almacenamiento y la concentración de la bilis producida en el hígado, el almacenamiento que presenta la vesícula biliar es muy grande, para después ser expulsada en el momento que se requiera al duodeno; durante el proceso de concentración, el agua y algunos iones se absorben en la mucosa biliar.

2.6 Tipos celulares presentes en el lobulillo hepático

Como se mencionó anteriormente, el lobulillo hepático es la unidad funcional del hígado, sin embargo, el lobulillo está constituido por varios tipos de células que cumplen diversas funciones y mantienen la homeostasis hepática.

2.6.1 Hepatocitos

Los hepatocitos (Figura 4) realizan una gran cantidad de funciones metabólicas, endócrinas y secretoras en el hígado, cerca del 80 % de la masa hepática está constituida por ellos. En una vista de tres dimensiones, los hepatocitos se organizan en placas que anastomosan unas con otras. Estas células tienen forma poligonal, además pueden entrar en contacto tanto con los sinusoides (cara sinusoidal) o los hepatocitos vecinos (cara lateral). Cabe destacar que una porción de la cara lateral de los hepatocitos es modificada para formar los canalículos biliares, mientras que las microvellosidades están presentes abundantemente en la cara sinusoidal y proyectan escasamente dentro de los canalículos biliares.

Ultraestructuralmente, los hepatocitos en su mayoría tienen un único núcleo, sin embargo, las células binucleadas también son comunes. Funcionalmente, son activos en la síntesis de proteínas, lípidos y lipoproteínas, es por ello que presentan gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso, además, contienen muchas pilas de

membranas de Golgi; las vesículas de Golgi son particularmente numerosas en la vecindad del canalículo biliar, reflejando entonces un transporte de constituyentes biliares en esos canales. Otro tipo de biomolécula observada de forma abundante es el glucógeno, la cantidad de esta molécula dependerá en gran medida de si la observación se realiza después de una abundante comida (grandes cantidades de glucógeno) o antes de un ayuno prolongado (pequeñas cantidades de glucógeno).²⁰

2.6.2 Células de Kupffer (KC)

Fueron descritas el siglo pasado por Karl Wilhelm von Kupffer, se sitúan en el interior de la luz sinusoidal y presentan periféricamente pseudópodos (Figura 4), algunos de los cuales se introducen a través del foramen de las células endoteliales constituyendo elementos de fijación de la célula a la barrera sinusoidal. Se encuentran en mayor proporción en la región próxima al espacio porta (acino 1 de Rappaport), disminuyendo progresivamente su frecuencia hacia el acino 3. Su estructura citoplasmática es característica y contiene una gran variedad de vesículas, cuerpos densos y vacuolas, constituyendo un aparato lisosomal muy desarrollado. Dentro del citoplasma, se observan espacios recubiertos por membrana celular a modo de vesículas pinocíticas o fagocíticas y túbulos, el núcleo es ovalado con una membrana ondulada, además, presenta características morfológicas similares a la de los macrófagos. Estas células presentan propiedades que las hacen diferenciables desde el punto de vista histológico; una de ellas es su positividad a la reacción de peroxidasa que se localizan en el retículo endoplásmico rugoso y en el núcleo, a diferencia del resto de las células presentes en los sinusoides hepáticos, las cuales son peroxidasa negativas, otra propiedad es su capacidad para fagocitar partículas de látex de 0.8 μm cuando son administradas por vía endovenosa.

La función de las KC es la de actuar como macrófagos al fagocitar todo aquello que sea inútil y/o nocivo como los eritrocitos viejos, las bacterias, los parásitos e incluso determinadas líneas celulares transportadas en la sangre que circulan por los sinusoides, todo este proceso se lleva a cabo mediante pinocitosis y fagocitosis. Por otra parte, su membrana presenta receptores que son activados por sustancias con poder inmunogénico, siendo además capaces de responder a estímulos con

endotoxinas o sustancias inmunomoduladoras, con la subsecuente producción y liberación de productos como radicales activos, interleucinas, TNF- α , interferón, etc.

Las KC, frente a estímulos como una concentración alta de glucosa en células hepáticas o hipertensión portal son capaces de producir sustancias con efecto tóxico celular que posteriormente serán tratadas por las LSEC.²¹

2.6.3 Células estelares hepáticas (HSC) o células de Ito

También llamadas “fat-storing cells”, adipocitos, pericitos o células estrelladas, fueron descritas por primera vez por Karl Wilhelm von Kupffer en 1876, por otra parte, Toshio Ito en 1951, realizó la descripción de estas mismas células, se localizan en el espacio de Disse entre las LSEC y los hepatocitos (Figura 4), al igual que los pericitos en el endotelio clásico. Su morfología es similar a la de los fibroblastos, ya que emiten brazos citoplasmáticos que se extienden por el espacio de Disse contactando con las LSEC y las microvellosidades de los hepatocitos. Es de notar dentro de sus características, el hecho de que en el citoplasma de estas células se presenten fibras reticulares consideradas precursoras de colágena y de grandes gotas de grasa con un alto contenido de vitamina A, es por esta razón que se tiñen específicamente para la desmina, característica que las diferencia del resto de las células del sinusoides hepático; también poseen un desarrollado aparato de Golgi y abundante retículo endoplásmico rugoso.

La función de estas células no es del todo clara, sin embargo, son consideradas como el reservorio fundamental de la vitamina A en el organismo, elementos importantes en la génesis de la matriz extracelular (ECM) y como el lugar por excelencia de la síntesis del tejido conectivo que constituye el esqueleto del sinusoides en condiciones fisiológicas y la fibrosis que aparece en la cirrosis hepática. En un hígado sano, las HSC están en estado quiescente, actualmente, se considera que éstas al sufrir lesiones crónicas hepáticas sufren un proceso de activación y posterior transdiferenciación en las células parecidas a miofibroblastos, adquiriendo la capacidad de proliferar y de sintetizar colágena del tipo I, III y IV, fibronectina, laminina y ácido hialurónico. La activación consiste en dos fases principales: la iniciación y la perpetuación. La iniciación corresponde a cambios tempranos en la expresión de genes y del fenotipo,

lo que provoca que las células reaccionen a otras citocinas y estímulos, mientras que la perpetuación resulta de los efectos de estos estímulos sobre el mantenimiento del fenotipo y la generación de la fibrosis. La iniciación es el proceso más largo debido a la estimulación parácrina necesaria, mientras que la perpetuación involucra aspas de estimulación tanto parácrinas como autócrinas, además, es dependiente de un número de cambios funcionales tales como la proliferación celular y la quimiotaxis (leucocitaria), la fibrogénesis, el incremento en la contractilidad y la pérdida de la capacidad de almacenar la vitamina A. El estímulo parácrino deriva de células vecinas como, los hepatocitos lesionados, las LSEC, las KC y las plaquetas. Los hepatocitos liberan citocinas tales como TGF- β y TGF- α , entre otras, las LSEC liberan endotelina 1 (ET-1) y fibronectina celular, las cuales tienen un efecto activador sobre las HSC; las LSEC también participan en la activación del TGF- β . Las KC pueden estimular la síntesis de ECM, la proliferación celular y la liberación de vitamina A de las HSC a través de la activación de las citocinas (particularmente el TGF- β , TNF- α) y de ROS. Las plaquetas son también consideradas como fuentes importantes de los factores de crecimiento, notándose de sobremanera el PDGF, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el TGF- β 1; otras fuentes de los factores de crecimiento incluyen a los linfocitos y los monocitos. En la Tabla 1 se muestran todas las citocinas que ejercen un efecto activador de las células esterales y en la Tabla 2 se mencionan las aspas autócrinas y parácrinas envueltas en la perpetuación de la activación de las HSC. Cabe mencionar que al incurrir en lesiones inducidas por el alcohol, se produce un aumento en el número de HSC, propiamente en las zonas próximas a la zona centrolobulillar, acompañado de un incremento en la deposición de colágena y la fibrosis perivenular.^{21, 22}

Tabla 1. Factores parácrinos envueltos en la iniciación de la activación de las HSC

Fuente celular	Factor parácrino
Hepatocitos	Peroxidos lipídicos, TGF- β 1, TGF- α , IL-6, IGF-1, IGFBP, M-CSF, GM-CSF
KC	Peroxidos lipídicos, TGF- β 1, TGF- α , IL-6, TNF- α , PDGF, gelatinasa B
LSEC	TGF- β 1, ET-1, PDGF, fibronectina celular, TGF- β 1 activado
Plaquetas	PDGF, TGF- β 1, EGF
Linfocitos	TGF- α , interleucinas
Monocitos	TNF- α , TGF- β 1, PDGF

Tabla 2. Asas autócrinas y parácrinas envueltas en la perpetuación de la activación de las HSC

Cambio funcional	Factor
Proliferación	PDGF, EGF, TGF- α , bFGF, IGF-1, CTGF
Quimiotaxis de células estelares	PDGF, bFGF, IGF-1, M-CSF, MCP-1
Quimiotaxis de leucocitos	M-CSF, MCP-1
Fibrogénesis	TGF- β 1, acetaldehído, retinoides, IL-1 β , IL-6, TNF- α
Contractibilidad	ET-1, PAF, óxido nítrico, trombina
Degradación de matriz	Menor actividad de MMPs, Mayor actividad de TIMPs
Pérdida de retinoides	Menos ligandos para RAR+RXR que mantienen la quiescencia

2.6.4 Células de Pit

Fueron descritas por Eddie Wisse en 1976, recibieron este nombre debido a sus característicos gránulos citoplasmáticos, lo que en alemán es llamado “Pit”, se sitúan en el interior de la luz sinusoidal en contacto con el endotelio (Figura 4); en su estructura es de notarse que el núcleo se localiza en el lado opuesto al de los organelos. Entre los organelos destacan cuerpos granulosos parecidos a los que se encuentran en las células endócrinas y unas vesículas que se asemejan en estructura a los linfocitos granulares. Debido a su semejanza con los linfocitos, Kaneda et al en 1983²³ sugirieron que las células de Pit tenían actividad NK (natural killer), posteriormente, el aislamiento y purificación de estas células a partir de hígados de ratas y la evidencia de la citotoxicidad espontánea contra las células confirmó que las células de Pit eran las NK propias del hígado, de este modo, representan un medio de defensa natural frente a la colonización por virus o al desarrollo de tumores.^{21, 24}

2.6.5 Células endoteliales sinusoidales (LSEC)

Constituyen la pared sinusoidal (Figura 4), Eddie Wisse fue el primero que los descubrió en 1970 a través de un microscopio electrónico. Este tipo celular es el encargado de soportar el complejo circulatorio sinusoidal mencionado anteriormente, en su interior, a las KC y células de Pit, dejando en su periferia el espacio de Disse ocupado por ECM sembrado de HSC que limitan con las microvellosidades de otras LSEC.

Como características ultraestructurales se mencionan vesículas micropinocitóticas revestidas de cerdas y muchas vacuolas parecidas a lisosomas en el pericarion, indicando una actividad endocitótica bien desarrollada, así como mitocondrias de pequeño tamaño y escaso retículo endoplásmico rugoso. Dentro de sus características más llamativas se encuentran la ausencia de la lámina basal y la presencia de fenestraciones (presencia de orificios denominados foramen), esto junto con su capacidad endocitótica las hacen diferentes y únicas de cualquier otra célula endotelial del cuerpo. El tamaño promedio de las fenestraciones varía entre 50 y 300 nm con una densidad de 3 y 23 μm^2 , estos valores también dependen de la localización en el hígado, siendo mayores y más frecuentes cuanto más próximo está el endotelio al espacio portal.²⁴

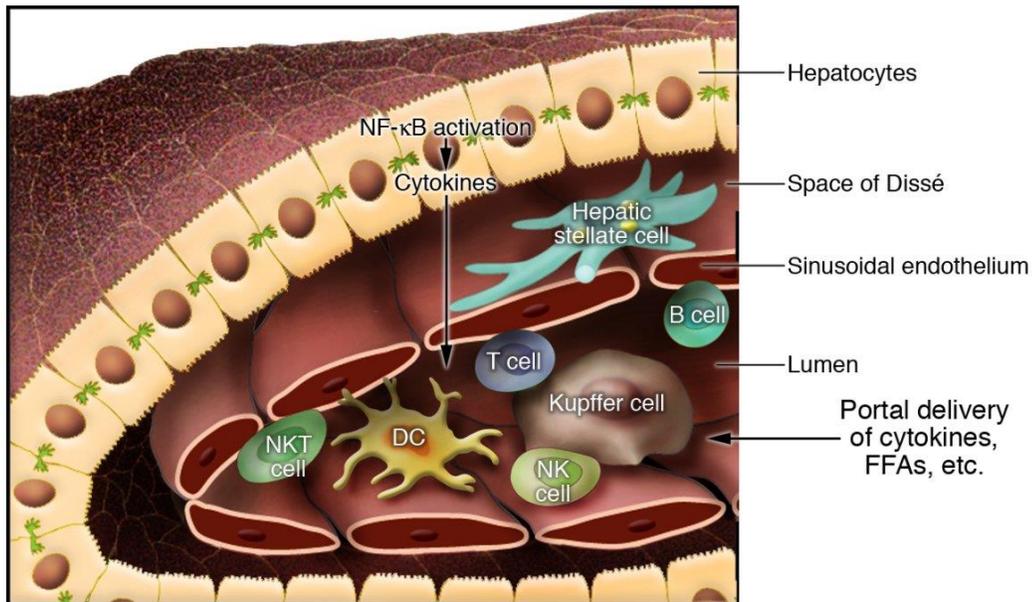


Figura 4. Localización de los tipos celulares presentes en el hígado. Se muestran los hepatocitos, HSC, KC, LSEC y células de Pit.

2.7 Daño al hígado

El hígado es el principal órgano detoxificador del organismo, es por ello que está expuesto a agresiones de diversa etiología; el metabolismo de tales agentes puede causar lesiones, esto dependerá tanto de las sustancias así como del tiempo de exposición al agente, es por ello que se puede suscitar tanto un daño agudo o crónico; de este modo, las funciones propias de este órgano pueden llegar a perder su equilibrio y producirse diversas enfermedades hepáticas. El daño hepático agudo o

falla hepática aguda (Figura 5) ocurre cuando se produce un daño masivo en el hígado, perdiendo de forma abrupta las funciones metabólicas e inmunológicas al comprometerse al menos un 70 % de la masa hepática, lo que conduce a encefalopatías, coagulopatías, y en muchos casos, una falla progresiva en múltiples órganos. La necrosis del tejido hepático es característica de este tipo de daño, lo que se traduce en la pérdida del metabolismo de proteínas, carbohidratos y lípidos.²⁵ Por otro lado, el daño hepático crónico (Figura 5) se considera como aquella agresión persistente al parénquima hepático que puede ser capaz de producir un daño morfológico y/o funcional, clásicamente, se describe la inflamación y la necrosis que persiste en el tiempo como la causa de la fibrosis.²⁶

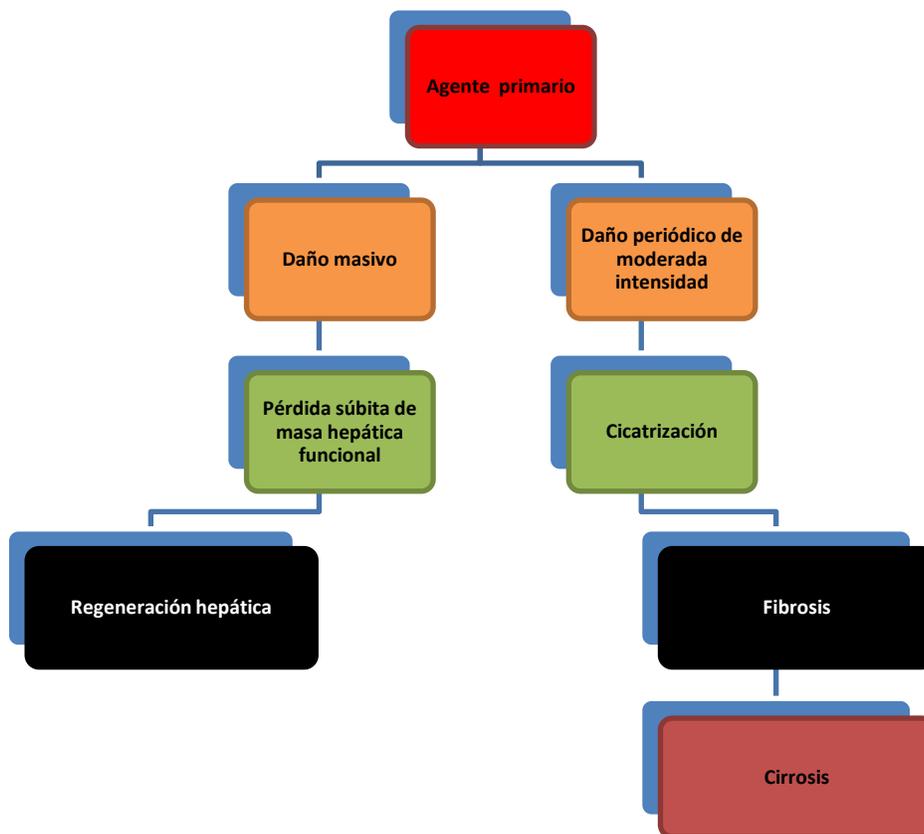


Figura 5. Esquema de los tipos de daño que se presentan en el hígado ante algún agente etiológico y tiempo de exposición.

2.7.1 Fibrosis hepática

La fibrosis hepática es la excesiva deposición de las proteínas de ECM, principalmente de colágena, que distorsiona la arquitectura hepática por la formación

de cicatrices fibróticas y la subsecuente formación de nódulos de regeneración; ocurre en muchos tipos de enfermedades hepáticas crónicas, cabe mencionar que la fibrosis en un estadio avanzado que da lugar al desarrollo de la cirrosis, falla hepática e hipertensión portal, debido a esto, se requiere de un trasplante de órgano para poder curar esta hepatopatía.

La fibrosis hepática resulta del daño crónico por algún agente etiológico, dentro de las causas que propician la fibrosis en países industrializados incluyen las infecciones crónicas por el virus de la hepatitis C (HCV), abuso del alcohol y esteatohepatitis no alcohólica (NASH), siendo esta última reconocida como la mayor causa en los últimos años.¹²

Por mucho tiempo se pensó que la fibrosis era un proceso pasivo e irreversible, debido al colapso que sufría el parénquima hepático y la substitución por tejido rico en colágena, sin embargo, reportes tempranos en los años 70's, sugirieron que la fibrosis avanzada era potencialmente reversible, pero fue hasta los años 80's cuando las HSC se identificaron como las principales productoras de colágena que realmente se empezó a tomar un verdadero interés en la reversión de la fibrosis.

Con la estandarización de los métodos para obtener a las HSC en los 80's, se empezaron a realizar estudios para poder identificar las moléculas clave en la activación de estas células; posterior a esto, se empezaron a utilizar modelos experimentales de fibrogénesis en hígados de murinos, que a su vez ayudaron a corroborar los hallazgos obtenidos previamente con los modelos *in vitro*.²⁷ En 2001, Hammel *et al.*,²⁸ publicaron un trabajo en el que mostraban que la fibrosis avanzada era capaz de ser revertida, diversos investigadores han buscado terapias efectivas para curar esta hepatopatía, sin embargo, hasta el momento, la única terapia efectiva es eliminar al agente etiológico.

Dentro de las terapias que se han propuesto está el uso de moléculas que bloqueen el sistema renina-angiotensina o que presenten actividad antioxidante, no obstante, estas propuestas no han podido ser llevadas a ensayos clínicos, debido en gran medida a los

requerimientos de los mismos, lo que incluiría estudios a largo plazo y biopsias de tejido hepático, un procedimiento por demás invasivo.²⁷

2.7.1.1 Origen y diagnóstico

La fibrosis hepática puede progresar rápidamente a cirrosis bajo diversos factores que pueden ser de origen genético o ambiental. En la Tabla 3 se muestran los factores genéticos y ambientales asociados a la fibrogénesis.

Tabla 3. Factores genéticos y ambientales asociados con la progresión de la fibrosis en diversos tipos de enfermedades crónicas hepáticas

Enfermedad hepática	Gen candidato	Ambiental
Infección crónica por HCV	<ul style="list-style-type: none"> - HFE. -Angiotensinógeno. -TGF-β. -TNF-α. - ApoE.. - MEH. - MCP-1. - MCP-2. -Factor V. 	<ul style="list-style-type: none"> -Consumo de alcohol. -Co-infección con el virus de la hepatitis B (HBV) o por infección del mismo. -Edad en la que se presenta una infección aguda. -Trasplante de hígado. -Diabetes mellitus. -Falta de respuesta a la terapia antiviral
Alcoholismo	<ul style="list-style-type: none"> - IL-10. -IL-1β. - ADH. - ALDH. - CYP2E1. -TNF-α. - CTLA-4. -TAP-2. -MnSOD. 	<ul style="list-style-type: none"> -Consumo de alcohol. -Episodios de hepatitis alcohólica.
NASH	<ul style="list-style-type: none"> - HFE. -Angiotensinógeno. -TGF-β. 	<ul style="list-style-type: none"> -Edad. -Obesidad severa. -Diabetes mellitus. -Hipertrigliceridemia.
Cirrosis biliar primaria	<ul style="list-style-type: none"> -IL-1β. -TNF-α. -ApoE. 	
Hepatitis autoinmune	<ul style="list-style-type: none"> -HLA-2. 	<ul style="list-style-type: none"> -Hepatitis autoinmune tipo 2. -Falta de respuesta a la terapia.

Por otro lado, algunos estudios epidemiológicos han identificado polimorfismos en varios genes candidatos que pudieran tener influencia en la progresión de la fibrosis en el humano. La prueba de oro para determinar la fibrosis es hasta ahora la biopsia hepática, ya que con esto se puede determinar la progresión de la misma usando escalas como la de Metavir (etapas I-IV) o el puntaje de Ishak, por otra parte, se pueden realizar pruebas histológicas para determinar el agente causal de la enfermedad hepática, así como el grado de necrosis e inflamación. Debido a lo anterior, se ha propuesto el uso de ensayos de laboratorio para encontrar otros marcadores que no supongan un riesgo, ejemplo de ellos, es la medición de la actividad plasmática de enzimas como la FA, la γ -GTP, la ALT y la AST, también el conteo de plaquetas, el tiempo de protrombina y la medición de las proteínas plasmáticas que estén relacionadas directamente con la fibrogénesis como los pro-peptidos N-terminal de la colágena tipo III, ácido hialurónico y los inhibidores de metaloproteinasas de tejido tipo-1 (TIMP-1).²⁷

2.7.1.2 Patogénesis de la fibrosis hepática

La fibrosis resulta de la respuesta que presenta el hígado al curar las heridas bajo lesiones realizadas de manera repetida; de modo que después de una lesión aguda las células parenquimatosas se regeneran y reemplazan a las células necróticas o apoptóticas, este proceso está asociado a una respuesta inflamatoria y una limitada deposición de ECM; no obstante, si la lesión persiste, eventualmente la regeneración hepática falla, produciéndose entonces un sustitución de hepatocitos en el parénquima acompañado de una abundante acumulación de ECM incluyendo colágena fibrilar, cabe mencionar que la distribución de la fibrosis dependerá del tipo de lesión, por ejemplo en la infección viral crónica y los desórdenes colestásicos crónicos, el tejido fibrótico se localiza alrededor de los tractos portales, mientras que en el consumo progresivo del alcohol, se localiza en las áreas pericentral y perisinusoidal.²⁹

La fibrosis hepática está asociada a un desbalance en la cantidad y composición de la EMC, presentándose en estadios avanzados hasta seis veces más ECM (incluyendo colágena I, III y IV) que en un hígado sano, como fibronectina, elastina, laminina, ácido hialurónico y proteoglicanos. Esto se debe a que disminuye la actividad de las

metaloproteínas (MMP), que son las encargadas de remover la ECM por la elevada expresión TIMPs.³⁰

Las HSC activadas (Figura 6) son las principales productoras de ECM, en condiciones no patológicas se encuentran en el espacio de Disse y se encargan de almacenar vitamina A, al ser activadas adquieren características contráctiles, proinflamatorias, fibrogénicas y de migración, con ésta última son capaces de trasladarse al sitio de la lesión, secretando grandes cantidades de ECM y regulando la degradación de la misma.³¹⁻³³

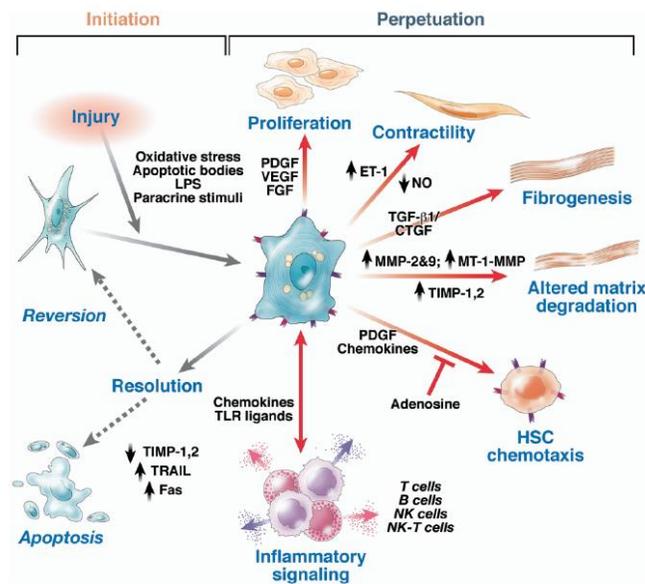


Figura 6. Iniciación y perpetuación de las HSC. Características fenotípicas que adquieren después de una lesión.

Los marcadores que expresan las HSC en su estado quiescente son característicos de los adipocitos, mientras que al activarse expresan marcadores mitogénicos tales como la α -actina de músculo de liso (α -SMA), el c-myb y el factor promotor de los miocitos-2 (Mef-2).²⁷

Para que se produzca el proceso fibrótico, diferentes tipos de células deben de interactuar, empezando con los hepatocitos, por encargarse de los procesos metabólicos en el hígado, son blancos para muchos compuestos que al ser biotransformados pueden dar lugar a moléculas hepatotóxicas, también al exponerse a infecciones virales y sales biliares, etc.³⁴ Una vez que se produce el daño en los

hepatocitos, estos liberan ROS o mediadores fibrogénicos e inducen el reclutamiento de leucocitos por las células inflamatorias. Las células inflamatorias más que otras son las encargadas de activar a las HSC para secretar la colágena, además, la apoptosis de los hepatocitos dañados, estimula las acciones fibrogénicas de los miofibroblastos hepáticos.³⁵ Las HSC activadas liberan quimosinas inflamatorias, expresan moléculas de adhesión celular y modulan la activación de linfocitos.³⁶ De lo anterior, se produce un círculo vicioso en el que las células inflamatorias y fibrogénicas se activan unas a otras. Por otro lado, las KC son macrófagos propios del hígado, jugando un papel muy importante en la inflamación del hígado al liberar ROS y citocinas.^{37, 38} Un dato interesante es que en los desórdenes colestásicos crónicos, las LSEC estimulan a los miofibroblastos acumulados en el espacio porta para iniciar la deposición de colágena alrededor de los conductos biliares dañados.³⁹ Finalmente, los cambios producidos en la composición de la ECM pueden estimular directamente la fibrogénesis, por ejemplo, la colágena tipo IV y el fibrinógeno son capaces de estimular a las HSC residentes por la activación del TGF- β 1, la colágena fibrilar por su parte, se puede unir y activar a las HSC vía integrinas, además, la ECM alterada puede servir como reservorio para factores de crecimiento y MMPs.^{40, 41}

2.7.1.3 Citocinas clave en el desarrollo de la fibrosis

Las citocinas regulan la respuesta inflamatoria al modular la fibrogénesis hepática *in vitro* e *in vivo*,⁴² entre los factores que ejercen un efecto se encuentran el TGF- β 1, ya que este favorece la transición de las HSC a células parecidas a miofibroblastos, estimula la síntesis de las proteínas de ECM e inhibe su degradación,⁴³ por otro lado, el PDGF es el mitogeno más potente para la activación de las HSC, además, está regulado a la alza en la fibrosis hepática y cabe mencionar que su inhibición atenúa la fibrogénesis hepática experimental.⁴⁴

Otra citocina, por demás importante es el TNF- α , ésta se asocia con una variedad de condiciones fisiológicas y patológicas incluyendo citotoxicidad, diferenciación y crecimiento celular, modulación inmune y actividad proinflamatoria; muchas de las respuestas asociadas al TNF- α son producto de la regulación en la expresión de los genes que ésta produce. Se encuentra elevada en las enfermedades hepáticas agudas y crónicas, produciendo inflamación en este órgano.⁴⁵

Las citocinas con efecto vasoactivo también pueden regular la fibrogénesis hepática, dentro de éstas, la angiotensina II parece jugar un papel muy importante, esto se debe a que actúa como efector en el sistema renina-angiotensina, el mayor regulador de la homeostasis de la tensión arterial, se ha observado que componentes clave de este sistema se expresan en los hígados lesionados de forma crónica y en las HSC activadas, generando angiotensina II (Ang II) promoviendo un asa positiva,^{46, 47} ya que la Ang II promueve en las HSC activas la proliferación celular y la migración celular, la secreción de las citocinas proinflamatorias y la síntesis de colágena.⁴⁸⁻⁵⁰ Cabe destacar que los fármacos que actúan sobre el sistema renina-angiotensina reducen de forma marcada la fibrosis.^{51, 52}

2.7.1.4 FR y su relación con la fibrosis

Los FR son moléculas con una cantidad de electrones impares que buscan la manera de poder estabilizarse, es por ello que atacan a otras moléculas para obtener de ellas el electrón que les haga falta, dentro de las moléculas blanco se encuentran los lípidos polinsaturados de las membranas, produciéndose un fenómeno conocido como peroxidación lipídica. Dentro de los FR se pueden mencionar varios de éstos, sin embargo, aquellos que presentan mayor relevancia para los sistemas biológicos son las ROS, que bajo las condiciones de homeostasis son benéficas, sin embargo, al haber una pérdida del estado prooxidante/antioxidante de la célula se produce el estrés oxidativo, el cual está implicado en varias enfermedades incluyendo las del hígado.⁵³ Las ROS y otros intermediarios relacionados contribuyen a la muerte de los hepatocitos (apoptosis y necrosis), la perpetuación de la respuesta inflamatoria y en la comunicación tanto en las células paraneurales como en las que no lo son.^{54, 55} Los altos niveles de ROS provenientes de las KC pueden activar a las HSC y producirse el mecanismo fibrogénico, además de lo anterior, las ROS inducen la producción de PDGF que a su vez también activa a las HSC.⁵⁶

2.7.2 Cirrosis hepática

Se define como el desarrollo histológico de nódulos de regeneración rodeados por bandas fibróticas en respuesta a una lesión crónica en el hígado, lo que conduce a la distorsión de la vasculatura hepática provocando una hipertensión portal, ésta última es la primera y más importante consecuencia de la cirrosis junto con el daño en la

función de los hepatocitos e implica muchas de las consecuencias que conlleva esta hepatopatía. La hipertensión portal resulta de un aumento en la resistencia intrahepática combinada con un aumento en el flujo sanguíneo portal y la vena hepática, esto se debe a las modificaciones fibróticas y de la vasculatura del tejido hepático, los valores que se llegan a alcanzar son de 10-12 mm de Hg.

La biología de la cirrosis hepática se caracteriza por un constante estímulo de la regeneración hepatocelular en un microambiente caracterizado por la inflamación crónica y el tejido fibrótico, esto también puede llevar al desarrollo del carcinoma hepatocelular.⁵⁷ La cirrosis y su distorsión vascular asociada son consideradas tradicionalmente como irreversibles, pero estudios recientes sugieren que la regresión o incluso la reversión de la cirrosis son posibles.^{58, 59}

2.7.2.1 Causas de la cirrosis

La cirrosis comúnmente puede ser identificada por el historial médico del paciente combinado con pruebas de laboratorio tanto sanguíneas como histológicas. Se ha identificado que las principales causas de la cirrosis en países desarrollados son las enfermedades relacionadas al consumo de bebidas alcohólicas y el HCV, mientras que en otros países en vías de desarrollo el HBV es la causa mayoritaria. Otras causas para el desarrollo de la cirrosis son de origen genético, tal es el caso de la hemocromatosis y la enfermedad de Wilson, en donde se presenta un mal manejo por parte del organismo del hierro y el cobre respectivamente. Estudios epidemiológicos reportan un gran número de factores que pueden contribuir al desarrollo de la cirrosis, dentro de los que se encuentran la edad mayor a 50 años, el género masculino, la obesidad, la resistencia a la insulina, la diabetes tipo 2, la hipertensión arterial y las dislipidemias.⁶⁰

2.7.2.2 La regresión de la cirrosis

La regresión de la cirrosis es un fenómeno que se ha demostrado en modelos animales a partir del retiro del agente causal y de dar el tiempo suficiente para este proceso, además de que se ha propuesto que la cirrosis desarrollada en semanas de tratamiento con algún hepatotóxico presenta características diferentes a las de una cirrosis desarrollada en años, particularmente por el hecho de que las fibras de

colágena en el retículo son más “fácilmente reabsorbidas que las bandas de colágena más gruesas”.^{61, 62} Sin embargo, aunque se ha demostrado la regresión de la cirrosis en modelos animales, no se puede decir lo mismo para el caso de los humanos; las evidencias de la regresión fibrótica o cirrótica se reportaron para diferentes etiologías, hepatitis viral, hepatitis autoinmune y NASH. No obstante, cuando se revisó este proceso por histopatólogos experimentados, concordaron en que hubo un grado variable de regresión de la cirrosis, pero no una reversión de la misma en muchos de los casos. Además de lo anterior, no se tiene evidencia que sustente que las anomalías vasculares intrahepáticas regresen a su estado normal, de hecho, la evidencia disponible sugiere que las alteraciones vasculares persisten incluso en casos extensivos de la regresión de la fibrosis y, que los sinusoides continúan con las anomalías presentadas en la fibrosis, contrario a lo que dicen otros grupos de trabajo.⁵⁷

2.7.2.3 Terapias antifibrogénicas

La evidencia actual sobre el uso de posibles agentes terapéuticos está limitada a su uso en modelos animales de cirrosis experimental, sin embargo, éstos en su gran mayoría han demostrado poseer efectos positivos sobre esta hepatopatía (Figura 7). Considerando que la fibrosis es la mejor forma para asegurar que se produzca un daño crónico al parénquima hepático, muchos de los tratamientos se enfocan en el hecho de prevenir el desarrollo de la fibrogénesis; en el 2008, Reyes-Gordillo y colaboradores⁶³ demostraron que la curcumina fue capaz de prevenir la cirrosis inducida por la ligadura del conducto biliar y por CCl₄; en el año 2012, Arauz y colaboradores⁶⁴ demostraron que el uso del café atenuaba la fibrosis inducida con TAA, al disminuir la expresión de TGF- β y del factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF); la investigación realizada por Pérez-Vargas y colaboradores⁶⁵ en 2014, demostró que la hesperidina previno la fibrosis al disminuir la expresión del factor nuclear-kappa B (NF- κ B), CTGF y TGF- β . Estos estudios muestran que el uso de terapias de origen natural son eficaces en la prevención de la fibrosis y la cirrosis consecuentemente; sin embargo, no solo son capaces de tener un efecto preventivo, Reyes-Gordillo⁶³, mostró que la curcumina también es capaz de revertir la cirrosis experimental. Por lo anterior, en la cirrosis, además de regresar el parénquima

hepático a un estado normal, otro objetivo es el de reducir la hipertensión portal, es por ello que se plantea el uso de agentes con posibles propiedades antifibróticas concomitantemente con tratamientos enfocados en el manejo de la hipertensión portal.

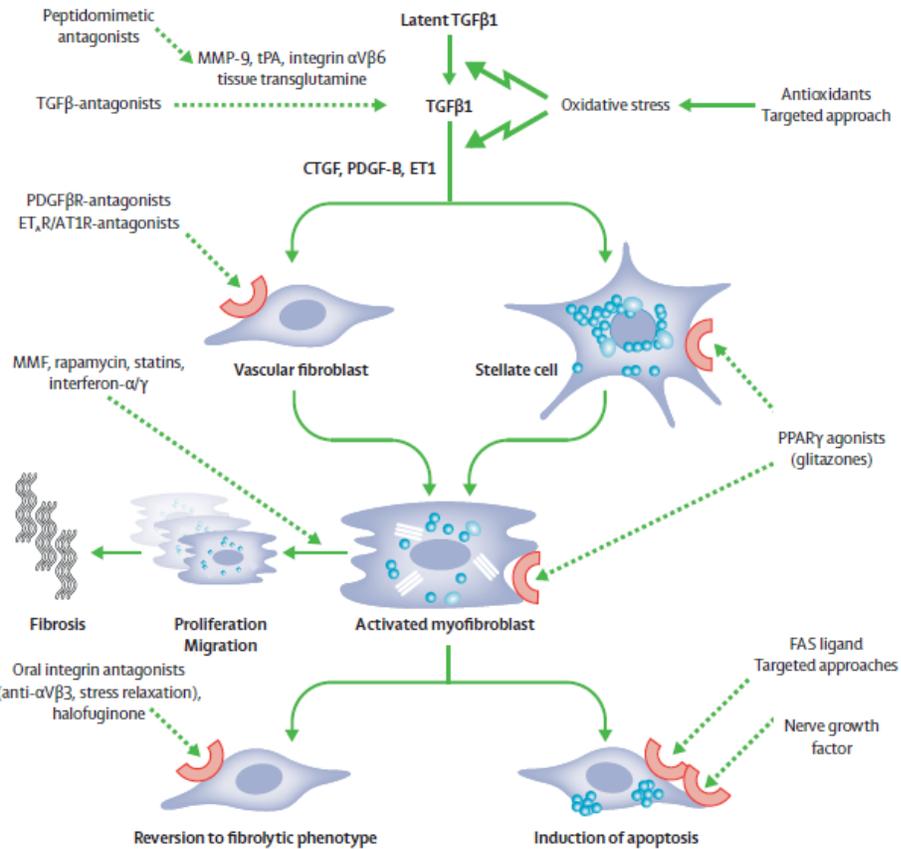


Figura 7. Posibles blancos terapéuticos. Enfoques antifibróticos y candidatos para tratamientos combinados.

2.7.2.4 Modelos experimentales de daño hepático

El uso de modelos experimentales para el estudio de la cirrosis ha ayudado de sobre manera a entender tanto los mecanismos fisiopatológicos como los moleculares en el desarrollo y progresión de esta hepatopatía. Casi todas las lesiones que se pueden presentar en el hígado pueden ser inducidas, ya sea la necrosis, la esteatosis, las lesiones venulares hepáticas, la colestasis y la cirrosis.

En los modelos de daño hepático se pueden utilizar tanto animales completos o cultivos celulares, el uso de los animales completos es esencial para demostrar que cierto agente es capaz de causar un efecto nocivo con relevancia fisiológica. En el uso

de animales, las ratas destacan debido a su fácil manipulación y bajo costo respecto de otros modelos, además, el uso de un modelo en común permite hacer correlaciones con los hallazgos realizados por diversos grupos de trabajo.

Dentro de los hepatotóxicos que se utilizan para inducir la cirrosis experimental, el CCl_4 es uno de los más ampliamente usados, este es un haloalcano que antiguamente se utilizaba como extintor y solvente en la producción de refrigerantes, sin embargo, su uso fue discontinuado debido a su alta toxicidad; ésta última depende de la dosis y la duración de la exposición. A bajas dosis, se presenta una pérdida en la homeostasis del Ca^{2+} , la peroxidación lipídica, la liberación de citocinas con diversas funciones y la necrosis.⁶⁶⁻⁶⁹, mientras que a dosis elevadas y por un tiempo prolongado de administración, se presenta la fibrosis, cirrosis e incluso el carcinoma hepatocelular.⁷⁰

El metabolismo del CCl_4 comienza con la formación del radical triclorometilo (CCl_3^*)⁷¹ al romperse el enlace del cloro y el carbono debido a la acción del Citocromo P450 (Figura 8) presente en el retículo endoplásmico,⁷² sin embargo, no solo este organelo biotransforma el CCl_4 , también la mitocondria ha sido identificada como otro metabolizador.⁷³ El CYP2E1 es la isoforma que principalmente se encarga de estos bioprocesos, no obstante, otras isoformas como la CYP2B1 y CYP2B2 son capaces de realizar estas funciones (Figura 8),⁷⁴ en el humano el CYP2E1 es la principal metabolizador, sin embargo, en altas dosis la isoforma CYP3A también contribuye.⁷⁵ El CCl_3^* es capaz de unirse de forma covalente al CYP2E1 en el sitio activo de la enzima,⁷⁶ o al grupo hemo,⁷⁷ causando así su propia inactivación.

Este radical reacciona con un gran número de biomoléculas tales como ácidos grasos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y aminoácidos;⁷⁰ El CCl_3^* puede extraer un átomo de hidrógeno de los ácidos grasos insaturados y formar cloroformo; además de inducir aductos y dañar el DNA.⁷⁸ En 1926, Lamson and Wing⁷⁹ fueron los primeros en reportar que la intoxicación por CCl_4 producía cirrosis, mientras que Cameron y Karunaratne⁸⁰ en 1932 fueron los que publicaron un estudio sistemático que establecía tanto la morfología así como la estandarización del modelo experimental. Para producir un estado cirrótico, es necesario administrar dosis repetidas de CCl_4 , sin tomar en cuenta el tipo de animal o la vía de administración.

La dosis recomendada para ello es la de 400 mg/kg de peso, usando como vehículo de administración el petrolato líquido, la cirrosis se observa después de ocho semanas, además de lo anterior, la severidad de la hepatopatía aumenta de acuerdo al tiempo de administración.⁸¹ La cirrosis inducida con el CCl₄ emula las características principales de la cirrosis humana: nódulos de regeneración rodeados por tejido fibrótico, hipertensión portal, el hígado es nodular y hay proliferación de ductos biliares.⁸²

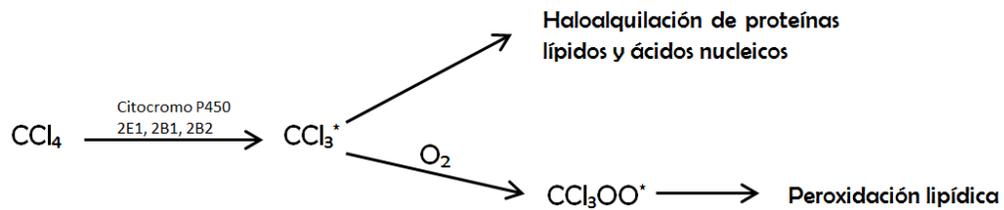


Figura 8. Metabolismo del CCl₄ por tres isoformas del Citocromo P450.

Otro hepatotóxico que emula la cirrosis es la TAA, anteriormente se utilizaba como solvente para la industria del papel y tratamiento del cuero, este compuesto es soluble en agua y en alcohol; además de ser hidrolizable por ácidos y bases, también puede reaccionar con sales y metales pesados.⁸³ La TAA al igual que el CCl₄ debe ser activada para producir su hepatotoxicidad, ésta es metabolizada por la isoforma CYP2E1 o por la flavín monooxigenasa (FMO) (Figura 9), el producto formado es la tioacetamida sulfóxido (TASO), un radical altamente reactivo, el cual posteriormente también puede ser biotransformado por la misma enzima a tioacetamida disulfóxido (TASO₂), estos dos metabolitos son capaces de inducir daño a las membranas celulares y organelos, así como producir ROS por la unión covalente a macromoléculas como proteínas en sus lisinas de las cadenas laterales.⁸⁴ Se ha reportado que una dosis única de TAA causa la necrosis centrilobular, la elevación de las transaminasas plasmáticas, la necrosis y la infiltración periportal, mientras que una dosis crónica causa la necrosis, la inflamación, la fibrosis, la cirrosis y el carcinoma hepatocelular, además, causa un estado de estrés oxidativo, aumentado el daño a biomoléculas dado por los FR.⁸⁵

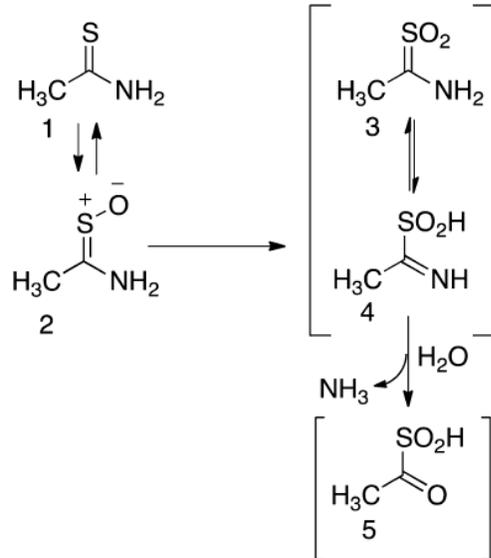


Figura 9. Formación de metabolitos de la TAA. 1. TAA. 2. TASO. 3 y 4. TASO₂ (proceso de tautomerización). 5. Ácido acetil sulfínico

2.8 Estrés oxidativo

El daño oxidativo o estrés oxidativo se define como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura de la homeostasis existente entre las moléculas prooxidantes/antioxidantes ya sea por un déficit del sistema antioxidante o por un incremento en la producción de FR, esto trae consigo un desequilibrio en la célula, por lo tanto, las funciones que realiza se modifican, consecuentemente las funciones de los órganos se ven afectadas, es por ello que se considera al estrés oxidativo como una pieza clave en diversas patologías y es de sumo interés dentro de las áreas médico-biológicas su estudio para así poder contrarrestar los daños que este induce en el organismo a nivel genético.

2.8.1 Radicales libres (FR)

Son moléculas altamente reactivas que se encuentran en una forma inestable, por su naturaleza altamente reactiva dañan diversas células y sistemas. En la naturaleza se forma por la ganancia o pérdida de uno o más electrones, se pueden encontrar diversos tipos de FR, tales como las ROS, especies reactivas de nitrógeno (RNS), especies reactivas de azufre (RSS) u otras moléculas que provengan del metabolismo de compuestos como la TAA, el CCl₄, el paracetamol o incluso por alteraciones fisiológicas como en las dietas hipercalóricas y/o insuficiente en antioxidantes, los procesos inflamatorios, el ejercicio extenuante o la reperfusión isquémica, también de

patologías tales como la Diabetes tipo 2, el síndrome metabólico, la hipertensión, la cirrosis, etc.

Los FR se clasifican en tres categorías dependiendo de su naturaleza:

-FR inorgánicos o primarios: Se originan por la transferencia de electrones sobre el átomo de O₂, representan distintos estados en la reducción de éste y se caracterizan por tener una vida media muy corta.

-FR orgánicos o secundarios: Se pueden originar por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo perteneciente a una molécula orgánica o por la reacción de dos radicales entre sí, poseen una vida media más larga que los radicales primarios.

-Intermediarios estables relacionados con los ROS: Corresponde a moléculas que *per se* no son FR, sin embargo, son capaces de generarlos o resultan del metabolismo de los mismos.

Los FR se pueden generar de forma intracelular o extracelular, células como los neutrófilos, los monocitos, los macrófagos, los eosinófilos y las endoteliales, dentro de éstas, por acción de las enzimas xantina oxidasa (XO), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, indolamina-2,3 dioxigenasa, triptófano 2,3-dioxigenasa, mieloperoxidasa, galactosa oxidasa, ciclooxigenasa, lipooxigenasa, monoaminoxidasa y Citocromo P450.

Dentro de las biomoléculas que son blancos para los FR encontramos a:

-Lípidos: Son constituyentes de las membranas celulares ricas en ácido grasos poliinsaturados, al ser atacados se produce la peroxidación lipídica, alterando de este modo la permeabilidad celular llevando después a la necrosis. Los factores que influyen en la magnitud de la peroxidación lipídica incluyen: la naturaleza y la cantidad del agente iniciador, la accesibilidad de los ácidos grasos poliinsaturados y la cantidad presente en la membrana celular, la presencia de metales de transición, la tensión de oxígeno y los niveles de antioxidantes ya sea endógenos o exógenos.

Cabe mencionar que para que estas reacciones ocurran de manera significativa se deben de utilizar catalizadores tales como los metales de transición.⁵³

2.8.1.2 RNS

El óxido nítrico (NO) es producido en organismos superiores como producto de la oxidación de uno de los nitrógenos guanidina de la L-arginina.⁸⁹ Este proceso es catalizado por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) en cualquiera de sus isoformas (nNOS, iNOS y eNOS). Dependiendo del microambiente, el NO puede ser convertido a otras RNS, tales como el radical nitrosonio (NO⁺), anión nitroxilo (NO⁻) o peroxinitrito (ONOO⁻). El NO tiene una vida media relativamente larga y está involucrado en procesos tales como la neurotransmisión, la peristalsis y la regulación de la tensión sanguínea.⁹⁰

2.8.1.3 RSS

Las ROS reaccionan frecuentemente con los grupos tioles celulares para formar los disulfuros correspondientes, estos son ligeramente oxidantes bajo condiciones fisiológicas, sin embargo, parece ser que el azufre puede ser fácilmente oxidado más allá del grupo disulfuro por las ROS bajo condiciones de estrés oxidativo. La activación redox del enlace disulfuro por especies oxidantes para formar disulfuros-S-monóxidos o disulfuros-S-dióxidos se ha observado tanto *in vivo* como *in vitro*,⁹¹⁻⁹³ además se ha sugerido que participan en una importante vía por la cual el estímulo oxidativo es llevado a través de la célula.^{94, 95}

Las rutas propuestas para la formación de disulfuros-S-óxidos provienen de la reacción del GSH con el H₂O₂ en concentraciones equimolares a pH 6 dando lugar también al ácido sulfínico,⁹¹ otras rutas propuestas son la interacción del GSH con ¹O₂^{96, 97} formando *S*-nitrosoglutatión⁹² y *S*-nitroglutation.⁹⁸ Por lo anterior, se piensa que bajo condiciones oxidantes, cantidades significantes de GSH son convertidas a disulfuro-S-monóxidos, disulfuro-S-dióxidos y disulfuros.⁹⁹

2.9 Antioxidantes

De acuerdo a Halliwell en 1990,¹⁰⁰ son sustancias que a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable retardan o previenen la oxidación del mismo,

también se refiere a aquella sustancia que inhibe la reacción de un FR,¹⁰¹ como sustratos oxidables, se puede mencionar biomoléculas como los lípidos, las proteínas, los carbohidratos y el DNA.⁸⁶ Se encuentran naturalmente en nuestro organismo así como en diversos alimentos, su utilidad radica en el hecho de que sirven como medio de defensa contra los FR y los efectos deletéreos que éstos producen. Es por ello que actualmente son vistos como una vía potencial para la prevención y/o el tratamiento de pérdida de la homeostasis del organismo tales como inflamación, la arteriosclerosis, las enfermedades virales, la cirrosis, etc.¹⁰¹ Los antioxidantes al tener mayor afinidad hacia los FR que otras moléculas, ejercen su acción al sacrificar su propia integridad molecular al donar el electrón faltante a los FR, con esto, se convierten en un FR débil con poca reactividad para poder mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante en la célula.⁸⁶ Sin embargo, no todos los antioxidantes actúan de esta manera, existen enzimas que catalizan las reacciones químicas de moléculas sustratos que reaccionan con los FR.¹⁰²

Los antioxidantes se pueden clasificar de acuerdo a su procedencia en endógenos (el organismo es capaz de sintetizarlos) o exógenos (no son producidos por el cuerpo) y por su naturaleza en enzimáticos y no enzimáticos. Dentro de los antioxidantes endógenos, se encuentran la SOD, su función es la de catalizar la dismutación de los $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 ,¹⁰³ (Figura 11) utiliza como cofactores al cobre, manganeso, hierro y zinc.¹⁰⁴ La CuSOD y ZnSOD, se localizan en el citosol y el espacio intermembranal de la mitocondria, la MnSOD se encuentra en la matriz mitocondrial, mientras que la FeSOD se localiza en el espacio periplasmático.⁸⁶

Otra enzima con capacidad antioxidante es la CAT, ésta tiene una alta distribución en el organismo, principalmente en el hígado y riñón, baja en tejido conectivo, nervioso y en el epitelio, se localiza en la mitocondria, peroxisomas y citosol,⁸⁶ su función consiste en biotransformar el H_2O_2 en H_2O y O_2 (Figura 11), ya que el H_2O_2 en presencia de hierro o cobre puede ser convertido en OH^{\cdot} , la SOD y la CAT actúan en conjunto, requiriéndose las dos para un óptimo funcionamiento.¹⁰⁵

La GPx es otra enzima antioxidante por demás importante, ocupa al selenio como cofactor y se localiza principalmente en el citoplasma y la mitocondria. La función de

la GPx es la de reducir hidroperóxidos lipídicos y no lipídicos así como el H_2O_2 (Figura 11), oxidando al mismo tiempo dos moléculas GSH.¹⁰⁶

Otro antioxidante endógeno aunque no enzimático es el GSH, este antioxidante puede ser considerado el más importante, se sintetiza en el citoplasma por la acción secuencial de dos enzimas: la γ -glutamilcisteína sintetasa y la glutatión sintetasa.¹⁰⁷ El GSH ejerce su efecto al reducir los grupos tiol de las proteínas al actuar como un donante de electrones, durante este proceso el glutatión pasa a su forma oxidada (GSSG) que está constituido por dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro, el GSSG es regenerado gracias a la enzima glutatión reductasa, la cual transfiere electrones del NADPH al GSSG, reduciendo al mismo tiempo a esta molécula,¹⁰⁸ además el GSH funciona directamente en la eliminación de las ROS al actuar como sustrato de la GPx¹⁰⁷ (Figura 11).

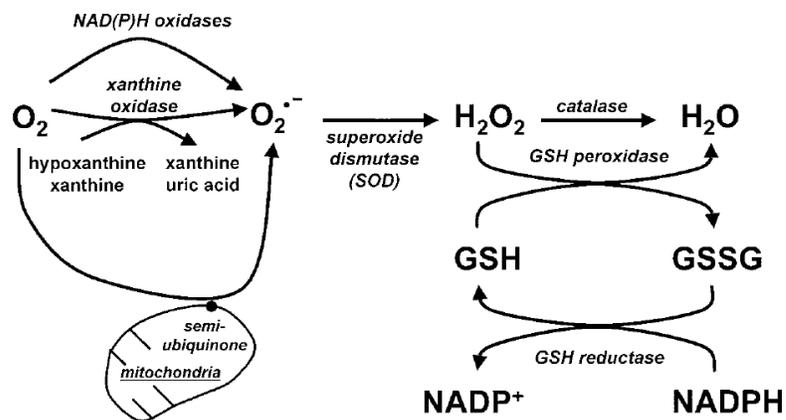


Figura 11. Producción del O_2^{*-} por parte de la xantina oxidasa. Mecanismo encargado de eliminarlo involucrando a las enzimas SOD, CAT y GPx.

Los antioxidantes exógenos deben de ser obtenidos desde la dieta ya que no los produce el organismo, se pueden encontrar principalmente en las plantas y sus productos. Dentro de estos antioxidantes, destacan las vitaminas C y E, los betacarotenos y los flavonoides.⁸⁶

2.9.1 Flavonoides

Son compuestos fenólicos que sirven de pigmentos, así como medio de defensa antioxidante, se encuentran principalmente en las frutas, las semillas, los vegetales, las bebidas fermentadas así como en las infusiones hechas a partir de las hojas de

plantas. Se estima que en promedio se consumen 23 mg/día de flavonoides, siendo la Q el más abundante, sin embargo, éstos no aportan energía a nuestro organismo.¹⁰⁹ Los flavonoides presentan un esqueleto de difenilpirano ($C_6C_3C_6$), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterociclo),¹¹⁰ contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos, además, poseen propiedades quelantes para los metales de transición.¹¹¹ Los átomos de carbono de los anillos A y C se enumeran del 2 al 6, y los del anillo B del 2' al 6'. Dado que la estructura puede variar, dará lugar a diversos tipos de moléculas, es por ello que los flavonoides se clasifican en flavanos, flavonoles, flavonas y antocianidinas¹⁰⁹ (Figura 12). Es importante mencionar que hay tres características básicas dentro de la función antioxidante de los flavonoides, estas son la presencia de un grupo catecol en el anillo B, un doble enlace en la posición 2-3 del anillo C y grupos hidroxilo fenólicos en las posiciones 3 y 5 del anillo C y A respectivamente.¹¹² La Q destaca entre los flavonoides ya que presenta las tres características.¹⁰⁹

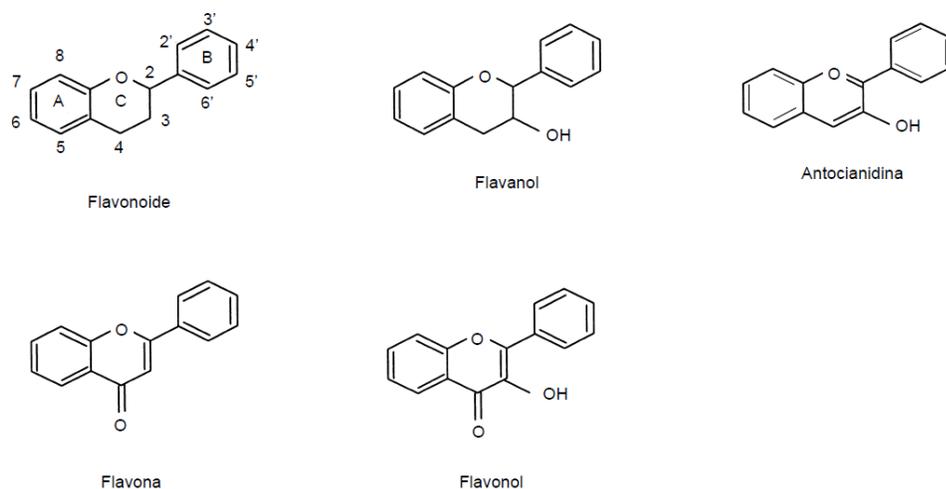


Figura 12. Estructura básica de un flavonoide y de sus derivados.

Otro aspecto importante es que los flavonoles y las flavonas se unen a grupos de azúcar preferentemente en la posición 3 y en menor frecuencia en la posición 7 del anillo A, por lo que estos compuestos se encuentran como O-glucósidos, mientras que el azúcar que se encuentra preferentemente es la D-glucosa. Cuando el flavonoide se encuentra sin su azúcar se llama aglicona, cabe mencionar que los O-glucósidos son más solubles en agua y menos reactivos que las agliconas correspondientes.¹⁰⁹

2.9.1.1 Quercetina (Q)

El flavonol Q (5,7,3',4'-hidroxiflavonol) es un compuesto polifenólico altamente distribuido en frutas, semillas, vegetales, y plantas (Figura 13). Se estima que su consumo promedio es de 16 mg/día expresado como aglicona. En los alimentos, se pueden encontrar en su forma de O-glucósido, preferentemente unido a glucosa o rutinosa (6-O-ramnosil-glucosa), con altas concentraciones en cebollas, manzanas, y diversos tipos de té.^{113, 114} En E.U.A. la Q y la rutina se comercializan en los mercados como suplementos alimenticios.¹¹⁵ Estudios han demostrado que la Q presenta propiedades terapéuticas contra diversas patologías como cardiopatías isquémicas, arterioesclerosis, lesiones renales y obstrucción biliar crónica.^{116, 117} También presentando propiedades como antiinflamatorio,¹¹⁸ antitumoral,¹¹⁹ antiviral, inhibidor de la agregación plaquetaria y oxidación de LDL.¹²⁰

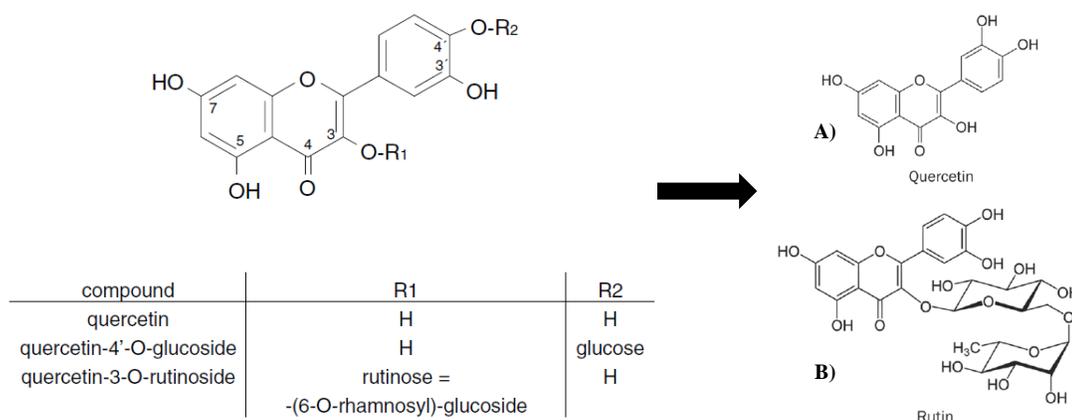


Figura 13. Estructura general de la Q mostrando sus posibles sustituciones y derivados. **A)** Q en su forma de aglicona. **B)** Rutina

Cabe mencionar que la Q y la rutina no presentan los mismos efectos farmacológicos, sugiriendo que la presencia del grupo de rutinosa es crucial para algunos de los efectos protectivos de la rutina.¹²¹ Además, Chaudhary y Willett en el 2006 mostraron que la Q fue capaz de inhibir a los citocromos CYP1A1 y CYP1B1, mientras que la rutina no produjo este efecto.¹²²

Las propiedades antioxidantes de la Q son debidas a su estructura, siendo de vital importancia la presencia de los grupos hidroxilo fenólicos y el grupo catecol en el anillo B.¹²³ Bors y colaboradores elucidaron las características que debe presentar un flavonoide para que tenga capacidad como antioxidante, estas características

consisten en la presencia de un grupo *orto*-dihidroxi o catecol en el anillo B, un enlace doble en los carbonos 2-3 del anillo C y sustituciones de grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 de los anillos C y A, respectivamente.^{112, 124}

Dado que la Q se obtiene de la dieta, ésta debe de pasar por el tracto gastrointestinal para su posterior absorción y metabolismo, sin embargo, la biodisponibilidad de la Q como aglicona es muy limitada.¹²⁵ Algunos estudios han reportado que la Q en plasma no se pudo encontrar en su forma libre después de una alta ingesta de la misma.^{126, 127} Es por ello que la Q circula en la sangre de forma conjugada, mientras que la capacidad antioxidante de los metabolitos es considerablemente menor.¹²⁸ Sin embargo, otro estudio reportó que la concentración plasmática de la Q aumentó de forma considerable cuando se administró en su forma O-glucósido en lugar de la aglicona, lo que sugiere que no solo es importante el grupo presente en la Q (rutinosa o glucosa), además de lo anterior, la matriz de donde se obtiene puede influir en la absorción de la misma o el hecho de que la microbiota tanto hidroliza como rompe a la Q en ácidos fenólicos.¹²⁹

Después de su ingesta (Figura 14), la Q en su forma de aglicona es metabolizada en las células encargadas de la absorción del epitelio intestinal a su forma *O*-metilada para después ser biotransformada a 3'-*O*-metilquercetina (isoharmnetina) y en menor medida a 4'-*O*-metilquercetina (tamaraxetina), como sulfatada o glucoronidada.¹³⁰ Seguido a esto, los derivados de la Q y la que no fue metabolizada, pasan a la circulación sanguínea a través de la vena portal hepática. En el hígado, la Q y sus derivados son sujetos a ser conjugados por los mecanismos de fase 2. Además, la enzima catecol-*O*-metiltransferasa (COMT), presente tanto en el hígado como en los riñones puede participar en la metilación de la Q o sus derivados.¹³¹

La Q se distribuye en muchos órganos tales como los pulmones (mayor concentración)¹³² los testículos, los riñones, el timo, el corazón y el hígado, identificándose primeramente en su forma conjugada, aunque también se encuentra en su forma libre.

La Q puede ser eliminada en la orina cuando es absorbida de forma sistémica, alternativamente puede ser excretada en la bilis y en las heces. Otra forma es por medio de la exhalación, ya que este flavonol puede ser degradado a dióxido de carbono (CO₂) y ácidos fenólicos por la microbiota, éstos últimos siendo eliminados por las heces.¹³¹

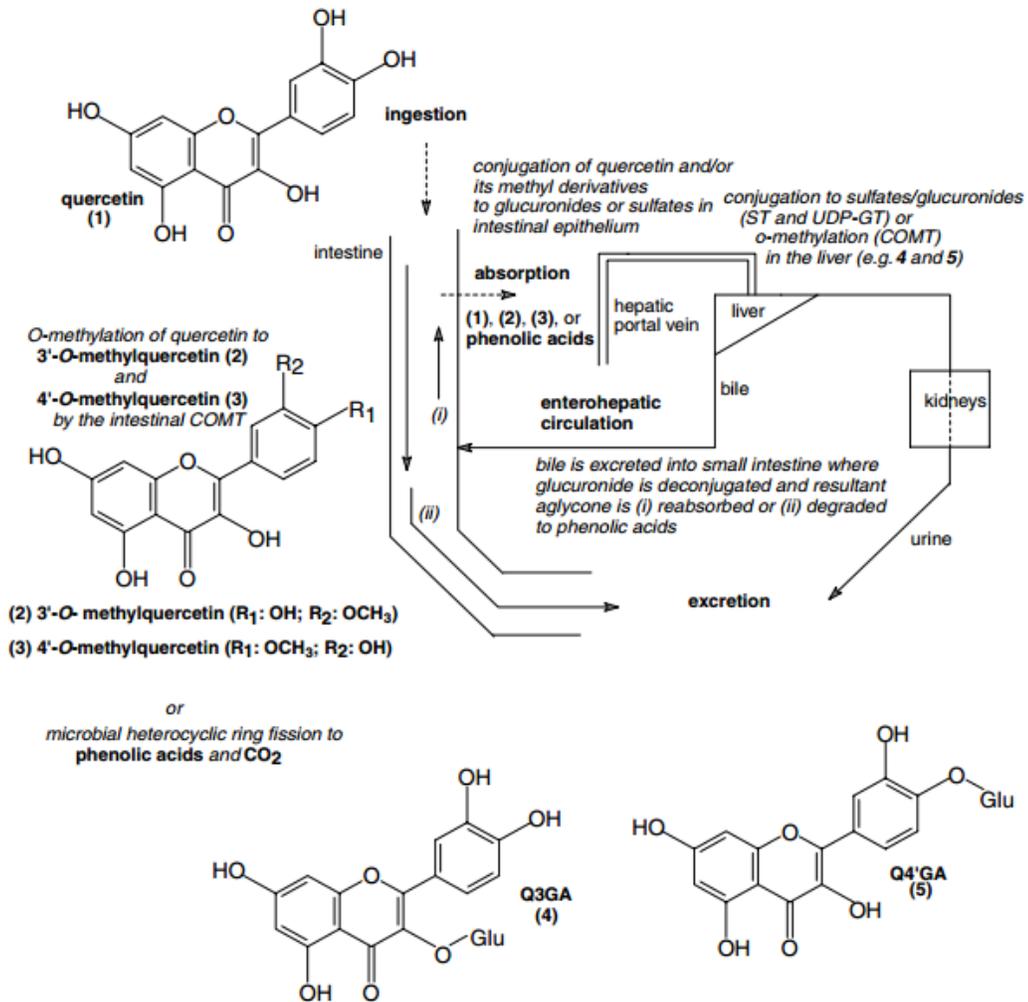


Figura 14. Representación de la absorción, metabolismo y excreción de la Q en mamíferos.

Es de notable mención que la secreción biliar de la Q en ratas sugiere una potencial circulación enterohepática seguida por la desconjugación de sus metabolitos.

Por último, la Q en estudios *in vitro* mostró poseer actividad mutagénica, inducir ruptura de cadenas de DNA, aberraciones cromosómicas y formación de micronúcleos, sin embargo, en estudios *in vivo* ésta no mostró causar realmente efectos deletéreos, debido probablemente a su baja biodisponibilidad.¹³¹

3. HIPÓTESIS

La Q por ser un flavonoide con capacidad antioxidante, será capaz de prevenir el daño hepático debido al estrés oxidativo inducido con la TAA y el CCl₄.

4. JUSTIFICACIÓN

La cirrosis causa muchas muertes al año, sin embargo, no hay enfoques terapéuticos exitosos para su tratamiento, es por ello que se deben realizar investigaciones de moléculas ya sea de origen natural o sintético, que tengan la capacidad de ejercer un efecto positivo sobre dicha patología, y de esta forma, ser utilizadas en un futuro como posibles agentes terapéuticos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto protector de la Q para prevenir la cirrosis experimental inducida con TAA y CCl₄.

5.2 Objetivos particulares

- Determinar la capacidad de la Q para mantener la integridad física y funcional del hígado al ser expuesto a TAA y CCl₄, mediante la cuantificación de glucógeno y colágena.
- Evaluar la capacidad antioxidante de la Q para prevenir el desequilibrio dado en condiciones de estrés oxidativo, después de la administración crónica de TAA y CCl₄.
- Determinar la capacidad de la Q para evitar la colestasis y necrosis inducidas por la exposición crónica a TAA y CCl₄.
- Comparar las histologías hepáticas de ratas expuestas a los hepatotóxicos, contra aquellas obtenidas de ratas de forma concomitante con la Q.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales.

La Q utilizada en este trabajo fue obtenida de Sigma-Aldrich # de catálogo Q4951-100G y lote # SLBD8415V, la carboximetilcelulosa (CMC) se obtuvo de Química Meyer con # de catálogo 58951000 y lote # 54701-C, el petrolato de High Purity con # de catálogo A1015 y lote # 09A007, por su parte, la TAA de Sigma-Aldrich # de catálogo 17-2502-500G y lote # MKBG840IV, y por último el CCl_4 de J.T. Baker # de catálogo 1512 y lote # 40125; el resto de los reactivos utilizados en el proyecto fueron de la mejor calidad comercial posible.

En todos los experimentos realizados, se utilizaron ratas Wistar macho obtenidas del UPEAL-Cinvestav manejadas de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción cuidado y uso de los animales de laboratorio.

6.2 Diseño experimental para evaluar la capacidad de la Q para prevenir la cirrosis experimental inducida con la TAA.

Se ocuparon ratas macho de la cepa Wistar con una n final de 5 y con un peso aproximado de 100-120 g; la dosis de TAA fue de 200 mg/kg y se calculó de acuerdo al promedio del peso de las ratas. La administración de la TAA se realizó durante ocho semanas y con un intervalo de 3 veces por semana por vía intraperitoneal (i.p.). La TAA se disolvió en agua para su administración. La dosis de la Q se calculó de la misma manera que para la TAA, siendo de 50 mg de Q por kilogramo de peso. La administración de la Q se realizó por un período de ocho semanas y de forma diaria por vía oral (p.o.). La Q se disolvió en CMC al 0.7 % para su administración. Las ratas se organizaron en grupos para su evaluación, quedando de la siguiente forma:

- Grupo 1: Ratas tratadas con agua.
- Grupo 2: Ratas tratadas con TAA.
- Grupo 3: Ratas tratadas de forma simultánea con TAA y Q.
- Grupo 4: Ratas tratadas con Q.

6.3 Diseño experimental para evaluar la capacidad de la Q para prevenir la cirrosis experimental inducida con el CCl₄.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con una *n* final de 5 y con un peso aproximado de 100-120 g; la dosis de CCl₄ se calculó de acuerdo al promedio del peso de las ratas, siendo de 400 mg de CCl₄ por kilogramo de peso. La administración del CCl₄ se realizó durante ocho semanas y con un intervalo de 3 veces por semana por vía i.p. El CCl₄ se disolvió en petrolato para su administración. La dosis de la Q se calculó de la misma manera que para el CCl₄, siendo de 50 mg de Q por kilogramo de peso. La administración de la Q se realizó por un período de ocho semanas y de forma diaria por vía i.p. La Q se disolvió en CMC al 0.7 % para su administración. Las ratas se organizaron en grupos para su evaluación, quedando de la siguiente forma:

- Grupo 1: Ratas tratadas con petrolato.
- Grupo 2: Ratas tratadas con CCl₄.
- Grupo 3: Ratas tratadas de forma simultánea con CCl₄ y Q.
- Grupo 4: Ratas tratadas con Q.

Tabla 4. Aleatorización de ratas Wistar macho en ocho grupos experimentales

Grupo	Duración	Dosis	Vía de admón.
Agua	8 semanas	<i>ad libitum</i>	p.o.
Petrolato	8 semanas	0.25 mL tres veces por semana.	i.p.
CMC	8 semanas	1 mL diario.	p.o./i.p.
Q	8 semanas	50 mg/kg diario.	p.o./i.p.
TAA	8 semanas	200 mg/kg tres veces por semana.	i.p.
CCl ₄	8 semanas	400 mg/kg tres veces por semana.	i.p.
TAA+Q	8 semanas	TAA: 200 mg/kg tres veces por semana. Q: 50 mg/kg diario.	TAA: i.p. Q: p.o.
CCl ₄ +Q	8 semanas	CCl ₄ : 400 mg/kg tres veces por semana. Q: 50 mg/kg diario.	CCl ₄ : i.p. Q: i.p.

6.4 Determinaciones bioquímicas en plasma e hígado

Las ratas fueron sacrificadas por exanguinación realizando una punción cardíaca a los ocho semanas de haber empezado el tratamiento, éstas fueron anestesiadas con un cocktail de ketamina a una dosis de 100 mg/kg y de xilacina a una dosis de 8 mg/kg

en una proporción de 1:3. La sangre obtenida por la punción, fue centrifugada a 3000 rpm durante 15 minutos para separar el suero de los demás componentes sanguíneos; del plasma obtenido se determinaron los siguientes parámetros: actividad enzimática de la FA, γ -GTP y ALT. Además, se extrajo el hígado el cual se utilizó para realizar otras pruebas tales como: determinación de la cantidad de proteínas hepáticas, la peroxidación lipídica, el glucógeno, el GSH y la colágena. Por otro lado, se realizaron cortes del lóbulo mayor del hígado, para llevar a cabo el análisis histológico, en donde se ocuparon para las tinciones tricrómica de Masson (TM) y de hematoxilina y eosina (H&E) para evaluar el grado de fibrosis que se generó durante el daño hepático.

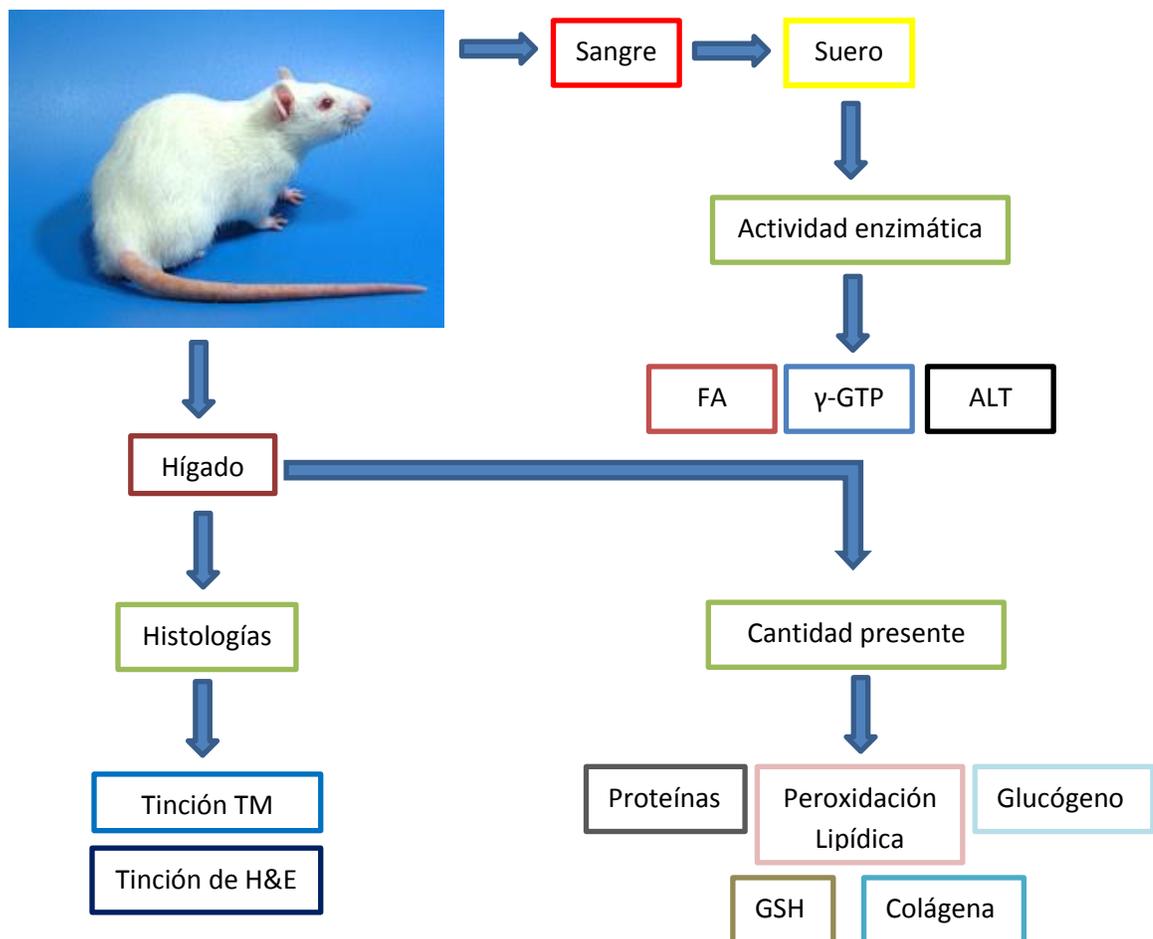


Figura 15. Esquema representativo del protocolo a seguir

6.5 Técnicas

6.5.1 Determinación de la actividad de la enzima FA

La FA es una enzima que se encuentra en todos los tejidos corporales. Los tejidos que contienen una cantidad más elevada de FA son el hígado, las vías biliares y los huesos.¹³³ Una elevación en la actividad de la FA indica un alto grado de colestasis. El fundamento tras esta técnica es que la FA cataliza la hidrólisis del enlace éster fosfórico entre un grupo orgánico y un grupo fosforilo a pH alcalino, lo que libera fosfato al medio. La actividad enzimática de la FA se determina mediante un método colorimétrico desarrollado por Berger y Rudolph en 1956;¹³⁴ éste se basa en un complejo colorido resultado del metabolismo de un éster, el para-nitrofenilfosfato (Figura 15), dando lugar a la formación de fosfato y para-nitrofenol, el cual se lee a una longitud de onda de 410 nm.

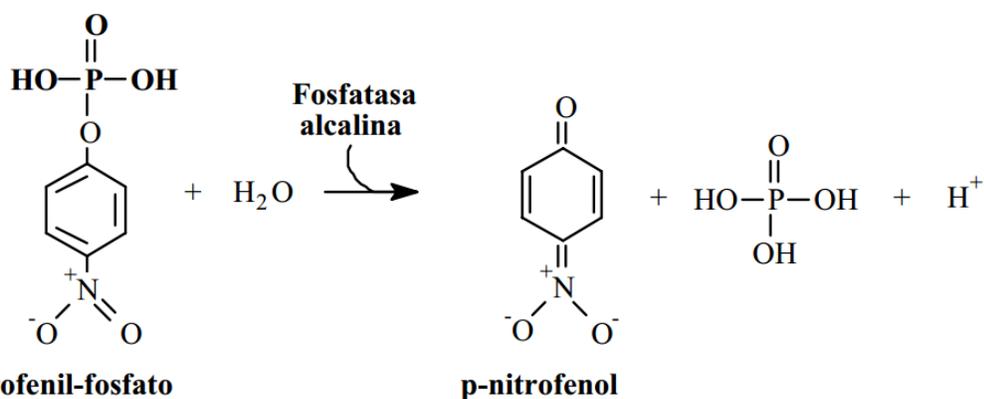


Figura 16. Formación del compuesto para-nitrofenol a partir del para-nitrofenilfosfato.

Se describe la técnica a continuación:

- ❖ Se colocaron dos series de ocho tubos de 15X150 mm y en cada tubo se adicionan:
 - 250 μL de buffer de glicina 0.1 M-MgCl₂ 1 mM, pH 10.5
 - 250 μL de sustrato para-nitrofenilfosfato
- ❖ Previa incubación por 5 minutos a 37°C, se inicia la reacción con 50 μL de suero y se mezcla suavemente.
- ❖ Se incuba por un lapso de 30 minutos, y se detiene la reacción con 5 mL de NaOH 0.02 N.

- ❖ Al término de incubación, se realiza la lectura a una longitud de onda de 410 nm, y se cuantifica la para-nitroanilina producida mediante la curva estándar.
- ❖ Se hace un blanco sustituyendo los 50 μL de suero por agua.

6.5.2 Determinación de la actividad de la enzima γ -GTP

La γ -GTP es una enzima que, al igual que la FA indica colestasis. La función de la γ -GTP es transferir grupos γ -glutamil entre péptidos. Está presente en la membrana celular de muchos tejidos, siendo más abundante en el hígado, las vías biliares y el páncreas.¹³⁵ El fundamento que respalda esta prueba es que la γ -glutamil-para-nitroanilida (Figura 16), en un medio alcalino (pH 8.2) y en presencia de iones Mg^{2+} transfiere grupos γ -1-glutamil a una molécula receptora (glicil-glicina), la reacción es catalizada por la enzima γ -GTP, produciéndose la para-nitroanilina, metabolito que se puede cuantificar mediante una técnica colorimétrica y el uso de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm.¹³⁶

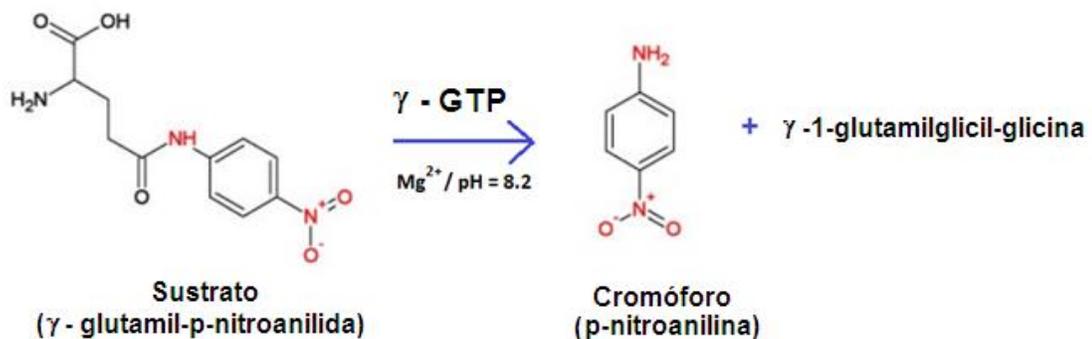


Figura 17. Formación de la para-nitroanilina. Reacción catalizada por la γ -GTP.

Se describe la técnica a continuación:

- ❖ Se colocan dos series de nueve tubos de 15X150 mm y en cada tubo se adicionan:
 - 400 μL de Tris-HCl 200 mM a pH 8.2
 - 100 μL de MgCl_2 200 mM
 - 100 μL de glicil-glicina 40 mM, pH de 8.2
 - 200 μL de γ -glutamil-para-nitroanilida
- ❖ Previa incubación por 10 minutos a 37°C , se inicia la reacción con 200 μL de suero.

- ❖ Se incuba por un lapso de 30 minutos, y se detiene la reacción con 2 mL de ácido acético 1.5 M.
- ❖ Al término de la incubación, se realiza la lectura a una longitud de onda de 410 nm, y se cuantifica la para-nitroanilina producida mediante la curva estándar.
- ❖ Se hace un blanco sustituyendo los 200 μL de suero por agua.

La reacción es lineal en el tiempo hasta la utilización de aproximadamente el 10% del sustrato (producción de aproximadamente 200 nmoles de para-nitroanilina en la mezcla de la reacción).

6.5.3 Determinación de la actividad de la enzima ALT

La ALT es una transaminasa ampliamente distribuida en el organismo, especialmente en el hígado, el corazón, el riñón, etc., en su parte citoplasmática, la actividad sérica de esta enzima en condiciones normales es muy baja, así, un daño en alguno de estos órganos conlleva a un aumento en la actividad sérica de la ALT, lo que indica un alto grado de necrosis. Para determinar la actividad enzimática en suero de la ALT se utiliza el método colorimétrico desarrollado por Reitman y Frankel en 1957; éste se basa en un complejo colorido resultado de la transferencia del grupo amino de la alanina al aceptor 2-oxoglutarato o α -cetoglutarato, resultando en la formación de piruvato que reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNPH) formando el derivado colorido 2,4-dinitrofenilhidrazona, el cual se lee a una longitud de onda de 515 nm (Figura 17).¹³⁷

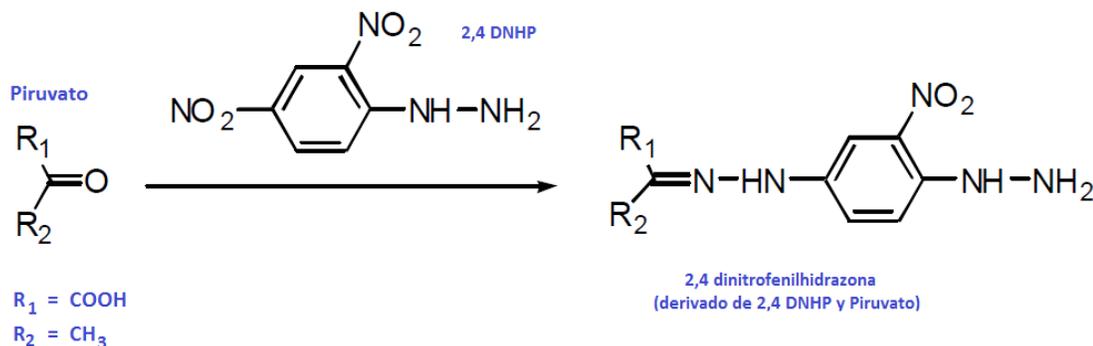


Figura 18. Reacción de la formación de la 2,4-dinitrofenilhidrazona a partir del piruvato y la 2,4-DNHP.

Se describe a continuación la técnica:

- ❖ Se colocan tres series de ocho tubos de 15X150 mm y en cada tubo se adicionan:

	Blanco (mL)	Problema(mL)
• Solución de sustrato	0.25	0.25
• Suero problema	-----	0.25
• Se mezcla y se agita suavemente, se incuba a 37°C durante 60 min		
• Reactivo cromógeno	0.25	0.25
• Suero problema	0.050	-----
• Se incuba a 37°C durante 15 min.		
• Se para la reacción con NaOH 0.4 N	2.5	2.5
• Se lee a 515 nm		

6.5.4 Determinación de la cantidad de proteínas hepáticas por el método de Bradford

Esta determinación consiste en la formación de un complejo colorido azul entre los residuos de aminoácidos básicos de proteínas y el colorante azul brillante de Coomasie. Este último presenta dos coloraciones, una roja y otra azul. La forma de color rojo se convierte en azul cuando se une a las proteínas. La absorbancia se lee a 595 nm, la intensidad de la absorbancia es proporcional al contenido de aminoácidos básicos y aromáticos.¹³⁸

Se describe la técnica a continuación:

- ❖ Reactivo de Bradford:

➤ Ácido fosfórico al 85 %	100 mL
➤ Alcohol etílico	50 mL
➤ Azul brillante de Coomassie G-250	100 mg
➤ Se Afora a un litro con agua tridestilada	

- ❖ Se colocan tres series de ocho tubos de 13X100 mm.
- ❖ En una serie de ocho tubos, se toman 100 μ L de homogeneizado de hígado y se lleva a 1,000 mL con agua tridestilada.
- ❖ Se toman alícuotas para proteínas y se llevan a 100 μ L con agua en las siguientes dos series de ocho tubos (de la dilución anterior se toman 20 μ L más 80 μ L de agua tridestilada).
- ❖ Se añaden 2,400 μ L del reactivo de Bradford.
- ❖ Terminado el proceso anterior, se lee la absorbancia del complejo colorimétrico a 595 nm.
- ❖ Se prepara un blanco sustituyendo el homogeneizado de hígado por 100 μ L de agua.

6.5.5 Determinación del grado de peroxidación lipídica

El fundamento correspondiente a esta técnica se basa en el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS); en donde el ácido tiobarbitúrico (TBA) reacciona con el MDA, este último es un dialdehído de tres carbonos altamente reactivo generado como uno de los principales bioproductos de la peroxidación de ácidos grasos polinsaturados, de esta forma, el MDA que es la principal sustancia reactiva al TBA, ataca al grupo metileno activo del TBA. Un mol de MDA reacciona con dos moles de TBA en medio ácido y a alta temperatura, por lo tanto, la velocidad de la reacción depende de la concentración de TBA, el pH y la temperatura.¹³⁹

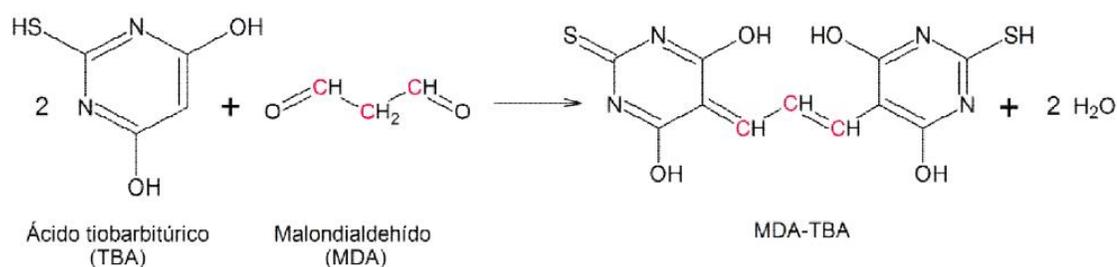


Figura 19. Esquema de la reacción entre malondialdehído y ácido tiobarbitúrico.

Se describe la técnica a continuación:

- ❖ Reactivos:
 - Tris-HCl 150 mM a pH 7.4
 - Ácido tricloroacético (TCA)
 - Ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.375% p/v en TCA al 15 % (se prepara en el momento la cantidad necesario)

- ❖ Se usan dos series de 8 tubos de 13X100 mm y una serie de 8 tubos de 22X175 mm.
- ❖ Se pesan 0.5 g de hígado y se homogeneiza en 5 mL de agua.
- ❖ Se toman 300 μ L del homogeneizado al 10 % y se agregan 700 μ L de Tris-HCl 150 mM, pH 7.4 para completar a 1 mL.
- ❖ Se agregan 2 mL de TBA al 0.375 % disuelto en TCA al 15 %.
- ❖ Se ponen a ebullición por 45 minutos.
- ❖ Se centrifugan a 3000 rpm por 10 minutos y se lee el sobrenadante a 532 nm.
- ❖ Se realiza un blanco con 1 mL de Tris-HCl 150 mM, pH 7.4

6.5.6 Determinación de los niveles de GSH

Este parámetro fue evaluado como indicador de estrés oxidativo a nivel citoplasmático. El fundamento de esta técnica se basa en la medición de grupos sulfidrilo. En 1959, Ellman¹⁵ introduce el uso del 5,5'-Ditio-*bis*-(2-Ácido nitrobenzoico) también conocido como DTNB, un compuesto versátil soluble en agua para la cuantificación de grupos sulfidrilo. El DTNB reacciona con grupos sulfidrilo libres para producir una mezcla de disulfuro y ácido 2-nitro-tiobenzoico (TNB). El sitio diana del DTNB es la base conjugada (R-S*) de un grupo sulfidrilo libre. Por lo tanto, la velocidad de esta reacción es dependiente de varios factores: 1) el pH de la reacción, 2) el pKa de los grupos sulfidrilo y 3) los efectos estéricos y electrostáticos. El TNB es la especie colorida (amarillo) es ésta reacción; el coeficiente de extinción del TNB se observa a 412 nm a pH de 8.^{140, 141}

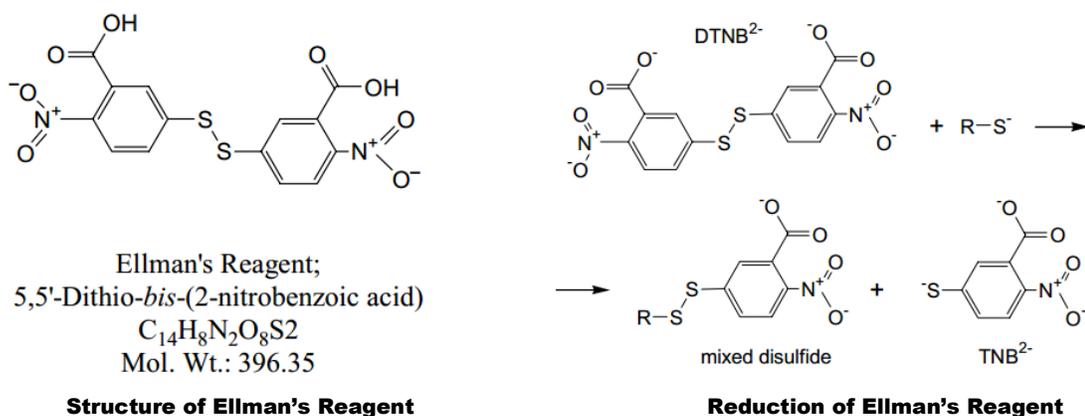


Figura 20. Reacción de formación del compuesto colorido TNB.

Se describe la técnica a continuación:

❖ Reactivo de Ellman:

- A) 40 mg de DTNB.
- B) 100 mL de citrato de sodio al 1 %.
- Disolver A en B.

❖ Solución de fosfatos Na_2HPO_4 0.3 M (disuelto en agua; se agita antes de usar).

❖ Solución precipitante: EDTA 5 mM en TCA 5 %. Se disuelve el EDTA en el TCA.

❖ Se homogeneizan 0.3 g de hígado en 1.2 mL de solución precipitante.

❖ Se centrifugan por 20 minutos a 12,000 rpm.

❖ Se toman 0.1 mL de sobrenadante (por duplicado) más 1.2 mL de solución de fosfatos más 0.25 mL de reactivo de Ellman.

❖ El blanco se realiza sustituyendo el sobrenadante del homogeneizado por agua.

❖ Se agitan y se lee a una longitud de onda de 412 nm.

6.5.7 Determinación del glucógeno hepático

La reacción de color para medir la concentración de carbohidratos presentes en el hígado por espectrofotometría se basa en el uso de la antrona, un compuesto que se disuelve en ácido sulfúrico (H_2SO_4). El medio ácido hidroliza el enlace glucosídico de los oligosacáridos, así los monosacáridos resultantes (furfural) reaccionan con la antrona, dando lugar a una coloración verde con un máximo de absorción de 612 nm.¹⁴² La determinación del glucógeno hepático se realiza mediante la técnica de la antrona de Seifter et al. 1950.¹⁴³

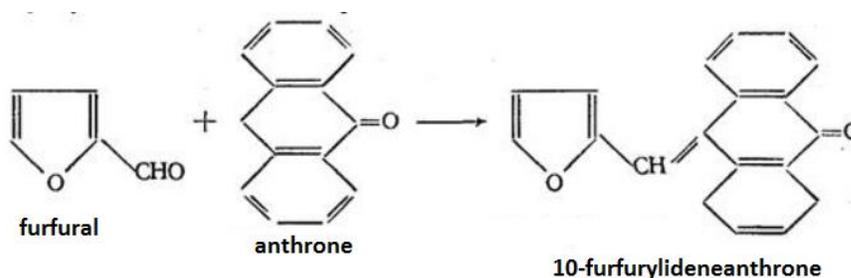


Figura 21. Reacción de condensación entre el furfural y la antrona

Se describe la técnica a continuación:

- ❖ Se pesan 0.5 g. de hígado en ocho tubos 15X150 mm con tapón esmerilado, se les adicionan 1.5 mL de KOH al 30 %, se tapan y se hierve en baño de agua durante 30 minutos.
- ❖ Después de enfriar, se pasan cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL y se afora con agua agitando muy bien.
- ❖ Del matraz anterior, se toman de 40 a 160 μ L con una pipeta volumétrica, se lleva a 1 mL en tubos de 13X100 esmerilados por duplicado, se prepara además, un tubo blanco con 1 mL de agua y se los estándares (2) con 20 μ L de una solución de glucosa estándar (1 mg/mL) y llevan a 1 mL con agua.
- ❖ Se prepara una solución de antrona 0.2 % en H₂SO₄ concentrado. Se añaden 2 mL a cada tubo agitando suavemente (con ayuda de una bureta) y enfriando sobre hielo.
- ❖ Se tapan los tubos fríos y se ponen en un baño de agua hirviendo por 15 minutos.
- ❖ Se enfrían de inmediato con hielo y se leen a una longitud de onda de 620 nm.

6.5.8 Determinación del contenido de colágena (HP)

Este método se basa en la determinación de la HP, este iminoácido no esencial es producto de la hidroxilación de la prolina y está presente en la colágena.¹⁴⁴ La HP es sometida a un proceso de oxidación dando como resultado la formación del ácido pirrol-2-carboxílico o pirrol; de esta forma, el reactivo de Ehrlich (para-dimetilaminobenzaldehído) al reaccionar con el pirrol forma un complejo color rojo que se lee a 560 nm.¹⁴⁵

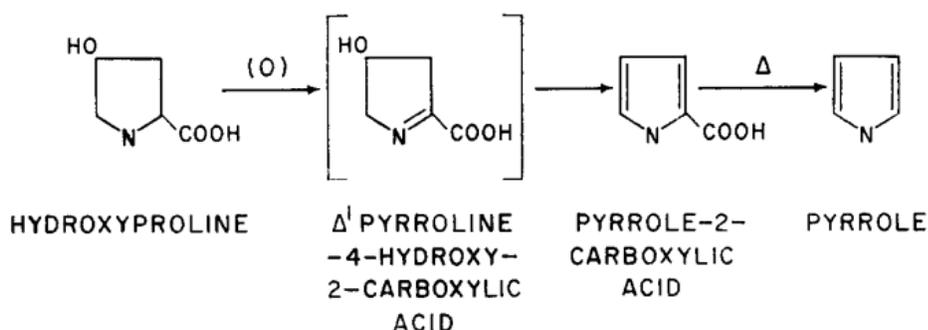


Figura 22. Oxidación y descarboxilación de HP a pirrol

A continuación se describe la técnica:

- ❖ Se pesan 0.1 g. de hígado previamente secado con papel filtro y se coloca en una ampolleta.
- ❖ Se agregan 2 mL de HCl 6 N y se sellan las ampolletas con un mechero, posteriormente, se colocan a 100° C en el horno durante 24 h.
- ❖ Una vez hidrolizada la muestra, se destapan las ampolletas y se colocan nuevamente en el horno a temperatura de 60° C, aproximadamente 24 h o hasta que se sequen.
- ❖ Las muestras ya secas se resuspenden con 2 mL de solución amortiguadora (sol. 1); se agitan vigorosamente en el vórtex y se vacían en tubos de ensaye, las ampolletas se lavan con la adición de 1 mL de la misma solución. Se centrifugan a 3000 rpm por 15 minutos.
- ❖ En un tubo conteniendo una pequeña porción de carbón activado se deposita el sobrenadante, se agita durante un minuto, se centrifuga a 3000 rpm por 15 minutos, si el sobrenadante no queda claro se repite este paso.
- ❖ Se toma 1 mL del sobrenadante más 1 mL de agua y 1 mL de cloramina T (sol. 2). Se deja reposar exactamente por 20 minutos a temperatura ambiente. Se hace un blanco utilizando 1 mL de agua en lugar del sobrenadante.
- ❖ Transcurridos los 20 minutos, se adicionan 0.5 mL de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 2 M, 1 mL de NaOH 1 N y aproximadamente 2 g de NaCl. Se agitan inmediatamente para detener la reacción.
- ❖ A cada tubo se le agregan 6 mL de tolueno y se agitan durante 1 minuto. La fase de tolueno no se utiliza para la determinación de prolina, pero la fase acuosa se utiliza para la identificación de HP.
- ❖ Se extrae la capa de tolueno y se desecha. La porción acuosa se tapa y se coloca en un baño de agua hirviendo durante 20 minutos.
- ❖ Los tubos se enfrían 15 minutos, preferentemente en un refrigerador. Ya fríos se les adiciona 6 mL de tolueno y se agitan durante 1 minuto.
- ❖ Se preparan 18 tubos de 15X150 mm y, de la fase de tolueno se toman alícuotas por duplicado de 1 mL y se les agrega 4 mL del reactivo de Ehrlich y se agitan fuertemente.

- ❖ Se dejan reposar durante 30 minutos para que se lleve a cabo la reacción colorida. Se lee a una longitud de onda de 560 nm.

6.5.9 Histología

Se llama técnica histológica al conjunto de procedimientos aplicados a un material biológico ya sea de origen animal o vegetal, con la finalidad de prepararlo y conferirle las condiciones óptimas para poder observar, examinar, y analizar sus componentes morfológicos a través de un instrumento de aumento de imagen. En ciertos casos cuando se necesita resaltar alguna estructura tisular o celular, se pueden utilizar colorantes que no sean citotóxicos o que no interfieran en su estructura, a este procedimiento se le conoce como coloración vital.

Se utilizaron dos técnicas de tinción para teñir cortes de hígado, la primera fue la de H&E; la hematoxilina tiñe de color azul-púrpura componentes ácidos de la célula tal como el núcleo, mientras que la eosina tiñe de color rosa componentes de la célula como el citoplasma y material extracelular.¹⁴⁶

La segunda fue la tinción TM, la cual busca teñir a las bandas de colágena de color azul, los núcleos celulares de color negro y los citoplasmas de color rojo,¹⁴⁷ esta técnica se basa en el uso de un colorante ácido como la escarlata de Biebrich, de esta forma, todos los elementos acidófilos de un tejido, como el citoplasma y la colágena se unirán al colorante. Después de lo anterior, se utiliza el ácido fosfomolibdico/ácido fosfotungstínico, que permite que la escarlata de Biebrich difunda de la colágena pero no del citoplasma, lo último se debe a la menor permeabilidad por parte de la escarlata de Biebrich. Los ácidos mencionados anteriormente, tienen numerosos grupos que probablemente actúen como medio de unión entre el colágeno y el azul de anilina, colorante que tiñe a la colágena. Probablemente, el pH de los ácidos fosfomolibdico/fosfotungstínico también aumente la coloración y ayude a la colágena en la difusión o retiro de las demás tinciones.¹⁴⁸

Se describe la técnica a continuación:

- ❖ Los cortes de hígado se depositan en viales que contienen una solución fijadora de formaldehído (formol) al 10 % en agua, el tiempo mínimo de fijación es de 24 horas.
- ❖ Los cortes se lavan con agua corriente, se deshidratan en alcoholes y se incluyen en parafina.
- ❖ Se hacen cortes de 6-7 μm de grosor y se colocan en portaobjetos cubiertos con silano.
- ❖ Las cortes se desparafinan y rehidratan en xileno, alcohol absoluto y alcohol al 95 %.
- ❖ Se enjuagan con agua destilada.

A) Tinción de hematoxilina y eosina (H&E).

- ❖ Se aplica la hematoxilina de Harris durante 15 minutos y se enjuga en agua corriente por 2 minutos.
- ❖ Se diferencia en alcohol ácido con 3-10 inmersiones y se verifica la diferenciación en el microscopio. Los núcleos deben de distinguirse y el fondo debe ser de color muy tenue o incoloro.
- ❖ Se lavan en agua corriente.
- ❖ Se sumergen en agua amoniacal o saturada de carbonato de litio hasta que las secciones sean de color azul brillante.
- ❖ Se lavan en agua corriente por 10-20 minutos.
- ❖ Se tiñe con eosina de 15 segundos a 20 minutos dependiendo de la caducidad de la eosina y del grado de contraste deseado (contrateñido).
- ❖ Se lavan en alcohol al 95 % y después con alcohol absoluto y xileno.
- ❖ Montar con el polímero Permunt o bálsamo.

B) Tinción tricrómica de Masson (TM).

- ❖ Se sumergen en el fijador de Bouin 1 hora a 56° C, o toda la noche a temperatura ambiente.
- ❖ Se enfrían y se lavan con agua corriente hasta que el color amarillo desaparezca.

- ❖ Se enjuagan con agua destilada.
- ❖ Se sumergen en la solución de hematoxilina de Weigert por 10 minutos. Se enjuagan con agua corriente al mismo tiempo.
- ❖ Se enjuagan con agua destilada.
- ❖ Se sumergen en la solución de fucsina ácido-escarlata de Biebrich por 15 minutos. Se recupera la solución.
- ❖ Se enjuaga con agua destilada.
- ❖ Se sumergen en la solución de ácido fosfomolibdico/ácido fosfotungsténico por 10-15 minutos. Se desecha la solución.
- ❖ Se sumergen en la solución de azul de anilina por 5-10 minutos o con la solución verde claro por 1 minuto. Se recupera la solución.
- ❖ Se enjugan con agua destilada.
- ❖ Se lavan con agua acética al 1 % por 3-5 minutos. Se desecha la solución.
- ❖ Se lavan con alcohol al 95 %.
- ❖ Se lavan con alcohol absoluto (dos cambios de alcohol).
- ❖ Se lavan con xileno (dos cambios de alcohol).
- ❖ Se montan en el polímero Permout o bálsamo.

6.5.10 Análisis estadístico

Todas las determinaciones de la presente tesis se realizaron por duplicado. Se obtuvo la media, así como el error estándar para cada uno de los diferentes indicadores medidos en los grupos de tratamiento.

Para cada uno de los indicadores se aplicó un análisis de varianza de una sola variable (ANOVA de una vía), seguido de una prueba de Tukey para realizar una comparación entre la media de cada grupo. Se consideró que se presentaba una diferencia significativa cuando $p \leq 0.05$.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

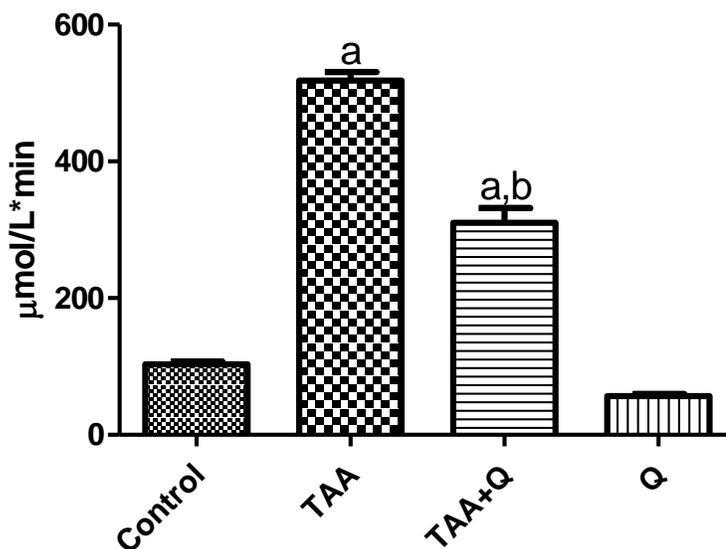
7.1 Modelos de lesión hepática crónica inducida mediante el uso de la TAA y el CCl₄

El daño crónico inducido en el hígado se realizó mediante la administración de TAA a la dosis de 200 mg por kilogramo de peso de la rata tres veces por semana por vía i.p., el mismo esquema de tratamiento se realizó para el modelo de CCl₄, utilizando la dosis de 400 mg por kilogramo de peso; de manera concomitante, la Q se administró a la dosis de 50 mg de peso de la rata de forma diaria por vía i.p. para prevenir las lesiones provocadas por el uso de la TAA; mientras que la vía de administración cambió a p.o. para el caso del modelo de CCl₄.

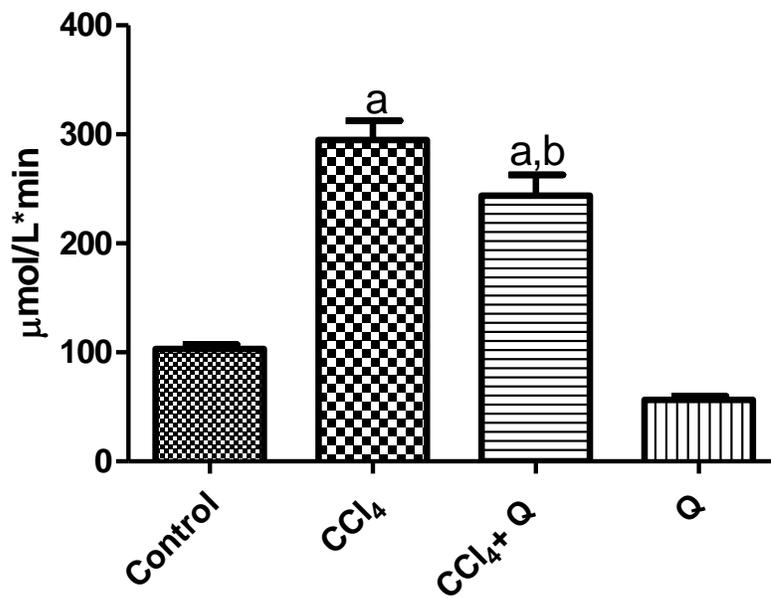
7.1.1 Determinación de la actividad de las enzimas indicadoras de colestasis

7.1.1.1 Actividad enzimática de la fosfatasa alcalina

Nombre que reciben una enzima que se encarga de la catálisis hidrolítica de un gran número de ésteres fosfatos a pH alcalino, en el hígado se encuentra en la membrana canalicular del hepatocito.



Gráfica 1. Determinación de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina en el hígado de las ratas sanas (control), tratadas con tioacetamida (TAA), TAA y quercetina (Q) y tratadas con Q sola. Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar. “a” indica $p < 0.05$ con respecto al control; “b” indica $p < 0.05$ con respecto a la TAA.

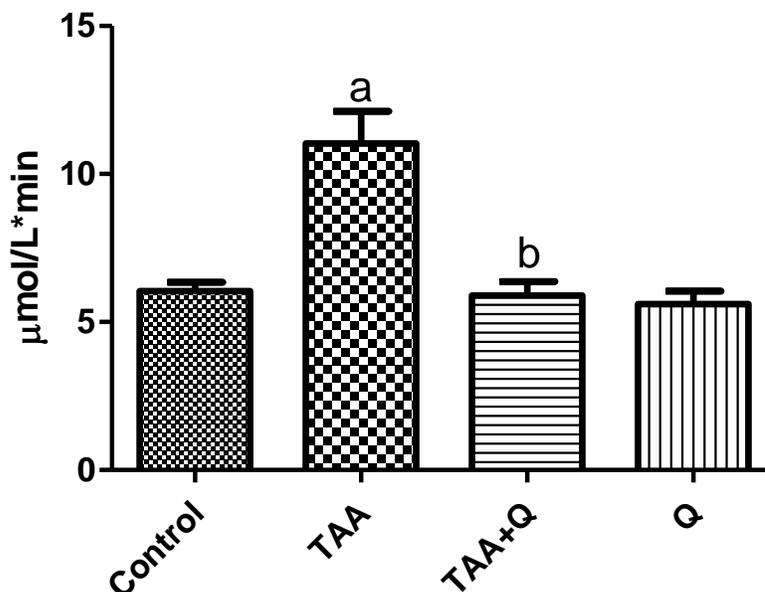


Gráfica 2. Determinación de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina en el hígado de las ratas sanas (control), tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), CCl₄ y quercetina (Q) y tratadas con Q sola. Cada barra representa el promedio de cada grupo ± el error estándar. “a” indica $p < 0.05$ con respecto al control; “b” indica $p < 0.05$ con respecto al CCl₄.

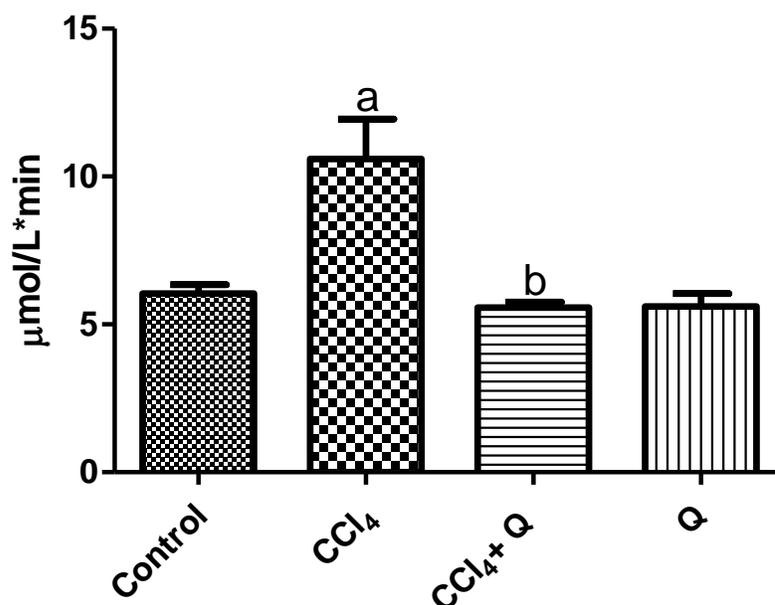
Las gráficas 1 y 2 muestran la actividad plasmática de la enzima FA después de ocho semanas de tratamiento con la TAA y el CCl₄, respectivamente, se observa un incremento de aproximadamente cinco y tres veces, respectivamente ($p < 0.05$) en comparación al grupo sano. Sin embargo, con el uso concomitante de la Q, el incremento en la actividad de esta enzima se previno de forma parcial pero significativa ($p < 0.05$) para ambos casos, además, la Q por sí sola disminuyó los niveles plasmáticos de la FA en comparación con el grupo control, sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre ellos.

7.1.1.2 Actividad enzimática de la γ -glutamil transpeptidasa

La γ -GTP al igual que la FA, se encuentra en la membrana canalicular de los hepatocitos, es una enzima con alta sensibilidad para indicar colestasis.



Gráfica 3. Determinación de la actividad enzimática de la γ -glutamil transpeptidasa en el hígado de las ratas sanas (control), tratadas con tioacetamida (TAA), TAA y quercetina (Q) y tratadas con Q sola. Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar. “a” indica $p < 0.05$ con respecto al control; “b” indica $p < 0.05$ con respecto a la TAA.



Gráfica 4. Determinación de la actividad enzimática de la γ -glutamil transpeptidasa en el hígado de las ratas sanas (control), tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), CCl₄ y quercetina (Q) y tratadas con Q sola. Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar. “a” indica $p < 0.05$ con respecto al control; “b” indica $p < 0.05$ con respecto a la CCl₄.

La actividad de esta enzima se incrementó cerca de dos veces respecto al grupo control ($p < 0.05$) para ambos hepatotóxicos (Gráficas 3 y 4), no obstante, el uso concomitante del flavonoide previno de forma total la elevación de la actividad plasmática de esta enzima ($p < 0.05$), para este caso, la Q por sí sola no produjo ningún efecto en la actividad de la γ -GTP.

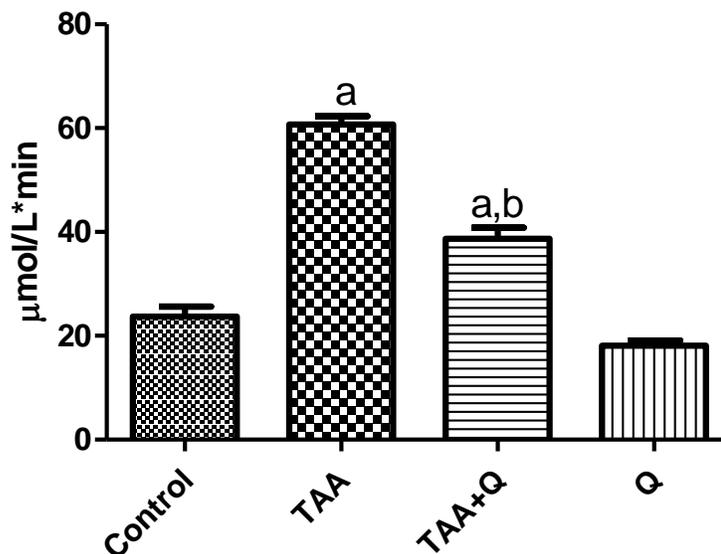
El uso de los compuestos TAA y CCl_4 emuló un estado de colestasis en el hígado,^{153, 154} comprobándose por el incremento en la actividad de dos enzimas indicadoras de esta patología, además, el uso de ambas enzimas descarta hasta cierto punto que el incremento de cualquiera de ellas sea debido a otros factores tales como la edad y posibles lugares de procedencia de estas enzimas. Lo anterior, es concordante con lo reportado por Hamed y colaboradores en el 2011¹⁴⁹, en donde la TAA aumentó la actividad de la FA dos veces aproximadamente respecto a la del grupo control, de igual forma, Achliya y colaboradores en el 2004¹⁵⁰ mostraron que el uso del CCl_4 elevó aproximadamente tres veces la actividad enzimática de la FA. Además Hernández-Ortega y colaboradores en el 2012¹⁵¹ al administrar CCl_4 , se incrementaron los niveles de γ -GTP, así mismo, Arauz y colaboradores en el 2013⁶⁴ mostraron que la TAA producía el mismo efecto.

Los hepatotóxicos producen FR al ser metabolizados, promoviendo un daño a la membrana canalicular del hepatocito, con esto, se induce la liberación de las enzimas al torrente sanguíneo. La Q por su parte, al ser una molécula con propiedad antioxidante, fue capaz de prevenir las lesiones ocasionadas a las membranas de los hepatocitos en los espacios canaliculares por la TAA y TAAO_2 , así como del CCl_3^* , metabolitos de la TAA y el CCl_4 , respectivamente. Hamed y colaboradores¹⁴⁹ mostraron el efecto hepatoprotector de la Q frente a un daño hepático inducido con TAA, donde la administración de este flavonol previno el incremento de la FA, sin embargo, el daño inducido por ellos fue agudo, mientras que en nuestro trabajo el daño se produjo de manera crónica. Por otro lado, Chen X en el 2010¹⁵² mostró que la Q previno el aumento en la actividad de la γ -GTP en un modelo de daño agudo inducido por alcohol.

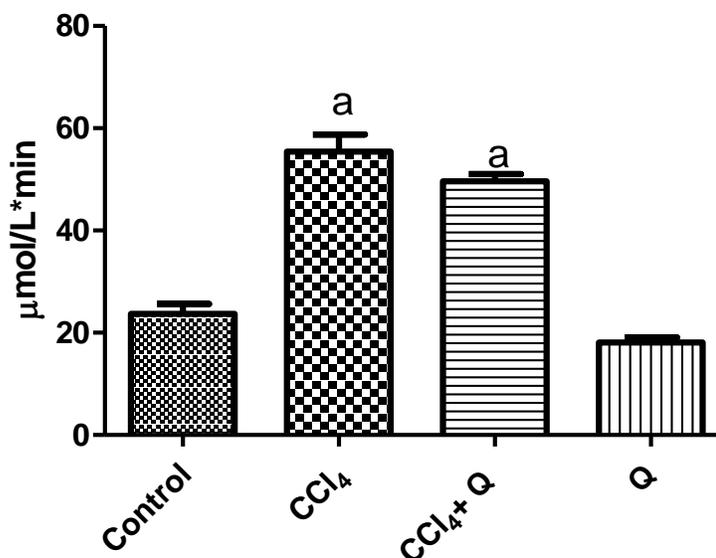
7.1.2 Determinación de los indicadores de necrosis

7.1.2.1 Actividad enzimática de la alanina aminotransferasa

Esta enzima se localiza en el citoplasma del hepatocito y se considera la enzima de mayor fidelidad como indicadora de necrosis.



Gráfica 5. Determinación de la actividad enzimática de la alanina aminotransferasa en el hígado de las ratas sanas (control), tratadas con tioacetamida (TAA), TAA y quercetina (Q) y tratadas con Q sola. Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar. “a” indica $p < 0.05$ con respecto al control; “b” indica $p < 0.05$ con respecto a la TAA.



Gráfica 6. Determinación de la actividad enzimática de la alanina aminotransferasa en el hígado de las ratas sanas (control), tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), CCl₄ y quercetina (Q) y tratadas con Q sola. Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar. “a” indica $p < 0.05$ con respecto al control; “b” indica $p < 0.05$ con respecto a la CCl₄.

7.1.2.2 Tinción de H&E

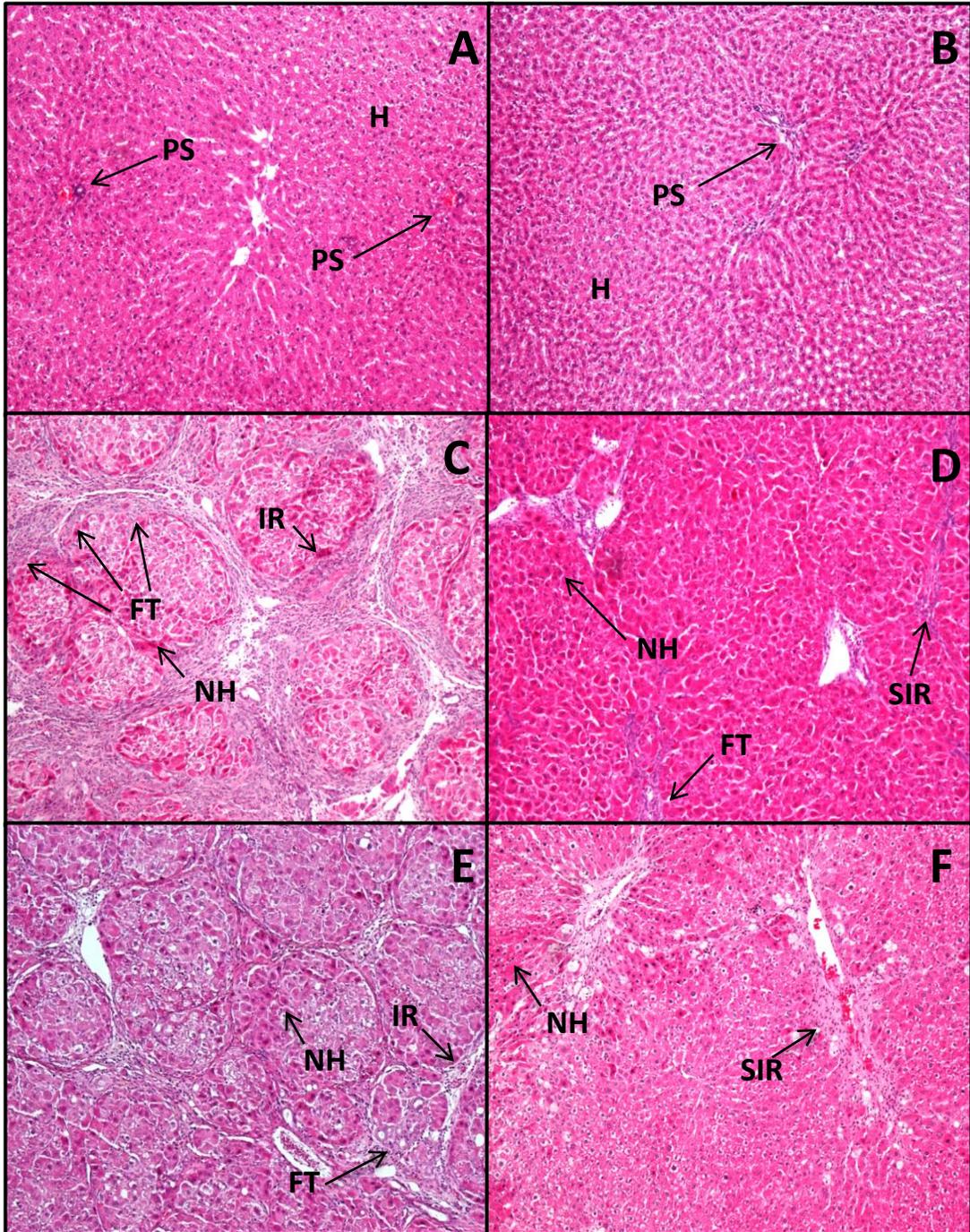


Figura 23. Histología de hígados de ratas después de los diferentes tratamientos (tinción de H&E). A. Control sano; B. Quercetina; C. TAA; D. TAA+Q; E. CCl₄; F. CCl₄+Q. H= Hepatocito; PS= Espacio portal; FT= Tejido fibrótico; IR= Reacción inflamatoria; SIR= Escasa reacción inflamatoria; NH= Hepatocitos de neoformación.

Las gráficas 5 y 6 muestran un aumento de la enzima en plasma respecto al grupo control, se observa que ambos hepatotóxicos incrementaron tres veces su actividad ($p < 0.05$), aproximadamente. Por otra parte, el uso simultáneo de la Q previno de forma parcial pero significativa el incremento en la actividad enzimática de la ALT en el caso del modelo de TAA ($p < 0.05$), sin embargo, esto no se observa para el caso del CCl_4 , aunque se muestra una tendencia a la baja respecto al grupo tratado con el hepatotóxico únicamente. También se observa que la Q, por sí misma, no fue capaz de inducir un aumento en los niveles plasmáticos de esta enzima.

La Figura 23 muestra las histologías correspondientes a cada grupo bajo la tinción de H & E, en el panel **A**, se muestra la arquitectura de un hígado sano, se observa la morfología característica de los hepatocitos, mientras que en los paneles **C** y **E**, se observa que el uso de los hepatotóxicos produjo una alteración del hígado, observándose áreas necróticas, hepatocitos de neoformación así como la reacción inflamatoria y la presencia de fibras de colágena. Sin embargo, en los paneles **D** y **F**, se observa que la Q previno de forma significativa los cambios en la arquitectura dados por la TAA y el CCl_4 , sin embargo, y aunque también se observan los hepatocitos de neoformación y la reacción inflamatoria, éstas se encuentran en menor medida que en los paneles **C** y **E**. Por otra parte, la Q presentada en el panel **B**, no indujo cambios en el parénquima hepático.

El uso de la TAA y del CCl_4 por ocho semanas produjo necrosis de los hepatocitos, esto es concordante a lo reportado por nuestro grupo de trabajo^{64, 65} en proyectos anteriores, por lo que nos indica que los modelos utilizados emularon de forma adecuada un daño crónico hepático.

Por otra parte, la Q a una dosis de 50 mg/Kg de peso y administrada de forma diaria tanto por vía i.p. así como por vía p.o., no indujo cambios en el hígado, ni en ninguna de las actividades enzimáticas antes presentadas. Esto es semejante a lo reportado por Gupta y colaboradores en el 2010,¹⁵⁷ en donde se probaron tres dosis de Q (10, 30 y 100 mg/Kg) y ninguna de ellas causó efectos indeseables. Cabe destacar que la ALT, da un indicativo muy certero del daño que pudiese producir este flavonoide a nivel del parénquima hepático, esto fue corroborado con los cortes histológicos donde se

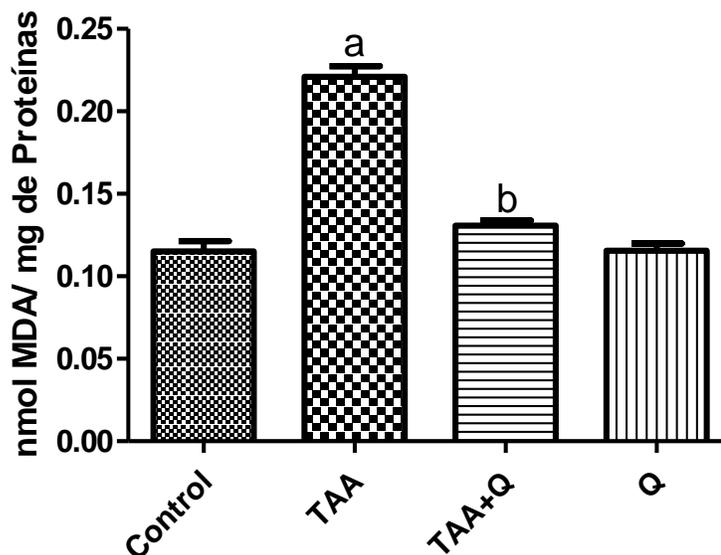
muestra que la dosis utilizada no fue capaz de producir efectos deletéreos. De la misma forma que para las enzimas indicadoras de colestasis, la ALT, es liberada al torrente sanguíneo a partir de la ruptura de la membrana del hepatocito por el efecto de la interacción de los metabolitos producto de los hepatotóxicos.^{155, 156}

Por otra parte, y de forma similar a lo ocurrido con la FA y γ -GTP, la Q ayudó a que este proceso no se llevara a cabo de forma tan marcada, esto correlaciona con lo reportado por Gupta y colaboradores,¹⁵⁷ en donde la Q previno la necrosis en un modelo de daño agudo inducido con dietilnitrosamina al disminuir los niveles de la actividad enzimática de la ALT; no obstante en el modelo de CCl₄ este fenómeno no fue significativo, una posible explicación a este comportamiento es que la ALT no solo se encuentra en el hígado, sino también en otros órganos como el corazón,¹⁵⁸ el riñón y el páncreas, así como en el músculo.¹⁵⁹ Por otro lado, los FR producto del metabolismo del CCl₄ tampoco son selectivos de un solo órgano, sino que atacan principalmente a los lípidos de las membranas celulares de los órganos que tengan las isoformas del Citocromo P450 encargadas de su metabolismo.¹⁶⁰⁻¹⁶²

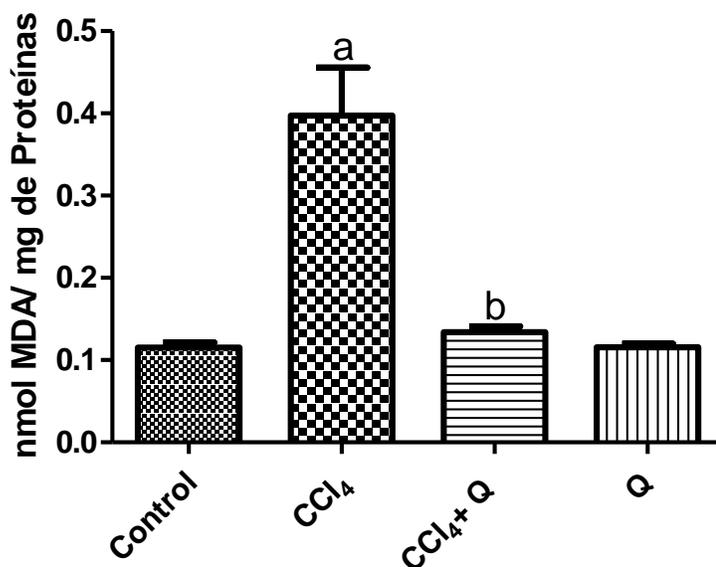
7.1.3 Determinación de los indicadores de estrés oxidativo celular

7.1.3.1 Medición del grado de peroxidación lipídica

La cuantificación de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico es utilizado como un parámetro del grado de peroxidación lipídica en los hepatocitos.



Gráfica 7. Determinación del grado de peroxidación lipídica en el hígado de las ratas sanas (control), tratadas con tioacetamida (TAA), TAA y quercetina (Q) y tratadas con Q sola. Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar. “a” indica $p < 0.05$ con respecto al control; “b” indica $p < 0.05$ con respecto a la TAA.

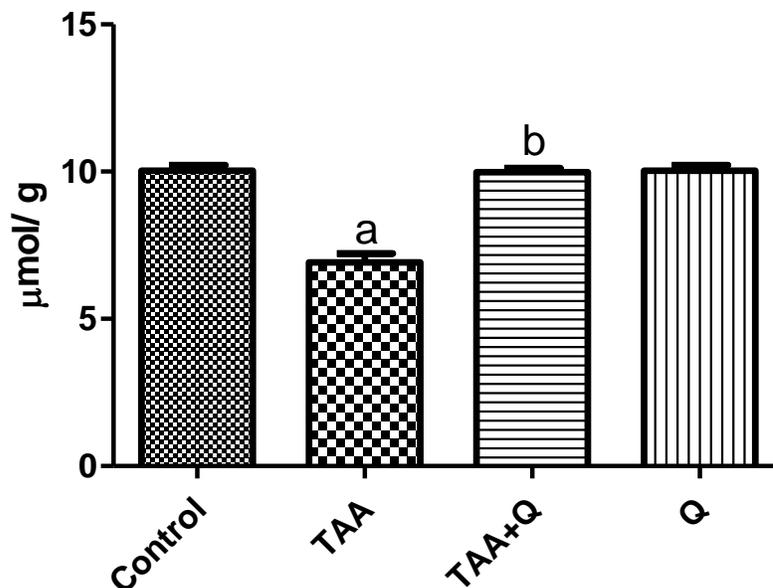


Gráfica 8. Determinación del grado de peroxidación lipídica en el hígado de las ratas sanas (control), tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), CCl₄ y quercetina (Q) y tratadas con Q sola. Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar. “a” indica $p < 0.05$ con respecto al control; “b” indica $p < 0.05$ con respecto a la CCl₄.

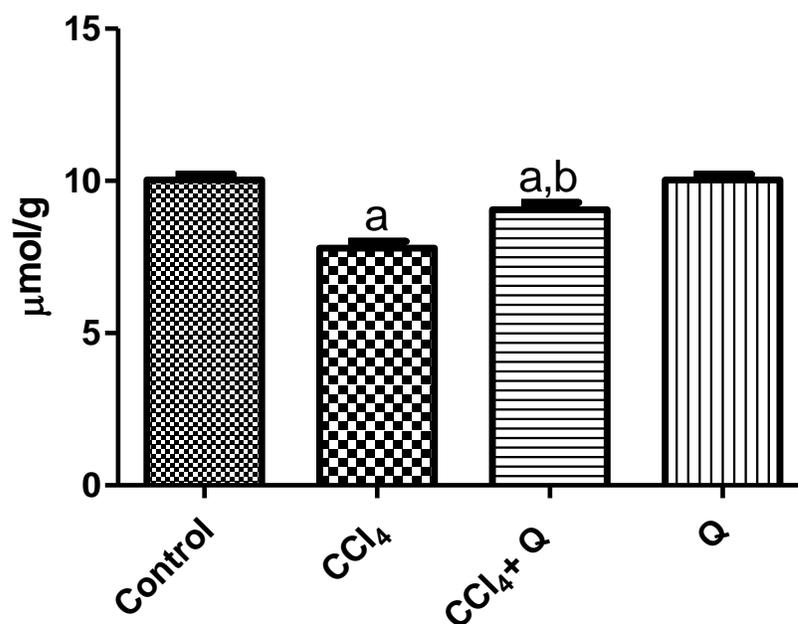
El grado de peroxidación lipídica representada como MDA (uno de los productos finales de la misma), en el grupo tratado con la TAA (Gráfica 7) fue superior al presentado en el grupo control, siendo dos veces mayor, mientras que en el tratado con CCl_4 (Gráfica 8) se observa un incremento de hasta cuatro veces, ambas significativas ($p < 0.05$). Por otro lado, la Q previno de forma total la peroxidación lipídica para ambos modelos de daño ($p < 0.05$). Cabe destacar que la Q, por sí sola no indujo cambios en los niveles de peroxidación.

7.1.3.2 Cuantificación del contenido de glutatión reducido

Esta medición permite determinar el impacto del estrés oxidativo citosólico producto del desbalance inducido por los FR.



Gráfica 9. Determinación del contenido de glutatión reducido en el hígado de las ratas sanas (control), tratadas con tioacetamida (TAA), TAA y quercetina (Q) y tratadas con Q sola. Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar. “a” indica $p < 0.05$ con respecto al control; “b” indica $p < 0.05$ con respecto a la TAA.



Gráfica 10. Determinación del contenido de glutatión reducido en el hígado de las ratas sanas (control), tratadas con tetracloruro de carbono (CCl_4), CCl_4 y quercetina (Q) y tratadas con Q sola. Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar. “a” indica $p < 0.05$ con respecto al control; “b” indica $p < 0.05$ con respecto a la CCl_4 .

Se observa que tanto la TAA como el CCl₄ administrados de forma crónica disminuyeron notablemente la cantidad de GSH presente en el hígado ($p < 0.05$) al compararlo con el grupo control. Por otro lado, en los grupos tratados de forma concomitante con la Q, el agotamiento de los niveles de GSH fue prevenido de forma total en el caso del modelo de TAA ($p < 0.05$) y parcialmente para el modelo de CCl₄ ($p < 0.05$). Además de lo anterior, la Q por sí misma no incrementó los niveles de GSH durante su período de administración.

En años recientes se ha sugerido que la peroxidación lipídica es crucial en el desarrollo de varias enfermedades, este proceso se lleva a cabo en las células de forma natural en pequeñas cantidades, principalmente por FR libres como las ROS,¹⁶³ en este caso y como ya se mencionó antes, los dos hepatotóxicos utilizados, al ser metabolizados producen FR, estos metabolitos son capaces de atacar a los ácidos grasos poliinsaturados y colesterol presentes en las membranas de los hepatocitos,¹⁶⁴ lo que conlleva a que algunos efectos indeseables, tales como la degeneración estructural de la membrana y de alteración en su fluidez, el incremento en la permeabilidad de los constituyentes citoplasmáticos, la liberación de enzimas lisosomales así como la inactivación de los transportadores presentes en la membrana.¹⁶⁵ La Q, en su estructura muestra que posee las características para actuar como antioxidante, al estar en su forma de aglicona, y no unida a otras moléculas,¹⁶⁶ es por ello que fue capaz de prevenir el incremento en los niveles de la peroxidación lipídica al donar los electrones necesarios para la estabilización de los metabolitos de la TAA y el CCl₄, y que éstos no los extrajeran de los lípidos presentes en las membranas. Estos resultados son parecidos a lo reportado por Maiti y colaboradores en el 2005,¹⁶⁷ en donde la Q a diversas dosis produjo la prevención en los niveles de MDA en un daño agudo inducido por CCl₄; sin embargo, en nuestro trabajo la Q mostró poseer la capacidad para mantener los niveles de MDA bajo el ataque de dos hepatotóxicos incluso en un curso temporal mayor.

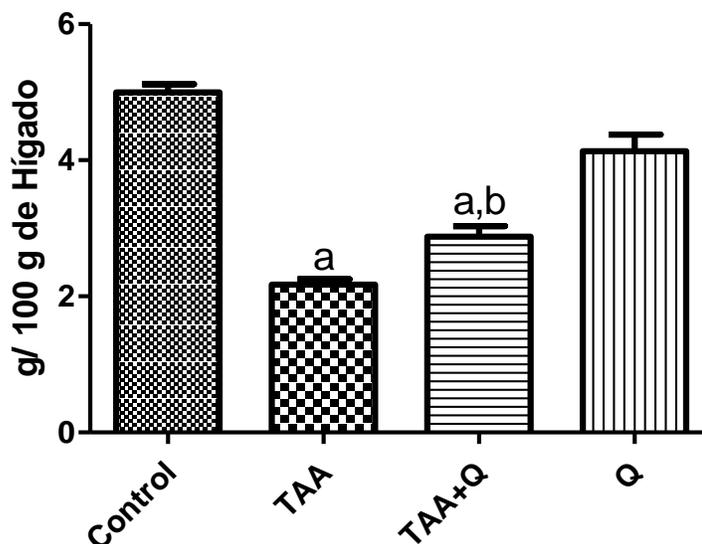
El GSH es un antioxidante endógeno no enzimático, además de ser una de las principales defensas antioxidantes dentro del hepatocito. Es por ello que se encarga de donar electrones para estabilizar a los FR que circulan por el microambiente

celular, nuestros resultados concuerdan con muchos estudios en donde los niveles de GSH son mermados después de la inducción de estrés oxidativo en el microambiente celular.^{11, 64, 65, 157, 168} Sin embargo, dado que la Q también actúa como un antioxidante, ésta pudo haber suplido la acción del GSH, por lo que este no disminuyó su concentración en los grupos tratados de forma concomitante con los hepatotóxicos y el flavonoide;¹⁶⁹ este efecto fue total para el modelo de TAA, mientras que para el caso del CCl₄ esto no fue tan evidente, posiblemente debido a que como se mencionó anteriormente, el CCl₄ al ser metabolizado por más de una isoforma del Citocromo P450, podría generar más FR, por lo que además de la Q, el GSH también interaccionaría con ellos y por lo tanto, sus niveles hepáticos disminuirían.

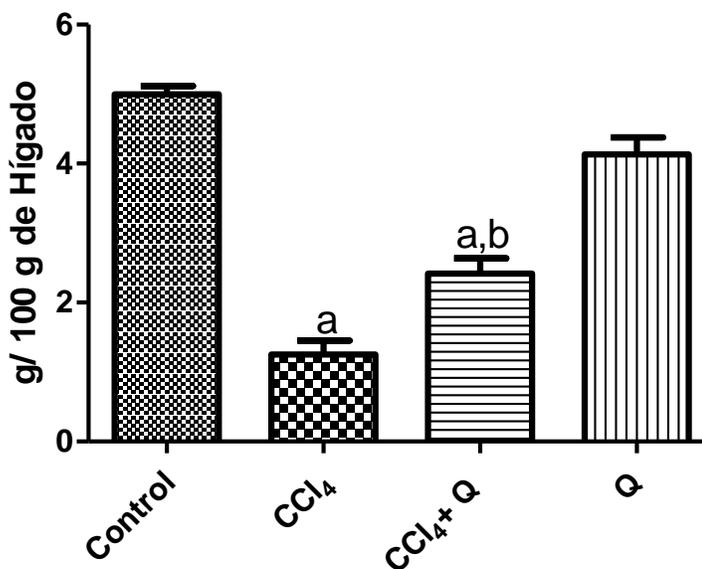
7.1.4 Valoración del indicador de funcionalidad del hígado

7.1.4.1 Determinación de la cantidad del contenido de glucógeno

El glucógeno al ser biosintetizado principalmente en el hígado, es un buen indicativo del posible daño a este órgano y sirve de referente para medir la pérdida de la funcionalidad del mismo.



Gráfica 11. Determinación del contenido de glucógeno en el hígado de ratas sanas (control), tratadas con tioacetamida (TAA), TAA y quercetina (Q) y tratadas con Q sola. Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar. “a” indica $p < 0.05$ con respecto al control; “b” indica $p < 0.05$ con respecto a la TAA.



Gráfica 12. Determinación del contenido de glucógeno en el hígado de ratas sanas (control), tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), CCl₄ y quercetina (Q) y tratadas con Q sola. Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar. “a” indica $p < 0.05$ con respecto al control; “b” indica $p < 0.05$ con respecto a la CCl₄.

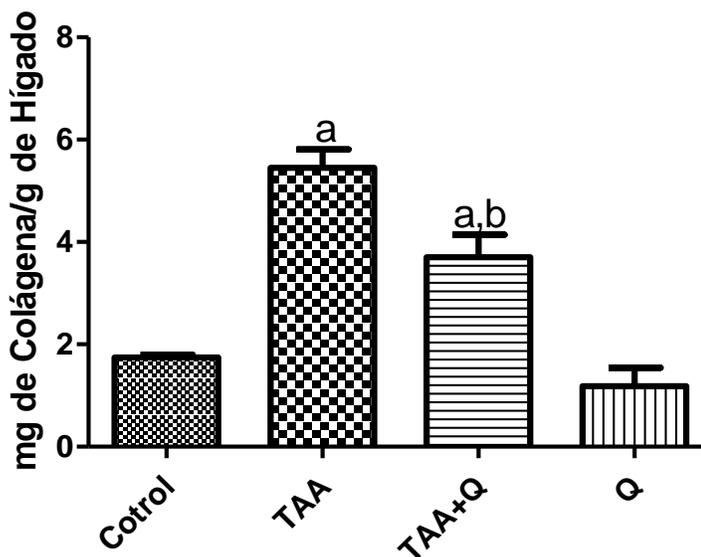
Como se observa en las gráficas 11 y 12, el daño crónico inducido con los hepatotóxicos produjo una disminución muy marcada en el contenido de glucógeno ($p < 0.05$), para ambos casos. Sin embargo, al administrarse la Q de forma concomitante, esta reducción se previno de forma parcial pero significativa ($p < 0.05$) tanto en el grupo tratado con la TAA así como en el de CCl_4 . Por otra parte, la Q no produjo cambios significativos en los niveles de glucógeno hepático.

Los resultados anteriores concuerdan con lo reportado por Candelario-Jalil y colaboradores,¹⁷⁰ en donde el CCl_4 produjo una disminución significativa del glucógeno hepático. Además, nuestro grupo de trabajo también ha reportado que la TAA induce una disminución en los niveles del glucógeno en el hígado.⁶⁴ Por lo anterior, nuestros resultados demuestran que el uso crónico de los hepatotóxicos emula de forma eficaz la pérdida de la función hepática para almacenar esta biomolécula. Esto posiblemente se deba a que al haber una ruptura de la membrana celular, los SERGE que son los sitios de la síntesis de glucógeno dentro del hepatocito,¹⁷¹ podrían quedar libres y no ejercer su función, además de no haber almacenamiento del glucógeno por parte del hepatocito. La Q, como se mencionó anteriormente, tuvo un efecto preventivo en la inducción de la necrosis por parte de los hepatotóxicos, es por ello, que al prevenir la muerte de los hepatocitos, éstos fueron capaces de sintetizar y almacenar el glucógeno, sin embargo, dado que la prevención no fue total, no se logró que la cantidad del glucógeno fuera comparable a la del control sano.

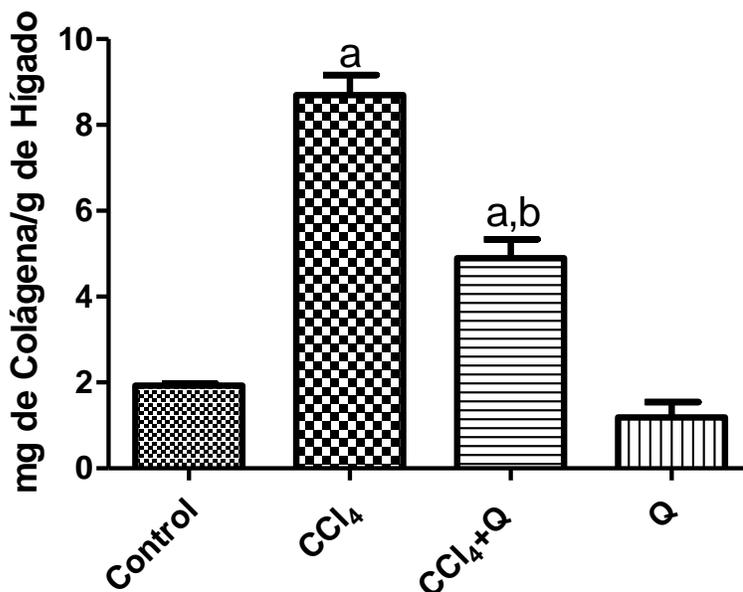
7.1.5 Determinación de los indicadores del grado de fibrosis

7.1.5.1 Cuantificación del contenido de colágena (hidroxiprolina)

La fibrosis es un estadio resultado del daño crónico inducido por algún agente nocivo para el hígado.



Gráfica 13. Determinación del contenido de colágena en el hígado de ratas sanas (control), tratadas con tioacetamida (TAA), TAA y quercetina (Q) y tratadas con Q sola. Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar. “a” indica $p < 0.05$ con respecto al control; “b” indica $p < 0.05$ con respecto a la TAA.



Gráfica 14. Determinación del contenido de colágena en el hígado de ratas sanas (control), tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), CCl₄ y quercetina (Q) y tratadas con Q sola. Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar. “a” indica $p < 0.05$ con respecto al control; “b” indica $p < 0.05$ con respecto a la CCl₄.

7.1.5.2 Tinción TM

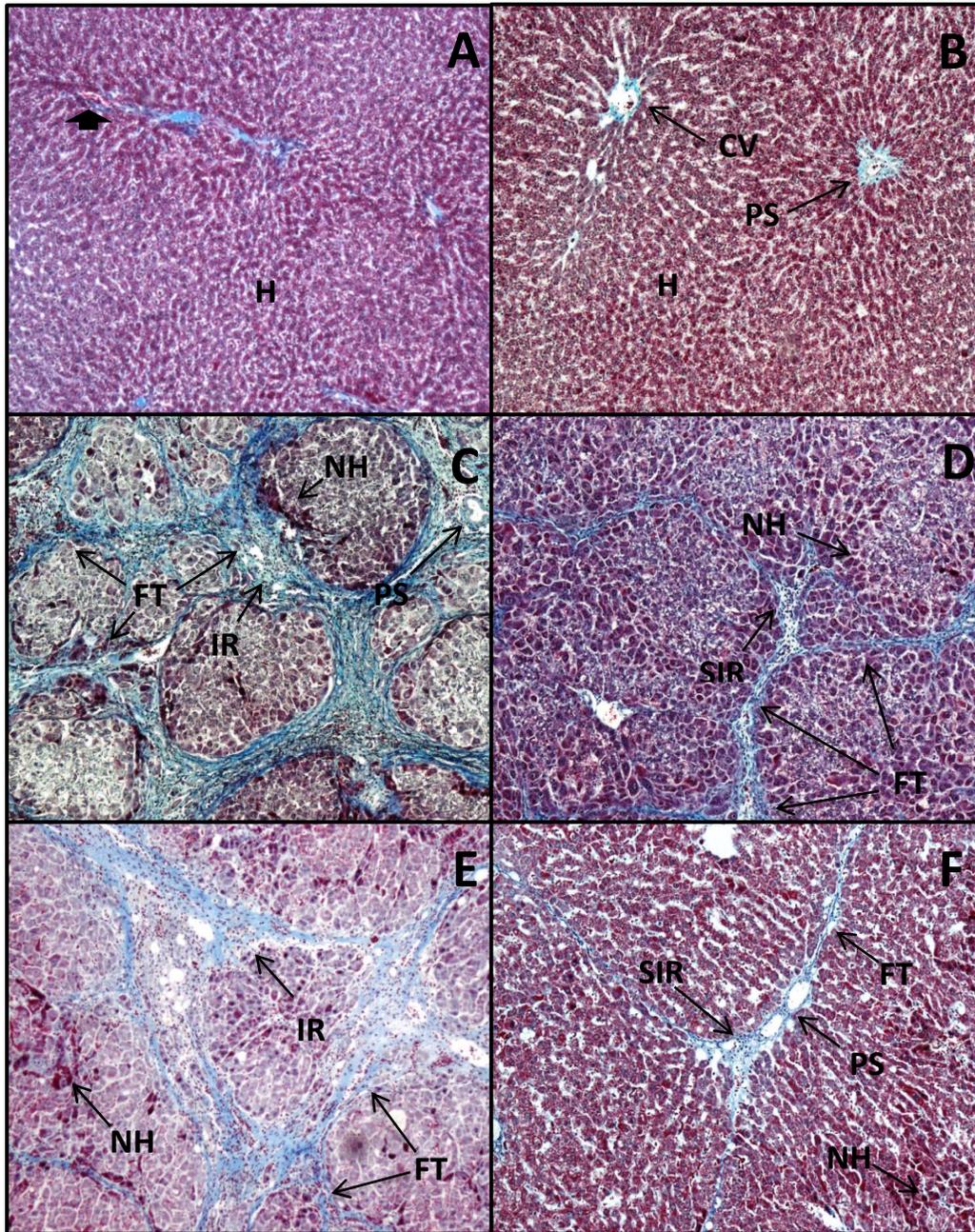


Figura 24. Histología de hígados de ratas después de diferentes tratamientos (tinción TM). A. Control sano; B. Quercetina; C. TAA; D. TAA+Q; E. CCl₄; F. CCl₄+Q. H= Hepatocito; CV= Vena central; PS= Espacio portal; FT=Tejido fibrótico; IR= Reacción inflamatoria; SIR= Escasa reacción inflamatoria; NH= Hepatocitos de neof ormación; flecha=Vena congestionada.

Los dos modelos de daño hepático produjeron un aumento en la deposición de la colágena en el parénquima hepático, esto se observa ya que la TAA (gráfica 13) indujo un incremento aproximadamente tres veces mayor ($p<0.05$) al compararlo con el grupo control, mientras que el CCl_4 (gráfica 14) produjo una acumulación de la colágena cuatro veces mayor ($p<0.05$). Esto también se observó en las histologías de la tinción TM presentadas en los paneles **C** y **E** que corresponden a el tratamiento con TAA y CCl_4 , respectivamente, contra el panel **A** que indica un parénquima sano. Por su parte, la Q previno de forma parcial pero significativa ($p<0.05$), el aumento en la deposición de colágena cuando se trató de la forma concomitante con los hepatotóxicos, siendo visible también en los paneles **D** y **F** que corresponden a los grupos mencionados anteriormente. Cuando se comparan contra los paneles **C** y **E** se observa como el contenido de la colágena es muy inferior, dando una apariencia similar a los paneles **A** y **B**. La Q no indujo un cambio en la deposición de colágena en el parénquima hepático, ni tampoco mostró cambiar la arquitectura del hígado, mostrándose también en el panel **B**.

Los resultados anteriores concuerdan con lo reportado por Palacios y colaboradores en el 2008, en su trabajo, ellos indujeron la fibrosis hepática con TAA por vía p.o. en diversos cursos temporales, siendo el máximo 16 semanas¹⁷² y por Luckey y colaborador en el 2001, ellos administraron el CCl_4 por seis semanas de igual forma por vía p.o.¹⁷³ Los hepatotóxicos son capaces de inducir la fibrosis en el hígado, ya que activan a las células estelares¹⁷² por medio de la producción de FR (ROS¹⁷⁴ y RNS¹⁷⁵) o por la liberación de las citocinas proinflamatorias (TGF- β e IL-6 principalmente),¹⁷⁶ todas ellas liberadas por las KC,¹⁷⁷ lo que produce un estado de perpetuación y conlleva a un desbalance en la homeostasis de la síntesis/degradación de ECM. La Q, como muestran los resultados, previno la deposición de colágena en el hígado, el posible mecanismo por el cual ejerce este efecto es por medio de la interacción con los FR, ya que como se dijo anteriormente, la Q presenta todas las características en su estructura química para ejercer un poderoso efecto antioxidante,¹⁶⁹ con esto no permitiría que las ROS y/o RNS interactúen con las HSC, además, la Q también ha mostrado poseer actividad antiinflamatoria,¹⁷⁸ por lo que las citocinas tampoco entrarían en contacto con las HSC. Por lo anterior, la Q podría

estar evitando que todos estos posibles agentes activen a las HSC, con ello impidiendo que la cascada de procesos que conducen a la fibrosis se lleve a cabo. Cabe señalar que Kawada y colaboradores en 1998,¹⁷⁵ demostraron que la Q era capaz de inhibir la vía de señalización de las MAPK, la expresión de α -SMA y la activación del PDGF de forma dependiente de la dosis, por lo que se sugiere que los efectos antifibrogénicos de la Q sean debido en parte a la inhibición de cascadas de señalización intracelulares que activen genes pro-fibrogénicos.

8. CONCLUSIÓN

8.1 Conclusiones particulares

- a) La inducción de la cirrosis fue claramente establecida tanto por la TAA como por el CCl₄, ya que los marcadores de colestasis, necrosis, estrés oxidativo, funcionalidad y fibrosis hepática se elevaron significativamente respecto de los grupos sanos.
- b) La Q es capaz de prevenir parcial pero significativamente el daño hepático producido por los hepatotóxicos.
- c) La prevención por parte de la Q sobre el estrés oxidativo a nivel membranal es total, mientras que a nivel citosólico es parcial pero significativa.
- d) La Q previno de forma parcial pero significativa la pérdida de la funcionalidad del hígado respecto de los grupos tratados con los hepatotóxicos.
- e) La Q previene la acumulación de colágena en el parénquima hepático, sugiriendo algún posible efecto antifibrogénico.

8.2 Conclusión general

La Q mostró capacidad hepatoprotectora al prevenir la cirrosis experimental inducida por dos hepatotóxicos, esto se debe probablemente a sus características como antioxidante y antiinflamatorio, por lo que actuaría cascada arriba en el proceso que desencadena la fibrosis y consecuentemente la cirrosis.

9. PERSPECTIVAS

- ❖ Para determinar de forma más precisa la capacidad antioxidante de la Q, es conveniente la medición de enzimas antioxidantes tales como la SOD, CAT y GPx.
- ❖ Probar el efecto antiinflamatorio en modelos de daño crónico, midiendo citocinas proinflamatorias para resaltar los efectos positivos de la Q.
- ❖ Determinar los efectos antifibrogénicos de la Q mediante técnicas de biología molecular para conocer mejor los mecanismos de acción de la misma.
- ❖ Ya que la dosis utilizada en este proyecto no causó efectos nocivos hacia el hígado, el aumento de la dosis y la prolongación del curso temporal de tratamiento podrían ser viables para poder obtener mejores resultados.

10.REFERENCIAS

1. Sánchez W., Talkawar J. A. (2010). Liver-Cirrhosis. *Gastroenterology Consultants of San Antonio*. 1, 1-2.
2. Tsukamoto H., Horne W., Kamimura S., Niemelä O., Parkkila S., Ylä-Herttuala S., Brittenhnam G. M. (1995). Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *Journal of Clinical Investigation*. 96, 620-630.
3. Lum G., Raymond G. S. (1972). Serum gamma-glutamyl transpeptidase activity as an indicator of liver, pancreas, or bone. *Clinical Chemistry*. 18, 358-362.
4. Rouach H., Fataccioli V., Gentil M., French S. W., Morimoto M., Nordmann R. (1997). Effect of chronic ethanol feeding of lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. *Hepatology*. 25, 351-355.
5. Zhou W., Zhang Q., Qiao L. (2014). Pathogenesis of liver cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology*. 21, 7312-7324.
6. Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS). (2008).
7. Heim E. K., Tagliaferro A. R., Bobilya D. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 13, 572-584.
8. Cao G., Sofic E., Prior R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology & Medicine*. 22, 749-760.
9. Nijveldt R. J., van Nood E., van Hoorn D. E. C., Boelens P. G., van Norren K., van Leeuwen P. A. M. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 74, 418-425.
10. Procházková D., Bousová I., Wilhelmová. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 82, 513-523.
11. Pavanato M. A., Marroni N. P., Marroni C. A., Llesuy S. F. (2007). Quercetin prevents oxidative stress in cirrhotic rats. *Digestive Diseases and Sciences*. 52, 2616-2621.
12. Koolman J., Röhm H-K. Tejidos y órganos En: Libro de Bioquímica: textos y atlas, pp 306-317. Médica Panamericana, Madrid, España, 2004.
13. Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de México. *Anatomía del hígado*. [en línea]. 2014. [Fecha de consulta: 08 de octubre de 2014]. Disponible desde: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/anatomia/computo/higado/anaformoli gado.html>.
14. The University of Chicago Medical Center. *Hígado: Anatomía y Funciones*. [en línea]. 2014. [Fecha de consulta: 08 de octubre de 2014]. Disponible desde: <http://www.uchospitals.edu/online-library/content=S03769.773-702-1000>.

15. Grisham J. W. Organizational Principles of the Liver. En: The liver. Biology and Pathobiology. (Eds. Arias I. M., Alter H. J., Boyer J. L., Cohen D. E., Fausto N., Shafritz D.A., and Wolkoff A. W.), pp 5-6. Wiley-Blackwell, Singapore, 2009.
16. Tortora J. G., Derrickson B. Hígado y vesícula biliar. En: Principios de Anatomía y Fisiología, pp 924-927. Médica Panamericana, Madrid, España, 2006.
17. Sociedad Cubana de Anatomía Patológica. *Histología Básica para Patólogos. Hígado*. [en línea]. 2014. [Fecha de consulta: 08 de octubre de 2014]. Disponible desde: http://www.conganat.org/7congreso/imagenes_trabajos/hppweb/p%C3%A1ginas/h%C3%ADgado.htm.
18. Moreau M., Riviére B., Vegna S., Aoun M., Gard C., Ramos J., Assenat E., Hibner U. 2014. Hepatitis C viral proteins perturb metabolic liver zonation. *Journal of Hepatology*. 14, 1-23.
19. Bowen R. *Hepatic Histology: The Acinus*. [en línea]. 2014. [Fecha de consulta: 08 de octubre de 2014]. Disponible desde: http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/liver/histo_acinus.html.
20. Bowen R. *Hepatic Histology: Hepatocytes*. [en línea]. 2014. [Fecha de consulta: 08 de octubre de 2014]. Disponible desde: http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/liver/histo_hcytes.html.
21. Barrao C. F. Funciones biológicas del sinusoide hepático. En: Tratado de Hepatología. (Eds. Herrerías G. J. M., Díaz B. A., and Jiménez S. M.), pp II,188-II,189, Universidad de Sevilla, Sevilla, España, 1996.
22. Reeves H. L., Friedman S. L. (2002). Activation of hepatic stellate cells- a key issue in liver fibrosis. *Frontier in Bioscience*. 7, 808-826.
23. Kaneda K., Wake K. (1983). Distribution and morphological characteristics of the pit cells in the liver of the rat. *Cell and Tissue Research*. 233, 485-505.
24. Braet F., Luo D., Spector I., Vermijlen D., Wisse E. Endothelial and Pit cells En: The Liver: Biology and Pathobiology. (Eds. Arias I. M., Boyer J. L., Chisari F. V., Fausto N., Schachter D., Shafritz D. A), pp 437-453. Williams & Wilkins. Philadelphia, USA, 2001.
25. Bernal W., Auzinger G., Dhawan A., Wendon J. (2010). Acute liver failure. *Lancet*. 376, 190-201.
26. Reyes-Gordillo K. Evaluación de la capacidad de la curcumina para prevenir o revertir el daño hepático experimental inducido con CCl₄ o mediante la obstrucción biliar prolongada en la rata. Tesis. Cinvestav-IPN. 2008.
27. Bataller R., Brenner D. A. (2005). Liver Fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 115, 209-218.
28. Hammel P., Couvelar A., O'Toole D., Ratouis A., Sauvanet A., Fléjou J. F., Degott C., Belghiti J., Bernardes P., Valla D., Ruszniewski P., Lévy P. (2001). Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *The New England Journal of Medicine*. 344, 418-423.

29. Pinzani M. (1999). Liver fibrosis. *Springer Seminars in Immunopathology*. 21, 475-490.
30. Arthur M. J. (2000). Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrogenesis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 279, G245-G249.
31. Gabele E., Brenner D. A., Rippe R. A. (2003). Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cells. *Frontier in Bioscience*. 8, d:69-d:77.
32. Milani S., Herbst H., Schuppan D., Kim K. Y., Riecken E. O., Stein H. (1990). Procollagen expression by nonparenchymal rat liver cells in experimental biliary fibrosis. *Gastroenterology*. 98, 175-184.
33. Marra F. (1999). Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. *Journal of Hepatology*. 31, 1120-1130.
34. Higuchi H., Gores G. J. (2003). Mechanisms of liver injury: an overview. *Current Molecular Medicine*. 3, 483-490.
35. Canbay A., Friedman S., Gores G. J. (2004). Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology*. 39, 273-278.
36. Viñas O., Bataller R., Sancho-Bru P., Ginès P., Berenquer C., Enrich C., Nicolás J. M., Ercilla G., Gallart T, Vives J., Arroyo V., Rodés J. (2003). Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology*. 38, 919-929.
37. Naito M., Hasewaga G., Ebe Y., Yamamoto T. (2004). Differentiation and function of Kupffer cells. *Medical Electron Microscopy*. 37, 16-28.
38. Thurman R. G. (1998). Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *American Journal of Physiology*. 275, G:605-G:611.
39. Kinnman N., Housset C. (2002). Peribiliary myofibroblast in biliary type liver fibrosis. *Frontier in Bioscience*. 7, d:496-d:503.
40. Gressner A. M., Weiskirchen R., Breitkopf K., Dooley S. (2002). Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Frontier in Bioscience*. 7, d:793-d:807.
41. Olaso E., Ikeda K., Eng F. J., Xu L. Wang L. H., Lin H. C., Friedman S. L. (2001). DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 108, 1369-1378.
42. Marra F. (2002). Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Frontier in Bioscience*. 7, d:1899-d:1914.
43. Shek F. W., Benyon R. C. (2004). How can transforming grow factor beta be targeted usefully to combat liver fibrosis? *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 16, 123-126.
44. Borkham-Kamphorst E., Stoll D., Gressner A. M., Weiskirchen R. (2004). Antisense strategy against PDGF-chain proves effective in preventing experimental liver fibrogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 321, 413-423.

45. Simeonova P. P., Gallucci R. M., Hulderman T., Wilson R., Komminemi C., Rao M., Luster M. I. (2001). The role of tumor necrosis factor- α in liver toxicity, inflammation, and fibrosis induced by carbon tetrachloride. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 117, 112-120.
46. Paizis G., Cooper M. E., Schembri J. M., Tikellis C., Burrell L. M., Angus P. W. (2002). Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver. *Gastroenterology*. 123, 1667-1676.
47. Bataller R., Sancho-Bru P., Ginès P., Lora J. M., Al-Garawi A., Solé M., Colmenero J., Nicolás J. M., Jiménez W., Weich N., Gutiérrez-Ramos J. C., Arroyo V., Rodés J. (2003). Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology*. 125, 117-125.
48. Bataller R., Schwabe R. F., Choi Y. H., Yang L., Paik Y. H., Lindquist J., Qian T., Schoonhoven R., Hagedorn C. H., Lemasters J. J., Brenner D. A. (2003). NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*. 112, 1383-1394.
49. Bataller R., Gäbele E., Schoonhoven R., Morris T., Lenhert M., Yang L., Brenner D. A., Rippe R. A. (2003). Prolonged infusion of angiotensin II into normal rats induces stellate cell activation and proinflammatory events in the liver. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 285, G:642-G:651.
50. Bataller R., Ginès P., Nicolás J. M., Görbig M. N., García-Ramallo E., Gasull X., Bosch J., Arroyo V., Rodés J. (2000). *Gastroenterology*. 118, 1149-1156.
51. Ramalho L. N., Ramalho F. S., Zucoloto S., Castro-e-Silva J. O., Correa F. M., Elias J. J., Magalhaes J. F. (2002). Effect of losartan, an angiotensin II antagonist, on secondary biliary cirrhosis. *Hepatogastroenterology*. 49, 1499-1502.
52. Tuncer I., Ozbek H., Ugras S., Bayram I. (2003). Anti-fibrogenic effects of captopril and candesartan cilexetil on the hepatic fibrosis development in rat. The effect of AT-1 R blocker on the hepatic fibrosis. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 55, 159-166.
53. Muriel P. (2009). Role of free radicals in liver diseases. *Hepatology International*. 3, 526-536.
54. Novo E., Parola M. (2008). Redox mechanism in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. 13, 5-23.
55. Friedman S. L. (2008). Mechanism of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 134, 1655-1669.
56. Wu J., Zern M. A. (2000). Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis. *Journal of Gastroenterology*. 35, 665-672.
57. Pinzani M., Rosselli M., Zuckerman M. (2011). Liver cirrhosis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 25, 281-290.
58. Desmet V. J., Roskams T. (2004). Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth. *Journal of Hepatology*. 40, 860-867.

59. Wanles I. R., Nakashima E., Sherman M. (2000). Regression of human cirrhosis. Morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 124, 1599-1607.
60. Schuppan Detlef., Afdhal N. H. (2008). Liver cirrhosis. *Lancet*. 371, 838-851.
61. Quinn P. S., Higginson J. (1965). Reversible and irreversible changes in experimental cirrhosis. *The American Journal of Pathology*. 47, 353-369.
62. Pérez-Tamayo R. (1979). Cirrhosis of the liver: a reversible disease? *Pathology Annual*. 14, 183-213.
63. Reyes-Gordillo K., Segovia J., Shibayama M., Tsutsumi V., Vergara P., Moreno G. M., Muriel P. (2008). Curcumin prevents and reverses cirrhosis induced by bile duct obstruction or CCl₄ in rats: role of TGF- β modulation and oxidative stress.
64. Arauz J., Galicia-Moreno M., Cortés-Reynosa P., Pérez Salazar E., Muriel P. (2008). Coffee attenuates fibrosis by decreasing the expression of TGF- β and CTGF in a murine model of liver damage. *Journal of Applied Toxicology*. 33, 970-979.
65. Pérez-Vargas J. E., Zarco N., Shibayama M., Segovia J., Tsutsumi V., Muriel P. (2014). Hesperidin prevents liver fibrosis in rats by decreasing the expression of nuclear factor- κ B, transforming growth factor- β and connective tissue growth factor. *Pharmacology*. 94, 80-89.
66. Muriel P., Mourelle M. (1990). The role of membrane composition on ATPases activities of cirrhotic rats. Effect of silymarin. *The Journal of Applied Toxicology*. 10, 281-284.
67. Muriel P. Peroxidation of lipids and liver damage. En: Oxidants and Free Radicals. (Eds. Baskin S. I. and Salem H.), pp 237-257. Taylor & Francis. Washintong, DC, USA, 1997.
68. Kyung-Hyun K., Hyun-Chul., Mee-Yul., Hoon-Kyu O., Tae Sung L., Young Chae C., Ho-Jung S., Nam-Hee W., Kwan-Kyu P. (2006). The antifibrotic effect of TGF- β 1 siRNAs in murine model of liver cirrhosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 343, 1072-1078.
69. Muriel P. Cytokines in liver diseases. En: Hepatotoxicity: from genomics to in vitro and in vivo Models. (Ed. Sahu S.), pp 371-389. John Wiley & Sons LTD, West Sussex, UK, 2007.
70. Weber L. W. D., Boll M., Stampfi A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbón tetrachloride as a toxicological model. *Critical Reviews in Toxicology*. 33, 105-136.
71. McCay P. B., Lay E. K., Poyer J. L., DuBose C. M., Jansen E. G. (1984). Oxygen and carbon-centered free radical forming during carbon tetrachloride metabolism. *Journal of Biological Chemistry*. 259, 2135-2143.
72. Racknagel R. O., Glende E. A. Jr., Dolak J. A., Waller R. L. (1989). Mechanism of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacology & Therapeutics*. 43, 139-154.

73. Tomasi A., Albano E., Bani S., Botti B., Corongiu F., Dessi M., Lannone A., Vannini V., Dianzani M. U. (1987). Free radical metabolism of carbon tetrachloride in rat liver mitochondria. *Biochemical Journal*. 246, 313-317.
74. Gruebele A., Zawaski K., Kaplan D., Novak R. F. (1996). Cytochrome P450E1- and cytochrome P450B1/2B2-catalized carbon tetrachloride metabolism: effects on signal transduction as demonstrated by altered immediate-early (c-Fos and C-Jun) gene expression and nuclear AP-1 and NF- κ B transcription factor levels. *Drug Metabolism and Disposition*. 24, 15-22.
75. Zangar R. C., Benson J. M., Burnett V. L., Springer D. L. (2000). Cytochrome P450 2E1 is the primary enzyme responsible for low-dose carbon tetrachloride metabolism in human liver microsomes. *Chemico-Biological Interactions*. 15, 233-243.
76. Manno M., Ferrera R., Cazzaro S., Rigotti P., Ancona E. (1992). Suicidal inactivation of human cytochrome P-450 by carbon tetrachloride and halothane *in vitro*. *Pharmacology & Toxicology*. 70, 13-18.
77. Fuji K. (1997). Preventive effect of isofluran on destruction of cytochrome P450 during dehalogenation of carbon tetrachloride in guinea pig microsomes. *Drug Metabolism and Drug Interactions*. 14, 99-107.
78. DiRenzo A. B., Gandolfi A. J., Sipes I. G. (1982). Microsomal bioactivation and covalent binding of aliphatic halides to DNA. *Toxicology Letters*. 11, 243-252.
79. Lamson P. D., Wing R. (1926). Early cirrhosis of the liver produced in dogs by carbon tetrachloride. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 29, 191-202.
80. Cameron G. R., Karunaratne W. A. E. (1932). Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. 42, 1-21.
81. Muriel P., Moreno M. G., Hernández M. C., Chávez E., Alcantar L. K. (2005). Resolution of liver fibrosis in chronic CCl₄ administration in the rat after discontinuation of the treatment: effect of silymarin, silibinin, colchicine and trimethylcolchicinic acid. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 96, 275-280.
82. Daniel P. M., Prichardt M. L., Reynoll P. C. (1952). The portal circulation in experimental cirrhosis of the liver. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. 64, 53-60.
83. Report o Carcinogenesis. (2011). *National Toxicology Program, Department of Health and Human Services*. 12th edition. pp 403.
84. Wang T., Shankar K., Ronis M. J. J., Mehendale H. M. (2000). Potentiation of thioacetamide liver injury in diabetic rats is due to induced CYP2E1. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 294, 473-479.
85. Porter W. R., Neal R. A. (1978). Metabolism of thioacetamide and thioacetamide S-oxide by rat liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*. 6, 379-388.

86. Venereo G. J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 31, 126-133.
87. Dröge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. 82, 47-95.
88. Apel K., Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 55, 373-399.
89. Palmer R. M. J., Rees D. D., Ashton D. S., Moncada S. (1988). L-Arginine is the physiological precursor formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 153, 1251-1256.
90. Dedon P. C., Tannenbaum S. T. (2004). Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 423, 12-22.
91. Finley J. W., Wheeler E. L., Witt S. C. (1981). Oxidation of glutathione by hydrogen peroxide and other oxidizing agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 29, 404-407.
92. Li J., Huang F. L., Huang K. P. (2001). Glutathiolation of proteins by glutathione disulfide S-oxide derived from S-nitrosoglutathione. Modifications of rat brain neurogranin/RC3 and neuromodulin/GAP-43. *The Journal of Biological Chemistry*. 276, 3098-3105.
93. Giles G. I., Tasker K. M., Jacob C. (2002). Oxidation of biological thiols by highly reactive disulfide-S-oxides. *General Physiology and Biophysics*. 21, 67-74.
94. Giles G. I., Tasker K. M., Jacob C. (2001). Hypothesis: the role of reactive sulfur species in oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*. 31, 1279-1283.
95. Giles G. I., Jacob C. (2002). Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 383, 375-388.
96. Devasagayam T. P., Sundquist A. R., Di Mascio P., Kaiser S., Sies H. (1991). Activity of thiols as singlet molecular oxygen quenchers. *Photochemistry and Photobiology*. B 9, 105-116.
97. Clennan E. L., Wang D., Clifton C., Chen M. F. (1997). Geometry-dependent quenching of singlet oxygen by dialkyl disulfides. *Journal of American Chemistry Society*. 119, 9081-9082.
98. Okamoto T., Akaike T., Sawa T., Miyamoto Y., van der Vliet M. A., Maeda H. (2001). Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced-S-glutathiolation via disulfide-S-oxide formation. *The Journal of Biological Chemistry*. 276, 29596-29602.
99. Giles G. I., Tasker K. M., Collins C., Giles N. M., O'Rourke E., Jacob C. (2002). Reactive sulfur species: an *in vitro* investigation of the oxidation properties of disulphide S-oxides. *Biochemical Journal*. 364, 579-585.
100. Halliwell B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Communications*. 9, 1-32.

101. Ternay Jr. A. L., Sorokin V. Redox, radicals, and antioxidants. En: Oxidants, antioxidants, and free radical. (Eds. Baskin S. I., Salem H.), pp 1-21. Taylor & Francis, Washintong, 1997.
102. Rodríguez Carrasco B. B., Alonso Cordero M .E., Boyero Fernández E. (2003). Estrés oxidativo y sistema antioxidante. *Revista de Ciencias Médicas La Habana.* 9, 1-9.
103. McCord J. M., Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry.* 244, 6049-6055.
104. Martin M. E., Byers B. R., Olson M .O., Salin M. L., Arceneaux J. E., Tolbert C. (1986). A *streptococcus mutants* superoxide dismutase that is active with either manganese or iron as a cofactor. *The Journal of Biological Chemistry.* 261, 9361-9367.
105. Kono Y., Fridovich I. (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *The Journal of Biological Chemistry.* 257, 5751-5754.
106. Michiels C., Raes M., Toussaint O., Remacle J. (1994). Importance of S-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine.* 17, 235-248.
107. Meister A. (1994). Glutathione-Ascorbic acid antioxidant system in animals. *The Journal of Biological Chemistry.* 269, 9397-9400.
108. Martínez-Sámano J., Torres-Durán P. V., Juárez-Oropeza M. A. (2011). El glutatión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento, y la isquemia cerebral. *Revista de Educación Bioquímica.* 30, 56-76.
109. Martínez-Flórez S., González-Gallego J., Culebras J. M., Tuñón M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria.* 6, 271-278.
110. Kühnau J. (1976). The flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics.* 24, 117-190.
111. Havsteen B. (1983). Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology.* 32, 1141-1148.
112. Letan A. (1966). The relation of structure to antioxidant activity of quercetin and some of its derivatives. *Journal of Food Science.* 31, 518-523.
113. Hertog M. G., Hollman P. C., Katan M. B., Kromhout D. (1993). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutrition and Cancer.* 20, 21-29.
114. Justesen U., Knuthsen P., Leth P. (1997). Determination of plant polyphenols in Danish foodstuffs by HPLC-UV and LC-MS detection. *Cancer Letters.* 114, 165-167.

115. de David C., Rodrigues G., Bona S., Meurer L., González-Gallego J., Tuñón M. J., Marroni P. M. (2011). Role of quercetin in preventing thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicologic Pathology*. 39, 949-957.
116. Peres W., Tunon M. J., Collado P. S., Herrmann S., Marroni N., González-Gallego J. (2000). The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *Journal of Hepatology*. 33, 742-750.
117. Singh D., Chander V., Chopra K. (2004). The effect of quercetin, a bioflavonoid on ischemia/reperfusion induced renal injury in rats. *Archives of Medical Research*. 35, 484-494.
118. Rotelli A. E., Guardia T., Juárez A. O., de la Rocha N. E., Pelzer L. E. (2003). Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacological Research*. 48, 601-606.
119. Araújo J. R., Gonçalves P., Martel F. (2011). Chemoprotective effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutrition Research*. 31, 77-87.
120. Parl C., So H., Shin C., Baek S., Moon B., Shin S., Lee H. S., Lee D. W., Park R. (2003). Quercetin protects the hydrogen peroxide induced apoptosis via inhibition of mitochondrial dysfunction in H9O2 cardiomyoblast cells. *Biochemical Pharmacology*. 66, 1287-1295.
121. Domitrovic R., Jakovac H., Vasiljev Marchesi V., Vladimir-Knezevic S., Cvijanovic O., Tadic Z., Romic Z., Rahelic D. (2012). Differential hepatoprotective mechanism of rutin and quercetin in CCl₄-induced hepatotoxicity BALB/cN mice. *Acta Pharmacologica Sinica*. 10, 1260-1270.
122. Chaudhary A., Willett K. L. (2006). Inhibition of human cytochrome CYP 1 enzymes by flavonoids of St. John's wort. *Toxicology*. 217, 194-205.
123. Wang L., Tu Y. C., Lian T. W., Hung J. T., Yen J. H., Wu M. J. (2006). Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonoles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 9798-9804.
124. Graefe E. U., Witting J., Mueller S., Riethling A. K., Uehleke B., Drewelow B., Pforte H., Jacobasch G., Derendorf H., Veit M. (2001). Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 41, 492-499.
125. Graefe E. U., Witting J., Drewelow B., Riethling A. K., Mueller S., Wukasch I., Derendorf H., Veit M. (1999). Relative systematic availability of the flavonoids quercetin and rutin in humans. *Archiv der Pharmazie Pharmaceutical & Medical Chemistry*. 332, 20.
126. Gungler R., Leschik M., Dengler H. J. (1975). Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 9, 229-234.
127. Manach C., Morand C., Crespy V., Deminge C., Texier O., Regerat F., Remesy C. (1998). Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Letters*. 426, 331-336.

128. Graefe E. U., Derendorf H., Veit M. (1999). Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 37, 219-233.
129. Bokkenheuser V. D., Winter J., Cohen B. I., O'Rourke S., Mosbach E. H. (1987). Hydrolysis of dietary flavonoid glycoses by strains of intestinal bacteroides from humans. *Biochemical Journal*. 248, 953-956.
130. Crespy V., Morand C., Manach C., Besson C., Demigne C., Remesy C. (1999). Part of the quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology*. 277, G120-G126.
131. Harwood M., Danielewska-Nikiel B., Borzelleca J. F., Flamm G. W., Williams G. M., Lines T. C. (2007). A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of *in vivo* toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food and Chemical Toxicology*. 45, 2179-2205.
132. de Boer V. C., Dihal A. A., van der Woude H., Arts I. C., Wolfram S., Alink G. M., Rietjens I. M., Keijer J., Hollman P. C. (2005). Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *Journal of Nutrition*. 135, 1718-1725.
133. Dugdale D. C. *Fosfatasa Alcalina* [en línea]. 2014. [Fecha de consulta: 22 de octubre de 2014]. Disponible desde: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003470.htm>.
134. Berger L. and Rudolph G. N. (1963). Alkaline phosphatase. *Standards Methods of Clinical Chemistry*. New York, Academic Press. 5, 56.
135. Soza A. *Gamma glutamil transpeptidasa (GGT)*. [en línea]. 2014. [Fecha de consulta: 22 de octubre de 2014]. Disponible desde: <http://hepatitis.cl/273/ggt>
136. Glossman H. and Neville D. M. Jr. (1972). γ -glutamyltranspeptidase in kidney brush border membranes. *FEBS Letters*. 19, 340-344.
137. Reitman S. and Frankel S. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathology*. 28, 56-63.
138. Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
139. Buege J. A. and Aust S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzimology*. 52, 302-310.

140. Ellman G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 82, 70-77.
141. Pierce Biotechnology, Inc. *Ellman's Reagent*. [en línea]. 2014. [Fecha de consulta: 22 de octubre de 2014]. Disponible desde: <https://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/PCC/22582.pdf>
142. Gutiérrez D. J. (Noviembre de 1998). Determinación de carbohidratos en aguas residuales de la industria azucarera y cuerpos de aguas contaminadas. En A. Noyola (Presidencia), XXVI Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Congreso llevado a cabo en Lima, Perú.
143. Seifter S., Seymour D., Novic B., and Muntwyler E. (1950). The estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Archives of Biochemistry*. 25, 191-200.
144. Peterkofsky B. (1972). The effect of ascorbic acid on collagen polypeptide synthesis and proline hydroxylation during the growth of cultured fibroblast. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 152, 318-328.
145. Rojkind M. and González E. (1974). An improve method for determining specific radioactivities of proline-¹⁴C and hydroxyproline-¹⁴C in collagen and in noncollagenous proteins. *Analytical Biochemistry*. 57, 1-7.
146. Montalvo A. C. E. *Técnica Histológica*. [en línea]. 2014. [Fecha de consulta: 22 de octubre de 2014]. Disponible desde: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/recursos%20instructores/APUNTE%20DE%20TECNICA%20HISTOLOGICA%20Dr.%20Montalvo.pdf>
147. Suvik A., Effendy A. W. M. (2012). The use of modified Masson's trichrome staining in collagen evaluation in wound healing study. *Malaysian Journal of Veterinary Research*. 3, 39-47.
148. Prophet E. B. Trichrome Masson stain. En: *Laboratory Methods in Histotechnology*. (Eds. Mills B., Arrington J. B., Sobin L. H.), pp 132. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, USA, 1992.
149. Hamed M.G., Bahgat N. M., Mottaleb F. I. A., Emara M. M. (2011). Effect of flavonoid quercetin supplement on the progress of liver cirrhosis in rats. *Life Science Journal*. 8, 641-649.

150. Achliya G. S., Wadodkar S. G., Dorle A. K. (2004). Evaluation of hepatoprotective effect of Almakadi Ghrita against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 90, 229-232.
151. Hernández-Ortega L. D., Alcántar-Díaz B. E., Ruiz-Corro L. A., Sandoval-Rodriguez A., Bueno-Topete M., Armendariz-Borunda J., Salazar-Montes A. M. (2012). Quercetin improves hepatic fibrosis reducing hepatic stellate cells and regulating pro-fibrogenic/anti-fibrogenic molecules balance. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 27, 1865-1872.
152. Chen X. (2010). Protective effects of quercetin on liver injury induced by ethanol. *Pharmacognosy Magazine*. 6, 135-141.
153. Mitra S. K., Venkataranganna M. V., Gopumadhavan S., Sundaran R. (1999). Anti-cholestatic activity of HD-03, a herbal formulation in thioacetamide (TAA)-induced experimental cholestasis. *Indian Journal of Experimental Biology*. 37, 409-410.
154. Geier A., Dietrich Christoph G., Voigt S., Kim S. K., Gerloff T., Kullak-Ublick G. A., Lorenzen J., Matern S., Gartung C. (2003). Effects of proinflammatory cytokines on rat organic anion transporters during toxic liver injury and cholestasis. *Hepatology*. 2, 345-354.
155. Osada J., Aylagas H., Sanchez-Vegazo I., Gea T., Millan I., Palacios-Alaiz E. (1986). Effect of *S*-adenosyl-*L*-methionine on thioacetamide-induced liver damage in rats. *Toxicology Letters*. 32, 97-106.
156. Czaja M. J., Xu J., Alt E. (1995). Prevention of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by soluble tumor necrosis factor receptor. *Gastroenterology*. 108, 1849-1854.
157. Gupta C., Vikram A., Tripathi D. N., Ramarao P., Jena G. B. (2010). Antioxidant and antimutagenic effect of quercetin against DEN induced hepatotoxicity in rat. *Phytotherapy Research*. 24, 119-128.
158. Schindhelm R. K., Dekker J. M., Nijpels G., Bouter L. M., Stehouwer C. D. A., Heine R. J., Diamant M. (2007). Alanine aminotransferase predicts coronary heart disease events: A 10-year follow-up of the Hoorn Study. *Atherosclerosis*. 191, 391-396.

159. Thompson E. G., Simon B. J. *Alanine aminotransferase*. [en línea]. 2014. [Fecha de consulta: 27 de octubre de 2014]. Disponible desde: <http://www.webmd.com/digestive-disorders/alanine-aminotransferase-alt>.
160. Lengler J., Omann M., Düvier D., Holzmüller H., Gregor W., Salmons B., Günzburg W. H., Renner M. (2006). Cytochrome P450 reductase dependent inhibition of cytochrome P450 activity 2B1 activity: Implications for gene directed enzyme prodrug therapy. *Biochemical Pharmacology*. 72, 893-901.
161. Kaminsky L. S., Fasco M. J. (1991). Small intestinal cytochrome P450. *Critical Reviews in Toxicology*. 21, 407-422.
162. Liu H., Tian N., Arany I., Bigler S. A., Waxman D. J., Shah S. V., Baliga R. (2010). Cytochrome P450 2B1 mediates complement-dependent sublytic injury in a model of membranous nephropathy. *The Journal of Biological Chemistry*. 52, 40901-40910.
163. Mylonas C., Kouretas D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*. 13, 295-309.
164. Niki E., Yoshida Y., Saito Y., Noguchi N. (2005). Lipid peroxidation: Mechanism, inhibition, and biological effects.
165. Girotti A. W. (1985). Mechanism of lipid peroxidation. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*. 1, 87-95.
166. Revuelta-López A., Sánchez-Gallego J. I., Hernández-Hernández A., Sánchez-Yagüe J., Llanillo M. (2006). Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions*. 161, 79-91.
167. Maiti K., Mukherjee K., Gantit A., Ahamed H. N., Pada B. S., Mukherjee P. K. (2005). Enhanced therapeutic benefit of quercetin-phospholipid complex in carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats: A comparative study. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*. 4, 84-90.
168. Pavanato M. A., Tuñón M. J., Campos-Sánchez S., Marroni C. A., Llesuy S., Gallego-González J., Marroni N. (2003). Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Digestive Diseases and Sciences*. 48, 824-829.

169. Bors W., Heller W., Michel C., Saran M. (1990). Radical chemistry of flavonoid antioxidant. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 264, 165-170.
170. Candelario-Jalil E., Al-Dalain M., León Fernández O. S., Menéndez S., Pérez-Davison G., Merino N., Sam S., Ajamieh H. H. (2001). Oxidative preconditioning affords protection against carbon tetrachloride-induced glycogen depletion and oxidative stress in rats. *Journal of Applied Toxicology*. 21, 297-301.
171. Cardell R., Michaels J., Hung J., Cardell E. (1985). SERGE, the subcellular site of initial hepatic glycogen deposition in the rat: a radioautographic and cytochemical study. *Journal of Cell Biology*. 101, 201-206.
172. Palacios S. R., Roderfeld M., Hemmann S., Rath T., Atanasova S., Tschuschner A., Gressner O. A., Weiskirchen R., Graf J., Roeb E. (2008). Activation of hepatic stellate cells is associated with cytokine expression in thioacetamide-induced hepatic fibrotic in mice. *Laboratory Investigation*. 88, 1192-1203.
173. Luckey S. W., Petersen D. R. (2001). Activation of Kupffer cells during the course of carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in rats. *Experimental and Molecular Pathology*. 71, 226-240.
174. Nieto N., Friedman S. L., Cederbaum A. I. (2002). Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology*. 35, 62-73.
175. Kawada N., Seki S., Inoue M., Kuroki T. (1998). Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and *N*-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology*. 27, 1265-1274.
176. Tsukamoto H. (1999). Cytokine regulation of hepatic stellate cells in liver fibrosis. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 23, 911-916.
177. Gressner A. M. (1996). Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblast: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney International Supplement*. 54, S39-S45.

178. Boots A. W., Wilms L. C., Swennen E. L. R., Kleinjans J. C. S., Bast A., Haenen G. R. M. M. (2008). *In vitro* and *ex vivo* anti-inflammatory activity of quercetin in healthy volunteers. *Applied Nutritional Investigation*. 24, 703-710.

11. APÉNDICES

12.1 Curva de calibración de la FA

Para realizar la curva estándar de calibración se prepararon las siguientes disoluciones:

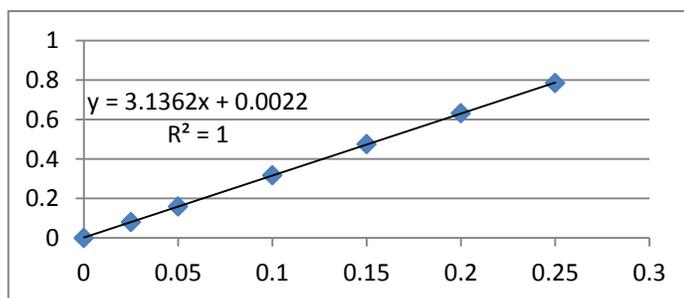
- ❖ **Disolución estándar de p-nitrofenol (10 µmoles/ml).** Se pesaron 34.78 mg de p-nitrofenol y se aforaron con agua destilada en un matraz volumétrico de 25 mL.
- ❖ **Disolución 2.** Se tomaron 0.5 mL de la disolución anterior y se aforaron a 100 ml con NaOH 0.02 N.
- ❖ **Disolución de hidróxido de sodio 0.02 N,** en adelante referida como disolución 3 (Tabla 5).

La Tabla 5 muestra las cantidades añadidas de cada una de las disoluciones a fin de obtener distintas concentraciones del producto de la reacción (para-nitrofenol).

Tubo	Disolución 2 (mL)	Disolución 3 (mL)	Sustrato hidrolizado (µmoles)
1	0.0	5.5	0.0
2	0.5	5	0.025
3	1.0	4.5	0.050
4	2.0	3.5	0.100
5	3.0	2.5	0.150
6	4.0	1.5	0.200
7	5.0	0.5	0.250

Después de adicionar las disoluciones, los tubos se agitaron por inversión y las absorbancias se leyeron a 410 nm en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1201.

A cada valor de concentración correspondió un valor de absorbancia con lo cual se construyó una ecuación de la forma $y = mx + b$, en donde y corresponde a cada uno de los valores de absorbancia obtenidos en la lectura de las muestras de plasma sanguíneo, m y b a la pendiente de la recta y ordenada al origen respectivamente, y x corresponde al valor de concentración desconocido.



Gráfica 15. Curva de calibración para la FA.

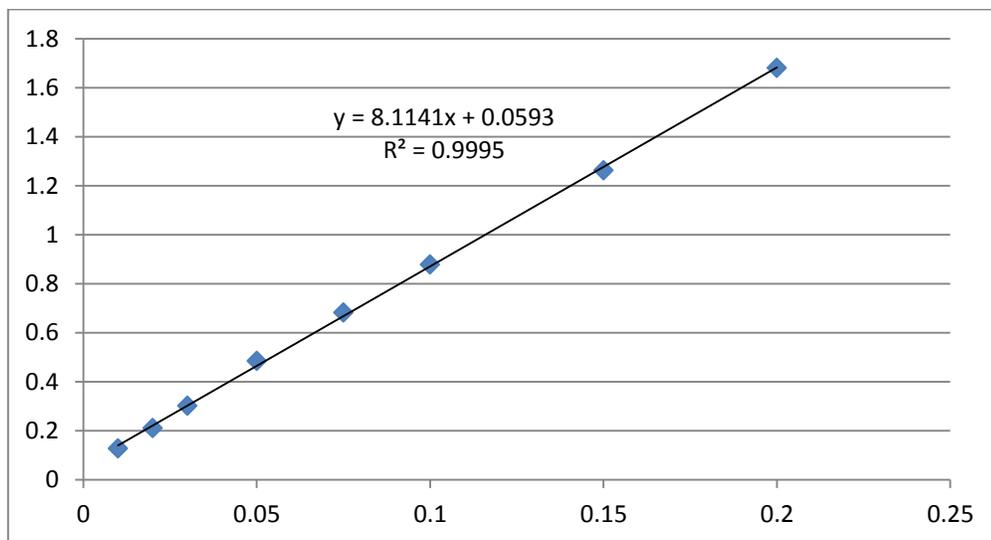
12.2 Curva de calibración de γ -GTP

Se pesaron 13.81 mg de p-nitroanilina y se aforaron a 250 mL con ácido acético 1.5 M para preparar la disolución 1 presentada en la Tabla 6, en ésta se especifica la cantidad de agua destilada y disolución 1 añadidas a cada tubo de reacción.

Tubo	Disolución 1 (μ L)	H ₂ O (μ L)	Producto (nmoles/mL)	Producto (μ moles/mL)
1	50	1950	10	0.01
2	100	1900	20	0.02
3	150	1850	30	0.03
4	250	1750	50	0.05
5	375	1625	75	0.75
6	500	1500	100	0.10
7	750	1250	150	0.15
8	1000	1000	200	0.20

Después de adicionar las disoluciones los tubos se agitaron por inversión y las absorbancias se leyeron a 410 nm en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1201.

De manera análoga a la curva estándar de FA, para este caso se obtuvo una ecuación de la forma $y = mx + b$ para conocer la concentración de producto obtenido y dicho valor se empleó para reportar la actividad enzimática como μ mol/Lmin.



Gráfica 16. Curva de calibración de γ -GTP.

12.3 Curva de calibración de ALT

En la Tabla 7 se indican los reactivos y cantidades empleadas para preparar los distintos puntos de la curva estándar de calibración. Cada punto (concentración conocida de producto) se realizó por duplicado.

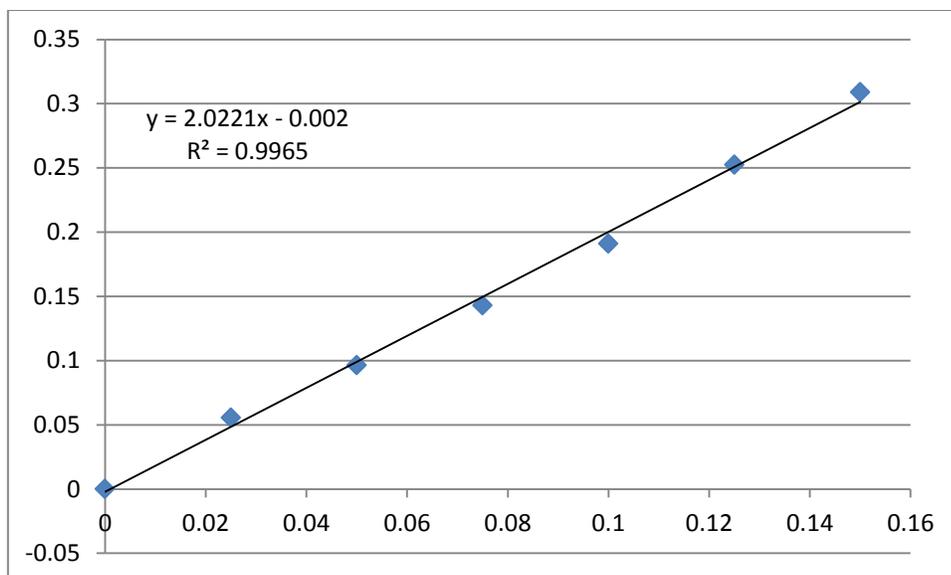
A continuación se describe la preparación de los reactivos utilizados.

- ❖ **Buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.4:** Se mezclaron 840 mL de disolución 0.1 M de fosfato disódico con 160 mL de disolución 0.1 M de fosfato monopotásico.
- ❖ **Disolución de sustrato:** Se disolvieron 1.78 g de D/L alanina y 30 mg de ácido α -oxoglutarico en disolución buffer y se añadieron 0.5 mL de hidróxido de sodio 1 N. La disolución se aforó a 100 mL con disolución buffer. Una vez utilizado el sustrato se conservó a 4 °C hasta su siguiente uso.
- ❖ **Disolución estándar de piruvato (1 μ mol/mL):** la disolución se preparó el mismo día en que fue utilizada, el volumen restante fue desechado. Para prepararla se pesaron 11 mg de piruvato sódico y se mezclaron con 100 mL de disolución buffer.
- ❖ **Reactivo Cromógeno:** Se agregaron 200 mg de 2,4 dinitrofenilhidrazina a HCl 1 N caliente hasta disolverse. Finalmente la disolución se aforó a un litro con HCl 1 N.

Reactivos	Número de tubo						
	1	2	3	4	5	6	7
Disolución sustrato (μ L)	250	225	200	175	150	125	100
Disolución estándar de piruvato (μ L)	----	25	50	75	100	125	150
Buffer de fosfatos (μ L)	50	50	50	50	50	50	50
Reactivo cromógeno (μ L)	250	250	250	250	250	250	250
NaOH 0.4 N (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Piruvato (μ moles)	----	0.025	0.05	0.075	0.1	0.125	0.150

Después de adicionar los reactivos referidos en la Tabla 7 los tubos se mezclaron vigorosamente y se procedió a la lectura de absorbancias a 515 nm en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1201.

A partir de los valores de concentración y absorbancia se construyó la curva de calibración y se obtuvo la ecuación de la recta del tipo $y = mx + b$. Con base en los datos de la ecuación, se calcularon las concentraciones (valor de x en la ecuación) a partir de las absorbancias obtenidas para las muestras de plasma.



Gráfica 17. Curva de calibración de ALT

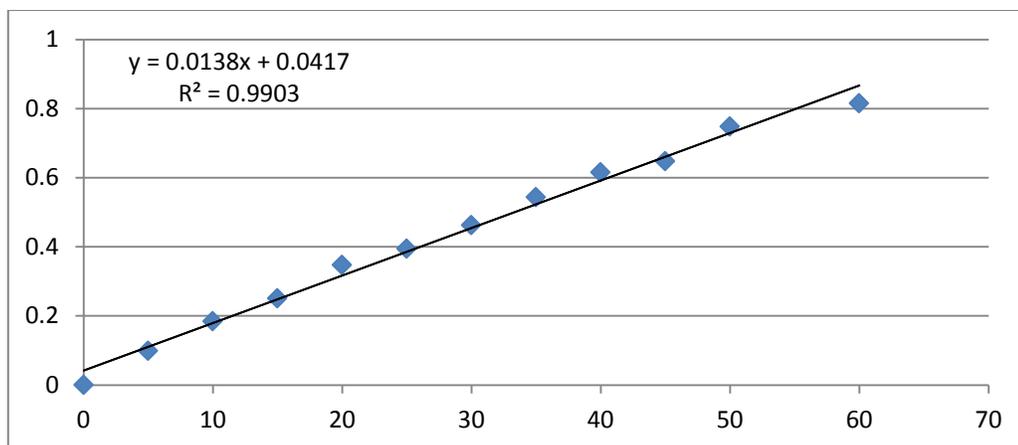
12.4 Proteínas

Se pesaron 10 mg de albúmina sérica bovina y se aforaron a 10 mL con agua tridestilada para preparar la a una concentración de 1 mg/mL. En la Tabla 8 se especifica la cantidad de agua destilada, albúmina y reactivo de Bradford añadidos a cada tubo para llevar a cabo la reacción.

Tubo	Albúmina sérica bovina (µL)	H ₂ O (µL)	Reactivo de Bradford (mL)
1	0	100	2.4
2	5	95	2.4
3	10	90	2.4
4	15	85	2.4
5	20	80	2.4
6	25	75	2.4
7	30	70	2.4
8	35	65	2.4
9	40	60	2.4
10	45	55	2.4
11	50	50	2.4
12	60	40	2.4

Los tubos se agitaron por inversión y a partir de las absorbancias obtenidas a 595 nm en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1201 y la concentración conocida de proteínas presentada en la Tabla 8 se calculó la ecuación de la recta.

De manera análoga a las determinaciones de actividad enzimática, los valores de la pendiente, ordenada al origen y las absorbancias para cada muestra (**m**, **b** e **y**, respectivamente), se calculó el valor de concentración de proteínas en los homogenados de hígado.



Gráfica 18. Curva de calibración de proteínas.

12.5 GSH

A continuación se describe la preparación de las disoluciones empleadas para elaborar la curva de calibración.

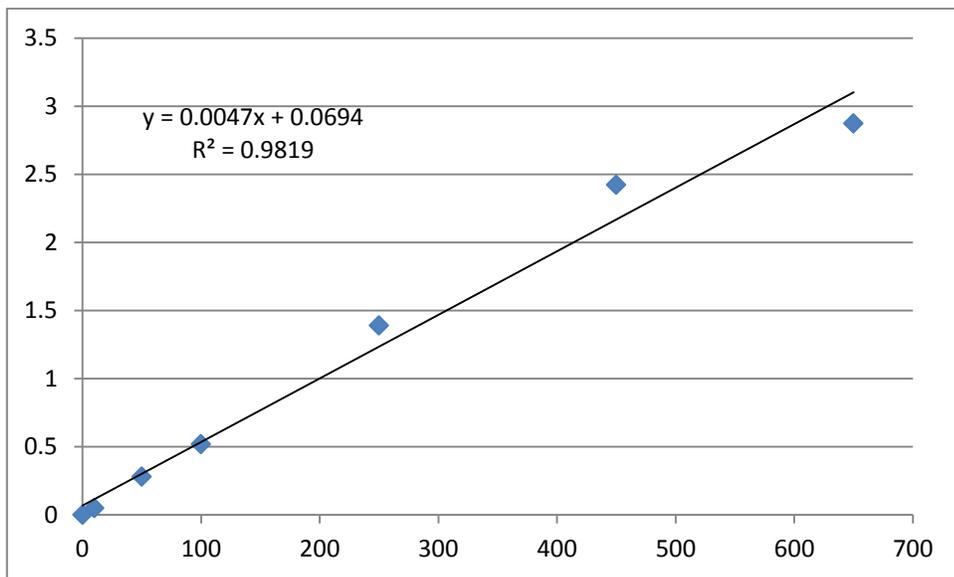
- ❖ **Disolución patrón de glutatión reducido (1 nmol/mL):** se disolvieron 30.733 mg de GSH con disolución de fosfatos 0.3 M hasta completar un volumen de 100 mL.
- ❖ **Disolución de fosfatos:** 42.6 g de Na_2HPO_4 se disolvieron con agua destilada. La disolución se aforó a 1 L, para obtener una concentración final de 0.3 M.
- ❖ **Reactivo de Ellman:** se pesaron 40 mg de ácido 5,5'-ditiobis nitrobenzoico (DTNB) y se disolvieron con 100 mL de una disolución de citrato de sodio al 1%

La Tabla 9 muestra las cantidades añadidas de cada una de las disoluciones a fin de obtener distintas concentraciones del producto de la reacción.

Tubo	Disolución patrón de GSH (μL)	Disolución de fosfatos (Na_2HPO_4) (mL)	Reactivo de Ellman (DTNB) (mL)	GSH (nmol)
1	0	2.2	0.25	0
2	10	2.19	0.25	10
3	50	2.15	0.25	50
4	100	2.10	0.25	100
5	250	1.95	0.25	250
6	450	1.75	0.25	450
7	650	1.55	0.25	650

Los tubos se agitaron por inversión y a partir de las absorbancias obtenidas a 412 nm en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1201 y la concentración conocida de GSH presentada en la Tabla 9 se calculó la ecuación de la recta.

De manera análoga a las determinaciones de actividad enzimática, los valores de la pendiente, ordenada al origen y las absorbancias para cada muestra (**m**, **b** e **y**, respectivamente), se calculó el valor de concentración de GSH en los homogenados de hígado.



Gráfica 19. Curva de calibración de GSH.

12.6 Colágena (HP)

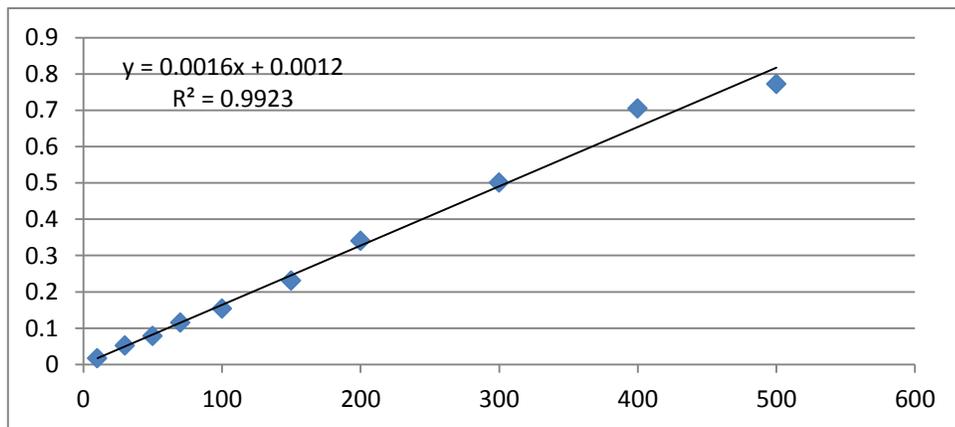
Disolución estándar de HP: se pesaron 10 mg (76.26 μmol) de HP y se llevaron a un volumen de 76.26 mL con agua destilada para obtener una disolución de 1 $\mu\text{mol/mL}$ equivalente a 1nmol/ μL .

Utilizando la disolución estándar se preparó una serie de 10 tubos con distintas concentraciones de HP presentadas en la Tabla 9.

Tubo	Disolución HP (μL)	H ₂ O (mL)	HP (nmoles)
1	----	2.00	0
2	10	1.99	10
3	30	1.97	20
4	50	1.95	50
5	70	1.93	70
6	100	1.90	100
7	150	1.85	150
8	200	1.80	200
9	300	1.70	300
10	400	1.60	400
11	500	1.50	500

A cada tubo se le agregó 1 mL de cloramina T y se dejaron reposar 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se agregaron 0.5 mL de tiosulfato de sodio 2 M, 1 mL de NaOH 1 N, aproximadamente 2 g de NaCl y se agitó inmediatamente para detener la reacción. Posteriormente se agregaron 6 mL de tolueno, se agitaron durante 1 minuto, se extrajo la capa de tolueno y la fase acuosa se sometió a ebullición en baño maría durante 20 minutos. Después de enfriar los tubos, se les adicionaron 6 mL de tolueno y se agitaron durante 1 minuto. Finalmente de la fase orgánica se tomaron alícuotas de 1 mL por duplicado, se les agregaron 4 mL del reactivo de Ehrlich se agitaron fuertemente y se dejó desarrollar la reacción a temperatura ambiente por 30 minutos. Las absorbancias se leyeron en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1201 560 nm.

Para cada valor de concentración correspondió uno de absorbancia, lo que permitió calcular la ecuación de tipo lineal $y = mx + b$. Con dicha ecuación y considerando los valores de m y b como constantes, se calculó la concentración de HP (valor de x) de acuerdo a las absorbancias (valor de y) de cada una de las muestras de hígado.



Gráfica 20. Curva de calibración de HP.