



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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**“EVALUACIÓN DE LOS POSIBLES EFECTOS
HEPATOPROTECTORES
DE LA NARINGENINA EN UN DAÑO HEPÁTICO EXPERIMENTAL”**

Tesis que presenta:

Q.F.B. Erika Hernández Aquino

Para Obtener el Grado de:

Maestra en Ciencias con la Especialidad en Farmacología

Director de Tesis: Dr. Pablo Muriel de la Torre

Este 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 Dr. Pablo Muriel de la Torre.

Se contó además con una beca del CONACYT para estudios de posgrado con clave de registro: **270345**.

Dedicatorias

Dedico este trabajo y todo lo que él representa a todas y cada una de las personas que a lo largo de dos años y medio han contribuido de alguna manera a que mi formación profesional dentro de la Maestría en Ciencia llegara a su fin satisfactoriamente.

A Dios:

Dios todo poderoso, gracias por haberme dado la fuerza para poder llegar hasta el final de esta gran empresa. Por haber iluminado mi camino cuando más lo necesitaba y haber cuidado de mí y mis padres mientras estaba fuera de casa, por haberme dado entendimiento, sabiduría y confianza.

Por haber creado al ser humano con la inquietud para conocer lo que pasa a su alrededor y por tanto para querer descubrir lo porqués de los fenómenos naturales y sociales. Las cuestiones biológicas como la transcripción de proteínas, la formación de un nuevo ser en el vientre materno, el mecanismo de acción de los fármacos, la unión de una enzima con su sustrato son mecanismos tan perfectos que solo puedo pensar que fueron pensadas por un ser superior como tú.

Como te dije en la licenciatura:

¡Gracias por ser tú el arquitecto de toda la materia del Universo y sobre todo por ser el mejor Químico!

A mis padres:

Porque sin ellos no existiría, por darme la vida. Gracias por todos sus consejos, regaños, alegrías, enojos, peleas y discusiones que hayamos podido tener, porque todo eso enriquece mi formación. Por haberme enseñado que la responsabilidad y la disciplina son las mejores herramientas que pueda tener para desempeñarme bien en cualquier lugar.

Por darme la mejor herencia de todas, el estudio y el conocimiento, porque eso nadie me lo puede quitar y sin embargo siempre se debe seguir estudiando para perfeccionar las habilidades que se adquieren con el tiempo.

Gracias por tenido paciencia durante todo este tiempo, por esperarme, preocuparse y sobre todo por soportarme durante 25 años y los que nos faltan.

A mis amigos:

Por haber hecho que abriera mis horizontes a nuevas experiencias, gracias por todos los momentos de trabajo en equipo tratando de entender los artículos, explicándonos entre todos lo que el autor quiso decir, de las horas que pasamos en la biblioteca cuando estábamos en el propedéutico, jaja los chistes ñoños de Ari y Lalo y los no bueno de Caro =p. Gracias por todos los momentos divertidos que pasamos recorriendo la Ciudad Bobox y Killiam. Por las laaargas muuuy laaaargas pláticas con Esme y Liliana. Marco, Carla y Lalo sus pláticas son muy chistosas =p jiji. Y las ocurrencias de Víctor y Sendy también. Aaaa recuerdo a Daniela, Julia y Lety ojalá hubieran seguido con nosotros, las extraño. Tomando en cuenta que cada quién tomará caminos diferentes, estoy pensando seriamente abrir un Facebook =(Espero que algún día nos volvamos a reunir.

Agradecimientos:

Al Dr. Pablo Muriel de la Torre: Por el gran apoyo que recibido de su parte, además de la confianza que ha puesto en mí para estar en su equipo de trabajo. Gracias por sus consejos, correcciones y enseñanzas en general.

A mis sinodales Dra. Liliána Favari Perozzi y Dr. Víctor K. Tsutsumi Fujiyoshi: Agradezco mucho su apoyo en la realización de este trabajo ya que siempre estuvieron dispuestos a compartir sus conocimientos, a dar consejos y críticas constructivas y objetivas.

A la Lic. en Fnf. Rosa Elena Flores Beltrán, Sr. Benjamín Salinas Hernández, Sr. Luis Ramón Hernández Guadarrama, y Hidrobiol. Teresa García Camacho: Por su excelente apoyo técnico para la realización de este trabajo, por hacer muy amena mi estancia en el laboratorio y por sus consejos de todo tipo.

A la Q.F.B. Silvia Galindo: Por su gran apoyo en una parte muy importante de este trabajo y por brindarme sus explicaciones en materia de tinciones.

Al M.V.Z. Ricardo Gaxiola Centeno, M.V.Z. Benjamín E. Chávez Álvarez y al M.V.Z. Rafael Leyva Muñoz: Por su trabajo de apoyo técnico en la UPEAL, ya que sin los cuidados que les brindan a los animales de experimentación, ellos no estarían en óptimas condiciones.

A la Nutrióloga Erika Ramos Tobar, I. F. Juan de Dios Rodríguez Callejas, I.F. Adrián Monsalvo Villegas, I.B.Q. Luis Francisco Vázquez Flores, Q.F.B. Sael Casas Grajales y al M. en C. Jonathan Arauz: Por haber hecho mi estancia en el laboratorio muy divertida, porque han sabido ser muy buenos amigos y compañeros. Por ser muy divertidos y simpáticos, los quiero mucho.

Erika Hernández Aquino

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE GRÁFICOS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUCCIÓN	9
1.1 El Hígado	9
1.1.1 Anatomía del hígado	9
1.1.2 Fisiología del hígado	10
1.2 Enfermedades Hepáticas	12
1.2.1 Fibrosis	12
1.2.2 Cirrosis	17
1.3 Modelos de Daño Hepático	19
1.3.1 Tetracloruro de Carbono (CCl ₄)	20
1.4 Naringenina	22
1.4.1 Flavonoides	22
1.4.2 Naringenina, un posible flavonoide hepatoprotector	23
2 JUSTIFICACIÓN	28
3 HIPÓTESIS	29
4 OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo General	30
4.2 Objetivos Particulares	30
5 MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1 Material Biológico	31
5.2 Reactivos	31
5.3 Diseño Experimental	31
5.4 Determinación de los Marcadores de Daño Hepático	34
5.4.1 Alanino Aminotransferasa	34
5.4.2 Fosfatasa Alcalina	35

5.4.3 Gama-glutamyl transpeptidasa	36
5.4.5 Peroxidación lipídica	37
5.4.5.1 Determinación de las proteínas por el método de Bradford	38
5.4.6 Glutación reducido en hígado y sangre	39
5.4.7 Catalasa	40
5.4.8 Superóxido dismutasa	41
5.4.9 Glutación peroxidasa	42
5.4.10 Glucógeno	43
5.4.11 Colágena	42
5.4.12 Histologías	47
5.4.12.1 Tinción eosina y hematoxilina	47
5.4.12.2 Tinción tricrómica de Masson	48
6 RESULTADOS	49
6.1 Actividad Enzimática de la Alanino Aminotransferasa, Fosfatasa Alcalina y Gamma-Glutamil Transpeptidasa	49
6.2 Determinación de la Peroxidación Lipídica	50
6.3 Determinación del Glutación Reducido Hepático y Sanguíneo	51
6.4 Determinación del Contenido de Glucógeno	51
6.5 Determinación del Contenido de Colágena	53
6.6 Actividad Enzimática de la Catalasa, la Glutación Peroxidasa y la Superóxido Dismutasa	53
6.7 Tinción de Hematoxilina y Eosina	54
6.8 Tinción Tricrómica de Masson	54
7 DISCUSIÓN	56
8 CONCLUSIONES	62
9 REFERENCIAS	63

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I. Parámetros farmacocinéticos de la naringenina luego de su ingesta en 8ml/kg de jugo de toronja y jugo de naranja en voluntarios sanos.	25
Tabla II. Parámetros farmacocinéticos de la naringenina y sus metabolitos, la naringenina-sulfato y la naringenina-glucuronido, después de la administración de una dosis de 37 μ mol/kg, vía intravenosa, en ratas.	26
Tabla III. Parámetros farmacocinéticos de la naringenina después de la administración de una dosis única de 135 mg vía oral en voluntarios sanos	26
Tabla IV. Grupos experimentales y dosis en el modelo crónico con CCl ₄ .	31
Tabla V. Disoluciones de CCl ₄ a lo largo de las 8 semanas de tratamiento crónico.	32
Tabla VI. Curva de calibración de alanino aminotransferasa.	35
Tabla VII. Curva estándar de la fosfatasa alcalina.	36
Tabla VIII. Curva de calibración de gamma glutamil transpeptidasa.	37
Tabla IX. Curva de calibración de glutatión reducido en hígado y sangre.	40
Tabla X. Curva estándar de hidroxiprolina	46

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema de un lobulillo.	9
Figura 2. Los hepatocitos apoptóticos inducen la fibrosis hepática	13
Figura 3. Características de las células estrelladas hepáticas activadas.	14
Figura 4. Estructura básica de un flavonoide.	24
Figura 5. Hidrólisis de la naringina a ramnosa, prunina y glucosa y naringenina por la enzima naringinasa.	24
Figura 6. Representación esquemática de la Hipótesis.	29
Figura 7. Marcadores de daño hepático.	33
Figura 8. Tinción hematoxilina-eosina.	55
Figura 9. Tinción tricrómica de Masson.	55

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Página
Gráfica 1. Actividad de la enzima alanino aminotransferasa (ALT).	49
Gráfica 2. Actividad de la fosfatasa alcalina (FA) y gamma-glutamyl transpeptidasa (γ -GTP)	50
Gráfica 3. Grado de la peroxidación lipídica	51
Gráfica 4. Determinación de glutatión reducido (GSH) en hígado y plasma	52
Gráfica 5. Contenido de glucógeno	52
Gráfica 6. Determinación de colágena	53
Gráfica 7. Determinación de catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD).	54

LISTA DE ABREVIATURAS

α - SMA	Alfa actina del músculo liso
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALT	Alanino Aminotransferasa
Ang II	Angiotensina II
ARNm	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
CAT	Catalasa
$\text{CCl}_3\cdot$	Radical libre triclorometilo
$\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$	Radical triclorometilperoxilo
CCl_4	Tetracloruro de carbono
CHCl_3	Cloroformo
CHI_3	Yodoformo
CN	Chalconaringenina
CYP	Citocromo
ECM	Matriz extracelular
FA	Fosfatasa alcalina
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
γ -GTP	Gamma-glutamyl transpeptidasa
HBV	Virus de la hepatitis B
HCV	Virus de la hepatitis C
HSC	Células estelares hepáticas
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
H y E	Hematoxilina eosina
IFN- γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
I.P.	Intraperitoneal
MDA	Malondialdehído
MMP	Metaloproteinasa
NAR	Naringenina
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica
NO	Óxido nítrico
$\text{OH}\cdot$	Radical hidroxilo
$\text{O}_2\cdot^-$	Radical superóxido
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
Th1	Linfocitos T cooperadores tipo 1
Th2	Linfocitos T cooperadores tipo 2
TIMP	Inhibidor de metaloproteinasas
TNF- α	Factor de necrosis tumoral

RESUMEN

Las enfermedades hepáticas, como la fibrosis, son una de las primeras causas de muerte entre la población mexicana. Investigaciones recientes indican que la naringenina (NAR) no sólo actúa como antioxidante en el posible tratamiento de la fibrosis, sino que bloquea puntos de la cascada de señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Por lo tanto se hipotetiza que la NAR puede prevenir la fibrosis en un modelo de daño hepático crónico inducido por CCl₄ gracias a sus efectos antioxidantes y a la inhibición del TGF- β .

Para evaluar los efectos preventivos de la NAR, se utilizaron ratas Wistar machos. Se indujo daño hepático crónico mediante la administración intraperitoneal (I.P.) de tetracloruro de carbono (CCl₄) usando una dosis de 400 mg/kg, 3 veces/semana durante 8 semanas. Para evaluar los posibles efectos hepatoprotectores de la NAR, ésta se administró a una dosis de 100 mg/kg/diario por 8 semanas, (vía oral) VO y al mismo tiempo 400 mg/kg, 3 veces/semana de CCl₄ durante las mismas 8 semanas. Se midieron marcadores hepáticos como la alanino aminotransferasa (ALT), la fosfatasa alcalina (FA), la gama-glutamiltanspeptidasa (γ -GTP), el glutatión reducido GSH, el glucógeno, la colágena, la lipoperoxidación lipídica (PL); así como la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y el glutatión peroxidasa (GPx). Además, se realizaron las tinciones tricrómica y de hematoxilina y eosina (H y E).

Los resultados muestran que la NAR previno el aumento de la actividad enzimática de la ALT, la FA, la γ -GTP; la depleción del GSH y del glutatión así como la producción de la colágena. Por otro lado, en las tres enzimas antioxidantes, no se encontró diferencia significativa entre el grupo de daño y el experimental. En las tinciones histológicas, se observa considerable disminución de la fibrosis y de la producción de colágena. La NAR es capaz de prevenir la necrosis hepática, la colestasis, el estrés oxidativo y la disminución del GSH y del glucógeno, así como el aumento de la síntesis de colágena de forma importante. Finalmente se concluye que la NAR tiene efectos hepatoprotectores en un modelo de daño hepático crónico experimental en ratas Wistar.

ABSTRACT

Liver diseases, like fibrosis, are one of the major causes of death among Mexican population. Recent researches show that naringenin (NAR) not only acts as an antioxidant in the possible treatment of fibrosis, also blocks sites in the signaling pathways of transforming grown factor beta (TGF- β). Therefore, we hypothesize that the NAR can prevent fibrosis in a CCl₄ induced liver damage model since it has antioxidant effects and inhibits TGF- β .

Male Wistar rats were used to evaluate the preventive effects of the NAR. Hepatotoxicity was induced by chronic intraperitoneal (i.p.) administration of carbon tetrachloride (CCl₄) using a dose of 400 mg/kg of body weight, 3 times a week for 8 weeks. To test potential hepatoprotective effects of NAR, it was given 100 mg/kg of body weight /daily for 8 weeks by oral administration (p.o.), at the same time 400 mg/kg of body weight, 3 times a week of CCl₄ were administrated. Alanine aminotransferase (ALAT), alkaline phosphatase (AP), γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP), reduced glutathione (GSH), glycogen, collagen, liver lipid peroxidation, the enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) were assessed. In addition liver histopathologies were made with trichromic and hematoxylin-eosin stains.

Results show that NAR prevented increase of enzymatic activity of ALAT, AP, γ -GTP; GSH and glutathione. Furthermore collagen production was prevented. On the other hand, SOD CAT, GPx, did not show significant difference between “damage” and “experimental” groups. Liver histopathology shows significant decrease in fibrosis and collagen production. NAR prevented hepatic necrosis, cholestasis, oxidative stress, and GSH and glycogen depletion, as well as the increase of collagen synthesis significantly. Finally we conclude that NAR has hepatoprotective effects in a model of liver damage induced by administration of CCl₄.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 El Hígado

1.1.1 Anatomía del hígado

El hígado es la glándula más voluminosa del cuerpo humano y pesa alrededor de 1.4 k en el adulto promedio, está por debajo del diafragma y ocupa la mayor parte del hipocondrio derecho y parte del epigastro en la cavidad abdominal.

El hígado se divide por el ligamento falciforme en dos lóbulos principales: un lóbulo derecho grande y un lóbulo izquierdo más pequeño; éstos están formados por muchas unidades funcionales llamadas lobulillos, que tienen una estructura de seis lados constituida por células epiteliales especializadas, llamadas hepatocitos, organizado en láminas irregulares, ramificadas e interconectadas que rodean a una vena central (Figura 1). Además, el lobulillo hepático contiene capilares muy permeables llamados sinusoides, a través de los cuales circula la sangre. En los sinusoides también están presentes las células reticuloendoteliales (de Kupffer), los fagocitos que destruyen a los eritrocitos y los glóbulos blancos viejos, las bacterias y otros cuerpos extraños del torrente venoso provenientes del tracto gastrointestinal (1).

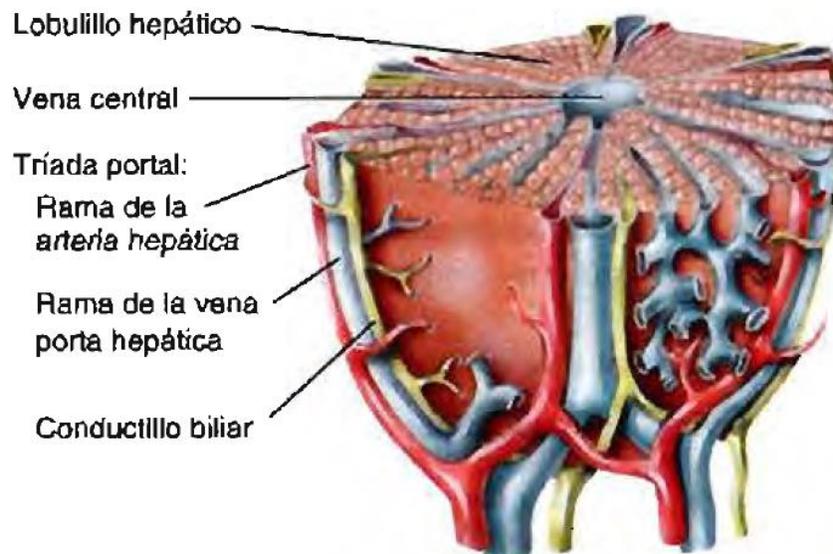


Figura 1. Esquema de un lobulillo. Un lobulillo es la unidad funcional del hígado; consiste en un grupo de hepatocitos dispuestos alrededor de una vena central (1).

Cada célula hepática se encuentra adyacente a los canalículos biliares (2); la bilis que secretan los hepatocitos entra en los canalículos biliares (1) que drenan en los conductos biliares intralobulares y éstos se unen a la vía de los conductos interlobulares para formar los canales hepáticos derecho e izquierdo; éstos se unen a su vez en el exterior del hígado para formar el conducto hepático común. Por otro lado, el canal cístico desemboca en la vesícula biliar; luego, el conducto hepático se une con el canal cístico para formar el colédoco. El colédoco desemboca en el duodeno (2).

El hígado recibe sangre de dos fuentes. De la arteria hepática obtiene sangre oxigenada y por la vena porta recibe sangre desoxigenada que contiene nutrientes, fármacos y posiblemente microorganismos y toxinas del tubo digestivo. Las ramas de la arteria hepática y de la vena porta transportan sangre hacia los sinusoides hepáticos, donde el oxígeno, la mayoría de los nutrientes y algunas sustancias tóxicas son captados por los hepatocitos. Los productos elaborados por los hepatocitos y los nutrientes requeridos por otras células se liberan de nuevo hacia la sangre que drena hacia la vena central y luego fluye hacia la vena hepática. Las ramas de la vena porta, de la arteria hepática y del conducto biliar se acompañan uno a otro en su distribución por el hígado. En conjunto, estas estructuras se llaman triada portal. Las triadas portales se localizan en los ángulos de los lobulillos hepáticos (1).

1.1.2 Fisiología del hígado

Además de secretar bilis, el hígado cumple otras funciones vitales:

Metabolismo de los hidratos de carbono. El hígado es muy importante para mantener los niveles de glucosa en la sangre. Cuando la glucemia es baja, el hígado puede desdoblar el glucógeno en glucosa y liberarla en el torrente sanguíneo. El hígado puede también convertir ciertos aminoácidos y ácido láctico en glucosa y puede convertir otros azúcares como la fructosa y la galactosa en glucosa. Cuando la glucosa es elevada, como ocurre

después de comer, el hígado convierte la glucosa en glucógeno y triglicéridos para almacenarlos (1).

Metabolismo de lípidos. Los hepatocitos almacenan algunos triglicéridos; degradan ácidos grasos para generar adenosín trifosfato (ATP); sintetizan lipoproteínas, que transportan ácidos grasos, triglicéridos y colesterol hacia las células del organismo y desde éstas; sintetizan colesterol, y usan el colesterol para formar sales biliares (1).

Metabolismo proteico. Las principales proteínas sintetizadas por el hígado corresponden a las proteínas de la fase aguda, que son sintetizadas y secretadas en el plasma a consecuencia de estímulos estresantes. Otras consisten en proteínas transportadoras de esteroides y de otras hormonas en el plasma y algunas más corresponden a factores de coagulación (2). Por otro lado, los hepatocitos desaminan los aminoácidos, de manera que puedan utilizarse en la producción de ATP o convertirlos en hidratos de carbono o grasas. El amoníaco resultante, se convierte en un compuesto menos tóxico, la urea, que se excreta por la orina (1).

Procesamiento de fármacos y hormonas. El hígado puede detoxificar sustancias como el alcohol y excretar fármacos. También puede alterar químicamente y excretar a las hormonas tiroideas y esteroideas (1).

Excreción de bilirrubina. La bilirrubina, que deriva del hemo de los eritrocitos viejos, es captada por el hígado desde la sangre y se secreta en la bilis. La mayor parte de la bilis se metaboliza en el intestino delgado por las bacterias y es eliminada en las heces (1).

Almacenamiento de sales biliares. Las sales biliares se utilizan en el intestino delgado para emulsionar y almacenar lípidos (1).

Almacenamiento. Además de glucógeno, el hígado es el sitio primario de almacenamiento de algunas vitaminas (A, B₁₂, D, E y K) y de algunos minerales (hierro y cobre), que se liberan del hígado cuando se requieren en alguna parte del cuerpo (1).

1.2 Enfermedades Hepáticas

1.2.1 Fibrosis

Las complicaciones de las enfermedades hepáticas representan uno de los mayores problemas de salud en la sociedad actual. La fibrosis hepática es la acumulación excesiva de proteínas de la matriz extracelular (ECM) como la colágena.

La fibrosis resulta del daño crónico al hígado en conjunto con la acumulación de proteínas de la ECM, llevando a la formación de cicatrices tisulares, pérdida de la arquitectura tisular, posterior desarrollo de nódulos de hepatocitos de regeneración y fallo del órgano. Independientemente de la causa del daño, la fibrosis representa la consecuencia final de una inflamación hepática crónica (3, 4).

Las principales causas de la fibrosis hepática en los países industrializados incluyen la infección crónica por el virus de la hepatitis B y C (HBV, HCV), el abuso del alcohol y la esteatohepatitis no alcohólica (NASH por sus siglas en inglés) (4).

Se ha observado que cuando se retira el agente dañino, se mejora la fibrosis. Los tratamientos comunes para esta enfermedad están encaminados a suprimir el estímulo inflamatorio, así como a detener el desarrollo de la fibrosis. Sin embargo, el único tratamiento verdadero para esta enfermedad, es el trasplante de hígado, pero la variabilidad, oportunidad y la efectividad a largo plazo son hechos que restringen severamente esta terapia (3).

La fibrosis hepática se inicia por una cascada de eventos que resultan en daño al hepatocito, el reclutamiento de células proinflamatorias en el hígado lesionado y la activación de células productoras de colágena. El daño a los hepatocitos provoca la inflamación y la fibrogénesis en el hígado. Los hepatocitos son más susceptibles que otras células a agentes tóxicos y son las primeras células en activar la muerte celular programada (apoptosis) en respuesta a una lesión.

Los hepatocitos apoptóticos se someten a la fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y forman cuerpos apoptóticos que pueden ser fagocitados por los macrófagos y las

células de Kupffer (Figura 2). La apoptosis se puede dar por dos mecanismos alternativos: la vía mediada por receptor o la vía intrínseca orgánulo-dependiente (5).

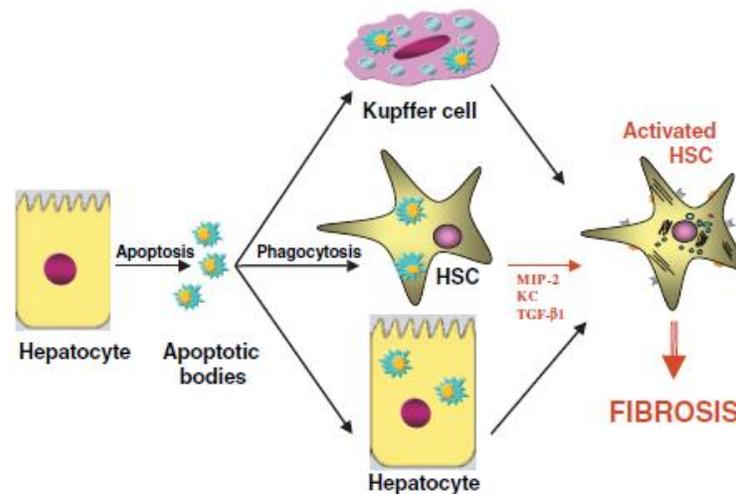


Figura 2. Los hepatocitos apoptóticos inducen la fibrosis hepática. En respuesta a una lesión, los hepatocitos forman cuerpos apoptóticos, que son fagocitados por las células de Kupffer, las células estelares hepáticas o los hepatocitos sanos, posteriormente liberan citosinas profibrogénicas que activan a las células estelares (5).

Los hepatocitos dañados liberan especies reactivas de oxígeno (ROS) y secretan factores profibrogenéticos como quimiocinas que a su vez activan las células estelares hepáticas (HSC) y el reclutamiento de células inflamatorias al sitio de la lesión. Las HSC, en el hígado normal residen en reposo en el espacio de Disse, su principal función es el almacenamiento de retinoides como la vitamina A y de lípidos; en estado quiescente expresan marcadores característicos de adipocitos como PPAR γ , SREBP-1c y leptina (4, 5).

Tras una lesión, las HSC se activan, pierden gotas de lípidos y la capacidad de almacenar la vitamina A, además se transdiferencian en miofibroblastos contráctiles y proliferativos que son los responsables de la secreción de gran parte de la ECM que caracteriza a la fibrosis hepática, secretan citocinas inflamatorias que causan reclutamiento de linfocitos, migran y se acumulan en los sitios de reparación del tejido, donde secretan grandes cantidades de ECM (Figura 3) (3, 4, 5).

Las HSC activadas expresan marcadores miogénicos como la α - actina de músculo liso (α -SMA), c- myb y el factor potenciador de miocitos-2. Mientras que las HSC son el principal tipo de células fibrogénicas en las áreas pericentrales, los miofibroblastos portales pueden predominar cuando la lesión hepática se produce alrededor de los espacios portales (4).

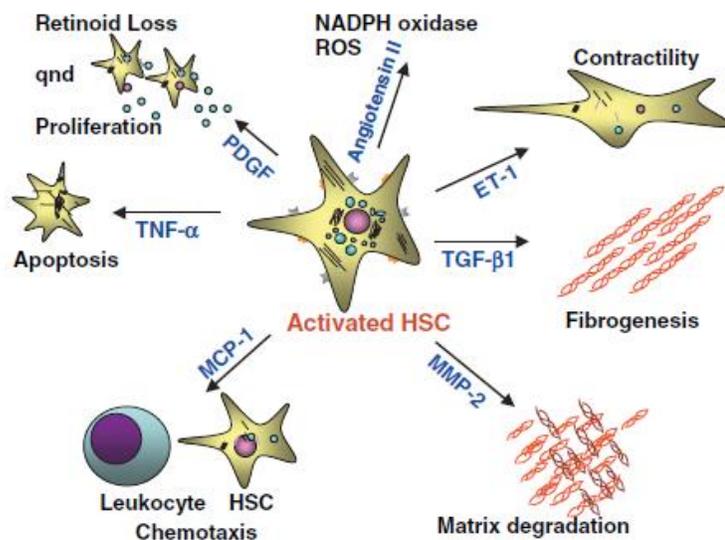


Figura 3. Características de las células estrelladas hepáticas activadas. En respuesta a los estímulos profibrogénicos, las células estrelladas hepáticas activadas obtienen el fenotipo de miofibroblasto (5).

Al ser activadas, las HSC secretan al factor de crecimiento transformante beta ($TGF-\beta$), que exagera el efecto hepatotóxico y aumenta el daño de hepatocitos y la producción de colágena. Además de las células de Kupffer, los hepatocitos sanos y las HSC pueden internalizar y degradar cuerpos apoptóticos. Es importante mencionar que en casos graves de lesión hepática tóxica, metabólica, o por estrés oxidativo, las ROS pueden alcanzar concentraciones críticas e inducir la inflamación y fibrogénesis, incluso en ausencia de hepatocitos significativamente dañados (5).

Uno de los primeros eventos en la fibrosis hepática es la activación de las células inflamatorias residentes y el reclutamiento de células inflamatorias adicionales. Los macrófagos residentes, las células de Kupffer, producen citocinas profibrogénicas como el $TGF-\beta$, el factor de necrosis tumoral ($TNF-\alpha$) y el factor de crecimiento derivado de

plaquetas (PDGF) que junto con el TGF- β es el mitógeno más potente para las HSC y es regulado a la alza en el hígado fibrótico; su inhibición atenúa la fibrogénesis hepática experimental (3, 4, 5).

La señalización de citocinas juega un papel fundamental en la patogénesis de la fibrosis ya que regulan la respuesta inflamatoria hacia el daño, modulando la fibrogénesis hepática in vivo e in vitro. La respuesta inmune dependiente de citocinas es regulada por linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1) y tipo 2 (Th2) que son reclutados. Las células Th1 median la inmunidad celular y secretan interleucina-2 (IL-2), TNF- α e interferón gamma (IFN- γ). Por otro lado, las células Th2, son responsable de la inmunidad humoral, produciendo IL- 4, IL- 6, TGF- β e IL- 10 que tiene efecto antifibrótico. A pesar de su naturaleza Th2, la IL-6 pertenece a las citocinas antifibrogénicas ya que participa en la remodelación tisular debido a la inducción de la transcripción de la metaloproteínasa de matriz-13 (MMP-13) que degrada ECM como todas las MMPs. Por otra parte, el IFN- γ , una citocina Th1 con actividad antifibrogénica, suprime la secreción de la IL-13 y del TGF- β y así, regula negativamente la síntesis de colágena (4, 5).

El TGF - β liberado por las células de Kupffer activadas y las células sinusoidales endoteliales, desencadena la apoptosis de los hepatocitos, induce la activación y el reclutamiento de las células inflamatorias en el hígado lesionado y la diferenciación de las células residentes del hígado en miofibroblastos productores de colágena, tal como pasa con las HCS. A su vez, las HSC activadas pueden secretar al TGF- β , aumentan los hepatocitos dañados y la infiltración de linfocitos. Los hepatocitos no producen TGF- β , pero están implicados en la activación intracelular del TGF- β latente a una forma activa. El TGF- β tiene tres efectos principales en la fibrosis hepática: la activación de las HSC, la estimulación de la síntesis de la ECM y la supresión de la degradación de ECM (5).

En respuesta al TGF- β , las HSC producen colágena tipo I, III y IV, proteoglicanos, glicoproteínas, fibronectina, tenascina y glicosaminoglicanos. La progresión de la fibrosis hepática está asociada con la pérdida de la degradación de la matriz debido a la inhibición de las MMPs y a la regulación positiva de la expresión del inhibidor de las

metaloproteinasas de matriz extracelular-1(TIMP1), efectos que son regulados por el TGF- β ; en consecuencia, el equilibrio entre la acción de las MMPs y sus inhibidores se desplaza hacia éstos, lo que facilita la acumulación de ECM (3, 5).

Por otro lado, el estrés oxidativo en la fibrogénesis hepática incluye los radicales libres: superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^-) y una gran variedad de subproductos de la respiración celular. Estos radicales libres son ROS derivadas del metabolismo del citocromo (CYP) 450 en su isoforma 2E1 (CYP2E1) (5).

La angiotensina II (Ang II) induce la inflamación hepática y estimula una serie de acciones fibrogénicas en las HSC activadas, incluyendo la proliferación y la migración celular, la secreción de citocinas proinflamatorias, la síntesis de colágena y activa al menos, tres vías de señalización que juntas dan como resultado la formación de NADPH oxidasa que en las células fibrogénicas está constitutivamente activa. La enzima NADPH oxidasa presente en las células fibrogénicas, produce ROS como O_2^- y respuestas inflamatorias en las células de Kupffer. Algunos estudios han demostrado que la inhibición de la activación de la NADPH oxidasa resulta en la atenuación de la fibrosis en ratones (4, 5).

Los eventos antes mencionados desencadenan el desarrollo de la fibrosis hepática, pero la inhibición o estimulación de ciertas vías de señalización, puede llegar a prevenir o revertir el desarrollo de dicha patología; por ejemplo, el aumento de la actividad colagenolítica es un mecanismo importante de la resolución de la fibrosis.

La colágena de tipo fibrilar (I y III) es degradada por las MMP- 1, MMP-8 y MMP-13, ya que durante la resolución de la fibrosis, la actividad de MMP aumenta debido a una rápida disminución en la expresión de TIMP-1, lo que produce degradación parcial de la colágena fibrilar, favoreciendo la apoptosis de las HSC llevando a la resolución de la fibrosis. Una disminución de los factores de supervivencia, incluyendo TIMP-1, puede derivar en apoptosis de HSC (4).

Por otro lado, la eliminación del agente causal es la solución más eficaz en el tratamiento contra la fibrosis hepática. Esta estrategia ha demostrado ser efectiva en la mayoría de las

causas de las enfermedades crónicas del hígado. Para los pacientes con cirrosis y sus complicaciones clínicas, el trasplante hepático es el único medio de curación (5).

1.2.2 Cirrosis

La fibrosis hepática progresa rápidamente a la cirrosis en varios entornos clínicos como la hepatitis alcohólica aguda, la hepatitis subfulminante, la colestasis fibrosante y en los pacientes con HCV y HBV. La cirrosis puede ser definida como la consecuencia final de la fibrosis y tiene como resultado la formación de nódulos del parénquima hepático y alteración de la función hepática (4-6).

Las manifestaciones clínicas de la cirrosis varían ampliamente, desde una cirrosis asintomática hasta un fallo hepático, esto es determinado por la naturaleza y severidad de la enfermedad hepática subyacente así como el grado de la fibrosis. En individuos asintomáticos, la cirrosis puede ser descubierta durante un examen de rutina o en la autopsia; en cuanto a la biopsia, ésta es requerida para determinar un diagnóstico antemortem (6).

Más del 40% de los pacientes con cirrosis, son asintomáticos y pueden permanecer así por décadas pero el deterioro progresivo es inevitable, desarrollándose complicaciones como ascitis, hemorragias varicosas, encefalopatías, disfunción hepatocelular y aumento de la resistencia intrahepática. Los pacientes con cirrosis pueden permanecer libres de complicaciones graves durante varios años, es decir, es una cirrosis compensada, mientras que la cirrosis descompensada se asocia con un tiempo de vida corto y el trasplante de hígado se indica a menudo como la única terapia eficaz (4,6).

Una consecuencia potencialmente mortal de la cirrosis es el desarrollo de la hipertensión portal. Estudios en HSC aisladas muestran que tienen un papel muy importante en la hipertensión portal. La activación de las HSC se asocia con la expresión de proteínas intracelulares contráctiles tales como α -SMA, una vez activadas se vuelven sensibles a la

endotelina, un vasoactivador muy potente. Las concentraciones de endotelina aumentan después de la lesión del hígado, promoviendo la contracción de las HSC.

En contraste, la lesión hepática resulta en la reducción del óxido nítrico (NO) derivado de las células endoteliales hepáticas, que antagoniza el efecto de la endotelina. El resultado neto de este desequilibrio es que se estimula la contracción de las HSC, que lleva al aumento en la resistencia intrahepática sinusoidal que contribuye a la hipertensión portal. El descubrimiento de que este proceso es dinámico y puede ser manipulado, ha llevado a la teoría que algún antagonista efectivo de la endotelina podría reducir la hipertensión portal en la cirrosis (7).

La composición molecular de las cicatrices tisulares en la cirrosis es similar, independientemente de la etiología y están formadas por los constituyentes de la ECM: colágena tipo I y III, proteoglicanos y glicoproteínas. Estos componentes de la cicatriz se acumulan por un incremento neto en su deposición en el hígado y no simplemente por un colapso del estroma. La fácil deposición de las moléculas de la matriz en el espacio de Disse forma bandas cirróticas que rodean a los nódulos, haciéndolos más fáciles de ver, esto desencadena la disminución de la función hepática en los pacientes (6).

Existen referencias que indican que la cirrosis puede ser reversible (6, 8), Las observaciones que muestran que la cirrosis puede atravesar por un proceso de regresión una vez que el estímulo fibrogénico se elimina, se explican por los procesos dinámicos de fibrogénesis y fibrólisis.

El papel de las HSC activadas en la fibrogénesis es indiscutible pero otras células también contribuyen, por ejemplo, las células de Kupffer retardan la progresión de la fibrosis temprana, pero la promueven en la fibrosis avanzada. Por otra parte, la regresión de macro a micro cirrosis nodular y su posible reversión depende del grado de ECM (8).

Los factores potenciales que influyen en la reversibilidad de la cirrosis pueden incluir: (1) la duración de la cirrosis, (2) el contenido total de colágena y otras moléculas, lo que podría conducir a una gran masa de cicatriz que es físicamente inaccesible a las enzimas que la

degradan; (3) baja expresión de enzimas que degradan la matriz y la elevación de las proteínas que inhiben su función (6).

Se pueden clasificar los enfoques terapéuticos para la reversión de la fibrosis como primario y secundario. Los métodos primarios se centran en el tratamiento de la enfermedad subyacente, mientras que el enfoque secundario es desarrollar la farmacoterapia que se centra directamente en el mecanismo de la fibrogénesis, independientemente de la etiología de la enfermedad hepática.

El principal obstáculo para el desarrollo de los fármacos antifibróticos ha sido la dificultad de la definición de los criterios de la valoración validados para realizar los ensayos clínicos. La biopsia hepática en humanos, tiene una sensibilidad limitada y significativa variabilidad de la muestra, lo que representa un obstáculo para el diseño del estudio (8).

Por lo anterior, es indispensable la búsqueda de tratamientos que resuelvan el problema de la salud mundial en el que se han convertido la cirrosis y la fibrosis, tanto para su reversión como para la prevención, ya que si se logra revertir dicha enfermedad, se evitará que siga progresando y se mejorará la calidad de vida del paciente.

1.3 Modelos de Daño Hepático

Los modelos de fibrosis experimental pueden ser divididos en tres grupos, cada uno de ellos con ventajas y desventajas. El primer grupo incluye a los modelos que utilizan cultivos celulares de células aisladas de hígados normales o experimentalmente dañados y estudiadas in vitro. Este tipo de modelos facilita el estudio detallado del comportamiento celular y el efecto específico de mediadores, pero en este modelo no se pueden conjuntar todos los eventos que ocurren in vivo, que resultan de la interacción en el microambiente de células que migran y células residentes.

El segundo grupo incluye tejidos humanos tomados de biopsias o de resección hepática. Estudios que involucran este tipo de modelo son esenciales para validar las observaciones

hechas en cultivos celulares y modelos animales, sin embargo, las consideraciones éticas no permiten realizar múltiples biopsias hepáticas tomadas de pacientes para estudios de investigación.

Un tercer tipo de modelo es el que utiliza animales. Los modelos animales son simples pero tienen la gran desventaja de no ser realizados en humanos. Sin embargo, éstos permiten obtener una serie de muestras en el volumen requerido para estudios detallados de células y la patogénesis molecular. Adicionalmente, el desarrollo de herramientas moleculares y ratones genéticamente modificados pueden ser aplicados al estudio mecanístico de la fibrosis (9).

1.3.1 Tetracloruro de Carbono (CCl₄)

Para estudiar el desarrollo de la fibrosis, se utilizan modelos de daño hepático como el del CCl₄ que es ampliamente administrado a diversas especies para evaluar el desarrollo del daño al hígado o la investigación en terapias contra la fibrosis y la cirrosis.

El uso de muchos alcanos halogenados como el CCl₄, cloroformo (CHCl₃) o yodoformo (CHI₃), ha sido prohibido o severamente restringido debido a su toxicidad. Sin embargo, el CCl₄ hoy en día proporciona datos importantes, ya que se usa como modelo para dilucidar mecanismos de acción de los hepatotóxicos, en la fibrosis, la muerte hepatocelular y la carcinogenicidad. El CCl₄ se activa por el CYP2E1, CYP2B1 o CYP2B2, y posiblemente CYP3A. De esta activación, resulta el radical libre triclorometilo (CCl₃[•]). Este radical puede unirse a moléculas celulares como ácidos nucleicos, proteínas o lípidos, afectando los procesos celulares fundamentales, tales como el metabolismo de los lípidos y la esteatosis. Por otro lado, la formación de aductos entre CCl₃[•] y el ADN puede iniciar los procesos que lleven al desarrollo de cáncer hepático.

El CCl₃[•] también puede reaccionar con el oxígeno para formar el radical triclorometilperoxilo (CCl₃OO[•]), una especie altamente reactiva. El CCl₃OO[•] inicia la reacción en cadena de la peroxidación lipídica (PL), ataca y destruye los ácidos grasos

poliinsaturados, en particular los fosfolípidos de membrana. Esto afecta la permeabilidad tanto de la membrana plasmática así como la mitocondrial y la endoplásmica, lo que resulta en la pérdida del calcio celular y la homeostasis, que puede contribuir en gran medida al daño celular subsiguiente. Entre los productos de degradación de los ácidos grasos se encuentran los aldehídos reactivos, que se unen fácilmente a los grupos funcionales de las proteínas y pueden inhibir la actividad enzimática.

Ninguno de estos procesos en sí se considera la causa fundamental por la cual el CCl₄ induce apoptosis o necrosis, sino que es la unión de todos estos procesos lo que logra un desenlace fatal.

A nivel molecular, el CCl₄ activa al TNF- α , NO y TGF- β y los procesos que desencadenan apoptosis y la fibrosis. El TNF- α lleva a la apoptosis, mientras que el TGF- β desencadena la fibrosis. La IL-6, aunque es inducida por el TNF- α , tiene un efecto claramente antiapoptótico, también la IL10 contrarresta la acción de TNF- α (10).

La inducción de la cirrosis por el CCl₄ en ratas parece reproducir muchas características observadas en humanos: hígado altamente nodulado, hipertensión portal y la arquitectura normal es remplazada por nódulos de regeneración, tejido fibrótico y proliferación de los conductos biliares.

La toxicidad del CCl₄ depende de la dosis y la duración de su exposición. A dosis bajas, se producen efectos transitorios como la pérdida de la homeostasis del calcio, la PL, la liberación de citocinas pro y antiinflamatorias y los eventos apoptóticos seguidos de regeneración.

Con dosis altas o un tiempo prolongado de exposición, los efectos son más serios y se desarrolla la descomposición de lípidos, la fibrosis, la cirrosis y el cáncer. Además, la intoxicación aguda con CCl₄ a altas dosis, puede provocar fallo hepático fatal cuando la necrosis hepatocelular excede la capacidad regenerativa del hígado. Dosis extremas de CCl₄

resultan en la toxicidad no específica, incluyendo depresión del sistema nervioso central y fallo respiratorio y muerte (11).

Debido a que el CCl_4 causa fibrosis y cirrosis, es un buen modelo de daño hepático que se puede realizar en animales para estudiar los mecanismos por los que se desarrollan dichas patologías, además para desarrollar terapias que lleven a la prevención y a la reversión de éstas enfermedades hepáticas que se encuentran dentro de las primeras causas de muerte entre la población nacional y mundial.

1.4 Naringenina

1.4.1 Flavonoides

Los flavonoides son un gran grupo de componentes fenólicos de las plantas y son constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Hasta la fecha, más de 6,000 flavonoides se han identificado. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos que les da su capacidad antioxidante, además tienen propiedades de quelación con el hierro y otros metales de transición. Sin embargo, el mecanismo antioxidante solo es uno de los muchos mecanismos mediante los cuales los flavonoides pueden ejercer sus acciones. Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los OH^\cdot y O_2^\cdot , especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de la PL (12,13).

Los flavonoides se dividen en varios subgrupos y es importante tener en cuenta que las propiedades biológicas y químicas de los flavonoides varían dependiendo del grupo al que pertenecen (12).

Los flavonoides se componen de dos anillos bencénicos (A y B), que están conectados por un anillo de pireno (C) (Figura 4). Los flavonoides que contienen un grupo hidroxilo en la posición C-3 del anillo C se clasifican en 3-hidroxi flavonoides (flavonoles, antocianidinas,

leucoantocianidinas y catequinas) y aquellos que no lo tienen, son 3-desoxiflavonoides (flavanonas y flavonas).

Los flavonoides están presentes principalmente en las plantas como glucósidos y como agliconas (las formas que carecen de los restos de azúcar) que son menos frecuentes. Los restos más comunes de azúcar incluyen D-glucosa y L-ramnosa (12).

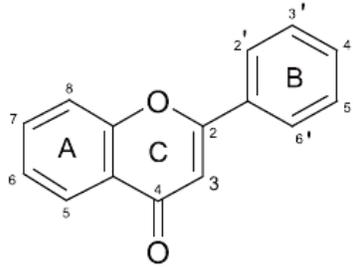


Figura 4. Estructura básica de un flavonoide. Está formada por dos anillos bencénicos (A y B), que están conectados por un anillo de pireno (C) (12).

El metabolismo de los flavonoides es intenso y una parte importante se excretan por la orina. La transformación de los flavonoides tiene lugar en dos localizaciones: en primer lugar en el hígado, por medio de las reacciones de biotransformación de fase I en las que se introducen o exponen grupos polares; en segundo lugar, en el colon mediante reacciones de biotransformación de fase II, en las que los microorganismos degradan los flavonoides no absorbidos. La conjugación con el ácido glucurónico, los sulfatos, o la glicina, parecen tener lugar tanto para los flavonoides como para sus metabolitos procedentes del colon. Los conjugados, solubles en agua, pueden excretarse por la orina (13).

1.4.2 Naringenina, un posible flavonoide hepatoprotector

Como se ha explicado hasta ahora, las ROS están ampliamente ligadas a la fibrosis ya que inducen la PL y daño a los hepatocitos tanto en la clínica como en los modelos experimentales de daño hepático. Como es sabido, los flavonoides tienen propiedades antioxidantes, son de los compuestos más abundantes en la naturaleza y potentes inhibidores de la PL de las membranas biológicas.

Un flavonoide que ha tomado auge en los últimos años es la naringenina (4', 5,7-trihidroxi flavanona, NAR), es la aglicona natural de la naringina (4',5,7-trihidroxi flavanona 7-ramnoglucósido), se encuentra ampliamente distribuida en cítricos, tomates, cerezas y cacao; tiene propiedades antioxidantes que se atribuyen a su relación estructura-actividad, ya que los sustituyentes hidroxilos de la NAR pueden donar hidrógenos a las ROS, permitiéndoles adquirir una estructura estable. Además, este compuesto ha sido ampliamente investigado por sus actividades farmacológicas, incluyendo propiedades antitumorales, antiinflamatorias y hepatoprotectoras (14).

En las plantas, la naringina es hidrolizada a NAR por la enzima naringinasa que es una α -ramnopiranosidasa, que expresa actividad de α -L-ramnosidasa y de β -D-glucosidasa. Primero, la naringina es hidrolizada por la actividad de α -L-ramnosidasa de la naringinasa a ramnosa y prunina (trihidroxi flavanona -7-glucósido) que a su vez puede ser hidrolizada en glucosa y NAR (4', 5,7'-trihidroxi flavanona) por el componente de la β -D-glucosidasa de naringinasa (Figura 5). La naringina tiene un sabor amargo y la NAR es insípida y éstas son las responsables de darle un sabor amargo al jugo de cítricos (15).

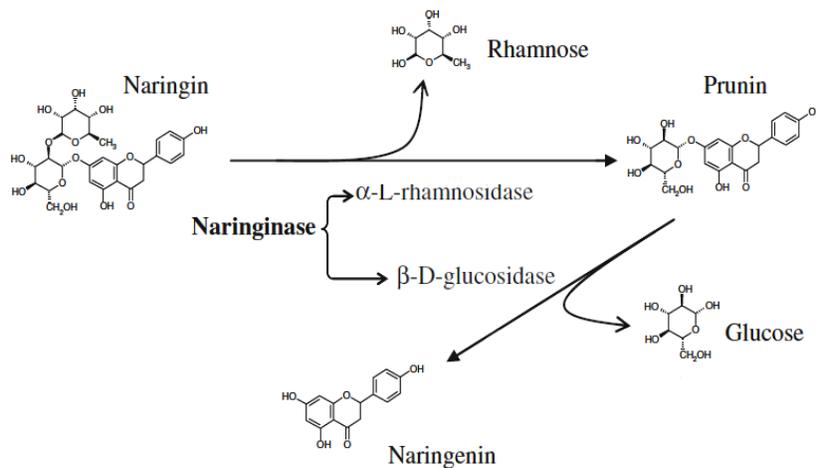


Figura 5. Hidrólisis de la naringina a ramnosa, prunina y glucosa y naringenina por la enzima naringinasa (15).

Es importante no confundir a la NAR con la chalconaringenina (CN), ésta pertenece a una clase de flavonoides conocidos como chalconas. La NAR es el primer flavonoide derivado de la CN por la chalcona isomerasa y es también un intermediario biosintético clave para las

isoflavonas y una gran variedad de flavonas La CN es un compuesto amarillo pálido, mientras que su isómero, la flavanona NAR, es incolora. La inestabilidad de CN podría ser una de las razones por las que la NAR se ha reportado, en lugar de la CN (16 y 17).

Hasta ahora, la información acerca de la farmacocinética de la NAR es limitada, ya que, a pesar de que se han realizado múltiples estudios para determinarla, éstos no siempre se realizan utilizando a la NAR sino a jugos de frutas donde ésta se encuentra. Por ejemplo, en un estudio del 2000, Erlund, I. *et al*, a voluntarios sanos divididos en dos grupos, se les dio jugo de naranja o jugo de toronja a una dosis de 8 ml / kg. Se recogieron once muestras de sangre y orina entre las 0 y 24 h después de la administración del jugo y la NAR se midió por HPLC, obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla 1 (18).

Tabla I. Parámetros farmacocinéticos de la naringenina luego de la ingesta de 8ml/kg de jugo de toronja y jugo de naranja en voluntarios sanos (18).

	Naringenin	
	Grapefruit juice	Orange juice
Ingested dose of flavanone		
μmol	731 \pm 155	85 \pm 7
mg	199 \pm 42	23 \pm 2
AUC ₀₋₂₄		
$\mu\text{mol} \cdot \text{h/L}$	27.7 \pm 26.3	2.6 \pm 1.6
$\mu\text{g} \cdot \text{h/L}$	7534 \pm 7151	719 \pm 437
C _{max}		
$\mu\text{mol/L}$	5.99 \pm 5.36	0.64 \pm 0.40
$\mu\text{g/L}$	1628 \pm 1459	175 \pm 110
T _{max} , h	4.8 \pm 1.1	5.5 \pm 2.9
T _{1/2} , ⁴ h	2.2 \pm 0.1	1.3 \pm 0.6 ^a
Renal clearance, L/h	8.4 \pm 1.5	0.4 \pm 0.2
Total urinary excretion		
μmol	223.0 \pm 180.0	1.1 \pm 0.87
mg	60.78 \pm 48.99	0.29 \pm 0.24
Relative urinary excretion, % of intake	30.2 \pm 25.5	1.1 \pm 0.8

También se han realizado estudios en animales y en humanos para conocer la farmacocinética de la NAR cuando se administra directamente. En un estudio se investigó la farmacocinética de la NAR cuando se administró por vía intravenosa una única dosis de 37 $\mu\text{mol/kg}$. En este estudio, además de estudiar la farmacocinética de la NAR, también se estudiaron sus dos metabolitos, la naringenina-sulfato y la naringenina-glucurónido. (Tabla II) (19).

Tabla II. Parámetros farmacocinéticos de la naringenina y sus metabolitos, la naringenina-sulfato y la naringenina-glucuronido, después de la administración de una dosis de 37 $\mu\text{mol/kg}$, vía intravenosa, en ratas (19).

Parameters	Naringenin	Glucuronides	Sulfates
AUC_{0-720} ($\text{nmol}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$)	333.7 ± 29.5^a	454.9 ± 130.6^a	12024.2 ± 1908.8^b
$T_{1/2}$ (min)	39.5 ± 29.3^a	71.6 ± 19.0^a	255.3 ± 48.7^b
MRT (min)	8.6 ± 1.2^a	38.0 ± 10.4^a	173.4 ± 19.0^b
Cl ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	31.9 ± 4.4	38.3 ± 15.7	2.7 ± 1.8
V (mL)	806.8 ± 286.2^a	2291.0 ± 357.7^b	855.3 ± 479.1^a

En humanos, también se han realizado pruebas, tal es el caso la medición de la farmacocinética de la NAR en voluntarios sanos, tras recibir oralmente 135mg de NAR. Las muestras de sangre fueron colectadas a 14 tiempos diferentes en 12 h y se colectó orina 5 veces en 24 h, los resultados son mostrados en la Tabla III (20).

Tabla III. Parámetros farmacocinéticos de la naringenina después de la administración de una dosis única de 135 mg vía oral en voluntarios sanos (20).

	$AUC_{0-\infty}$ (ng h/ml)	AUC_{0-t} (ng h/ml)	C_{max} (ng/ml)	T_{max} (h)	Cl/F (ml/min)	V/F (l)	$t_{1/2}$ (h)	MRT (h)
<i>Naringenin</i>								
Median	9190.68	8485.63	1937.87	3.50	241.87	47.37	2.23	5.26
Arithmetic mean	9424.52	8841.51	2009.51	3.67	258.57	51.65	2.31	5.52
s.d.	2960.52	2728.57	770.82	0.82	92.51	19.75	0.40	0.94
Minimum	5274.44	5112.34	1124.26	3.00	168.11	33.15	1.73	4.56
Maximum	13194.53	12269.36	3005.20	5.00	420.55	78.89	2.84	7.15
CV (%)	31.41	30.86	38.36	22.27	35.78	38.23	17.54	17.12

Algunos antecedentes que muestran que la NAR podría ser un buen hepatoprotector, muestran que la NAR no sólo reduce la acumulación de ECM, incluyendo colágena I y fibronectina, sino también la producción de Smad3 inducida por TGF- β tanto en ácido ribonucleico mensajero (ARNm) como en los niveles de proteína en la forma dependiente de la dosis. Además, la NAR inhibe selectivamente la transcripción de Smad3, pero no otras Smads involucradas en las vías de señalización del TGF- β 1, esto en el cultivo de células estelares de rata (21).

En otro estudio, al inducir daño hepático con un modelo de intoxicación con cadmio en ratas se observó que la NAR mejoró significativamente las alteraciones histopatológicas y bioquímicas, además la NAR, en el tratamiento concomitante con las vitaminas C y E, tuvo un mejor efecto sobre el daño (22).

Estos datos sugieren que la naringenina podría ser usada en la prevención de la fibrosis hepática inducida por el CCl₄, así como en otros daños inducidos por otros modelos experimentales.

2 JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades hepáticas son una de las primeras causas de muerte entre la población mexicana debido al alto índice de alcoholismo, infecciones por virus de la hepatitis y las obstrucciones colestásicas. Todo ello deriva en una alta frecuencia de pacientes con fibrosis hepática para la cual aún no se tiene un tratamiento adecuado, siendo una de las mejores opciones el trasplante de hígado, pero éste no resulta viable por el escaso número de donadores y problemas de histocompatibilidad.

La fibrosis hepática está estrechamente relacionada con el estrés oxidativo, la generación de ROS y cascadas de señalización que involucran al TGF- β 1. Es sabido que los flavonoides como la NAR presentan características químicas que los hace poderosos antioxidantes. Estudios recientes indican que la naringenina no sólo actúa como antioxidante en el posible tratamiento de la fibrosis sino que también bloquea algunos puntos de las cascadas de señalización como es la del TGF- β 1. Es por ello que se plantea la evaluación de los efectos preventivos de la naringenina en el modelo de daño hepático crónico de CCl₄.

3 HIPÓTESIS

La administración del CCl₄ induce fibrosis y cirrosis por la generación de ROS y la PL, principalmente. La NAR previene la fibrosis en un modelo de daño crónico inducido con CCl₄.

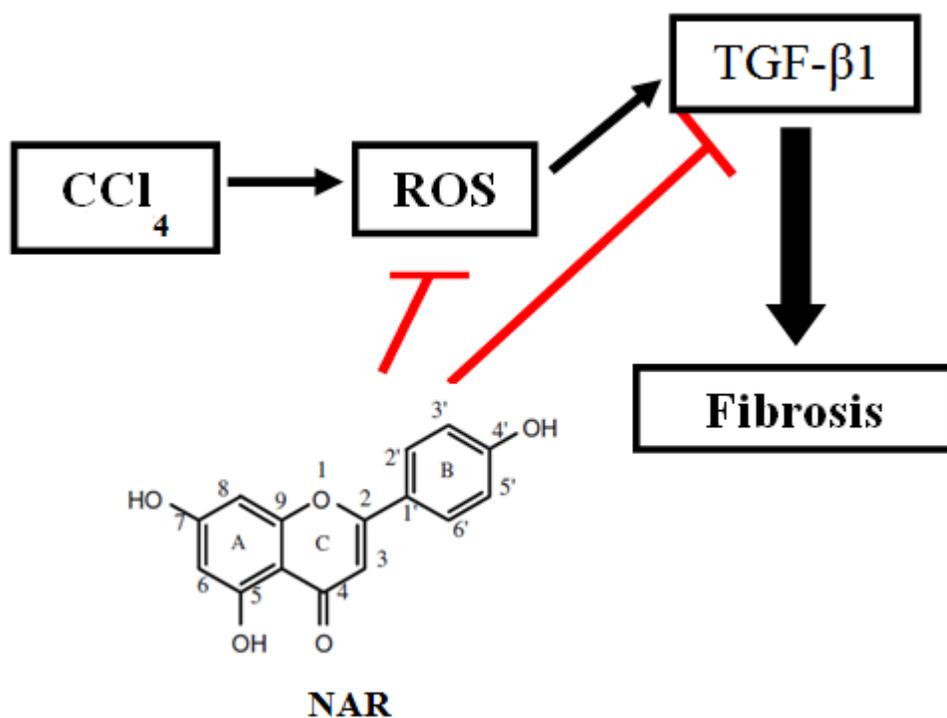


Figura 6. Representación esquemática de la Hipótesis.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluación de los posibles efectos hepatoprotectores de la naringenina utilizando el modelo de daño hepático crónico de CCl₄.

4.2 Objetivos Particulares

- a) Evaluar el efecto antioxidante de la naringenina en el modelo de daño hepático inducido con CCl₄.
- b) Caracterizar el posible efecto antifibrótico de la naringenina por la inhibición del TGF- β 1 en el modelo de daño hepático elegido.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material Biológico

En este trabajo experimental se utilizaron ratas macho Wistar proporcionadas por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN.

Las ratas se mantuvieron bajo condiciones controladas (22 ± 2 °C, humedad relativa del 50-60% y ciclos de 12 h luz-oscuridad). Fueron alimentadas con LABDIET ® FORMULAB DIET y agua *ad libitum*.

5.2 Reactivos

La NAR fue adquirida de SIGMA ALDRICH USA, número de catálogo N5893-25G, \pm Naringenin. El CCl₄ es de J.T Baker, México, número de catálogo 1512 y el petrolato es de la marca High Purity, México D.F. con número de catálogo A 1015.

5.3 Diseño Experimental

Para evaluar los efectos preventivos de la NAR sobre el modelo de daño hepático crónico con CCl₄, se utilizaron 60 ratas Wistar macho con un peso de 120-150 g; las ratas se dividieron en cuatro grupos aleatoriamente y se trataron de acuerdo al siguiente esquema (Tabla IV):

Tabla IV. Grupos experimentales y dosis en el modelo crónico con CCl₄.

Modelo de daño hepático crónico con la administración CCl ₄					
Grupo	Nombre	n	Tratamiento	Dosis	Duración
1	Control	10	-----	-----	8 semanas
2	Daño	20	CCl ₄	400 mg/kg, 3 veces/semana	8 semanas
3	Experimental	20	CCl ₄ + NAR	400 mg/kg, 3 veces/semana + 100 mg/kg/día	8 semanas
4	NAR	10	NAR	50 mg/kg/diaria	8 semanas

Grupo 1: Control, compuesto por 10 ratas a las cuales no se les administró ninguna sustancia. Los datos obtenidos de este grupo fueron tomados como de sujetos sanos. Los resultados de los demás grupos fueron comparados con respecto a este para conocer si había o no diferencia significativa en la situación de daño, así como para saber si el tratamiento preventivo estaba surtiendo efecto y para evaluar si la NAR, por sí sola, causa modificaciones en los marcadores hepáticos.

Grupo 2: Daño, a este grupo formado por 20 ratas, se les administró CCl₄ a una dosis de 400 mg/kg, I.P., 3 veces/semana por 8 semanas. Cabe señalar que durante las 8 semanas de tratamiento con CCl₄ se realizaron diferentes disoluciones del CCl₄ dependiendo de la semana en la que se encontraba el tratamiento (Tabla V). Este método ya se ha estandarizado y ha probado su efectividad para alcanzar las concentraciones necesarias de CCl₄ por semana y que se logre el efecto de daño deseado. Posteriormente, de cada disolución se tomaron 0.25 ml para ser dados a cada rata I.P. El vehículo utilizado para administrar el CCl₄ fue petrolato; éste no induce cambios en los marcadores hepáticos (23,24), por esto y por cuestiones bioéticas no se formó un grupo al que se le administrara solamente petrolato.

Tabla V. Disoluciones de CCl₄ a lo largo de las 8 semanas de tratamiento crónico.

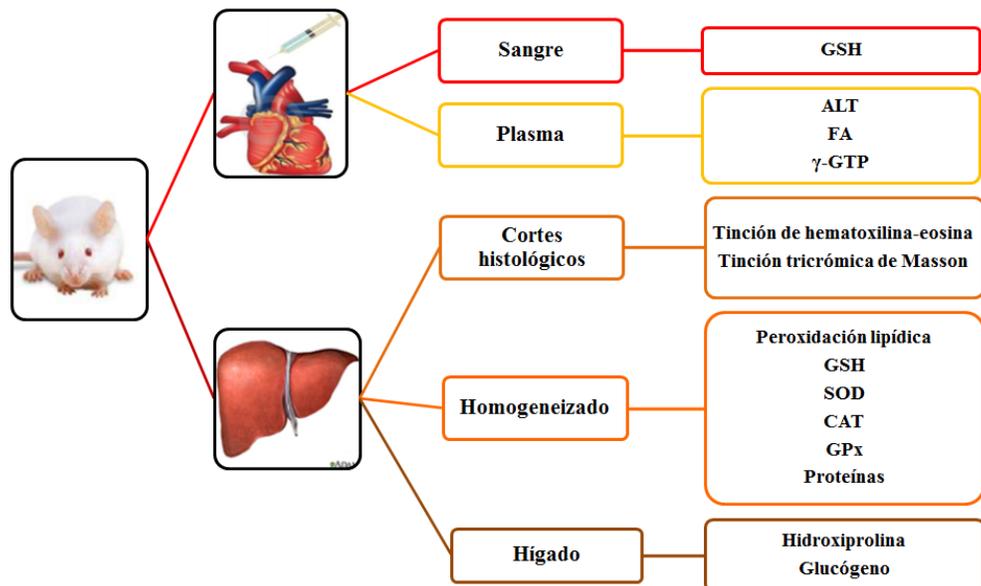
Semana	Partes de CCl ₄	Partes de petrolato	Proporción
1 ^a	1	7	1:7
2 ^a	1	6	1:6
3 ^a	1	5	1:5
4 ^a	1	4	1:4
5 ^a	1	3	1:3
6 ^a	1	3	1:3
7 ^a	1	3	1:3
8 ^a	1	3	1:3

Grupo 3: Experimental, a 20 ratas se les administró el CCl₄ y al mismo tiempo la sustancia preventiva NAR a una dosis de 100 mg/kg/día VO en forma de suspensión en agua como vehículo y se tomó 1 ml de la suspensión para cada rata. El daño se indujo de la misma forma que en el grupo 4. La administración simultánea de CCl₄ y NAR fue de 8 semanas.

Por cuestiones bioéticas, no se formó un grupo control para el vehículo de la NAR, ya que éste es agua y no causa alteraciones hepáticas o de algún otro tipo.

Grupo 4: NAR, se administraron 10 ratas con NAR utilizando una dosis de 100 mg/kg/día VO en forma de suspensión con agua y se tomó 1 ml de la suspensión para cada rata. La administración duró 8 semanas.

Una vez que el periodo de tratamiento para cada grupo terminó y después de las 72 h, los animales se sacrificaron para obtener el hígado y muestras de sangre por punción cardiaca. En sangre, plasma e hígado se determinaron los marcadores de daño hepático glutatión reducido (GSH), las actividades enzimáticas de la alanino aminotransferasa (ALT), la fosfatasa alcalina (FA) y la gama-glutamiltanspeptidasa (γ -GTP). Por otro lado se cuantificaron las proteínas y la PL a través del malondialdehído (MDA), también la actividad de las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx). Además se cuantificó la colágena, el glucógeno y se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina (H y E) y la tinción tricrómica de Masson (Figura 7).



Figura

7. Marcadores de daño hepático. Glutatión reducido (GSH), alanino aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (FA), gama-glutamiltanspeptidasa (γ -GTP), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx).

5.4 Determinación de los Marcadores de Daño Hepático

5.4.1 Alanino Aminotransferasa

Para determinar la actividad enzimática de la ALT en plasma sanguíneo, se siguió la siguiente técnica (25):

Se rotularon tubos de ensayo de 15 x 75 mm, dos para cada muestra a analizar ya que se realizan por duplicado, además se debe incluir un tercer tubo de ensayo para hacer un blanco para cada muestra. Finalmente, se realiza lo indicado a continuación:

	BLANCO (ml)	PROBLEMA (ml)
1.- Solución de sustrato	0.25	0.25
2.- Plasma problema	-----	0.05
3.- Mezclar y agitar suavemente e incubar a 37 ° C durante 60 minutos en un baño maría		
4.- Reactivo cromógeno	0.25	0.25
5.- Plasma problema	0.05	-----
6.- Incubar a 37 ° C durante 15 minutos		
7.- Adicionar NaOH 0.4 N.	2.50	2.50
8.- Se lee la absorbancia a 515 nm.		

Curva de calibración de la alanino aminotransferasa.

Se preparan los siguientes reactivos:

Buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.4: Se mezclan 840 ml de solución 0.1 M de fosfato disódico con 160 ml de la solución 0.1 M de fosfato monopotásico.

Solución de sustrato: Se disuelven 1.78 g de D/l alanina y 30 mg de ácido alfaoxoglutarico en solución buffer; se añade 0.5 ml de hidróxido de sodio 1 N y se completa a 100 ml con solución buffer. Se conserva a 4 °C.

Reactivo Cromógeno: Se disuelven 200 mg de 2,4 dinitrofenilhidrazina en ácido clorhídrico 1N caliente y se completa hasta un litro con HCl 1N.

Solución estándar de piruvato: (1 $\mu\text{mol/ml}$) se disuelven 11 mg de piruvato sódico en 100 ml de solución buffer. Se prepara el mismo día que se utiliza.

La curva de calibración se realiza como se indica en la Tabla VI:

Tabla VI. Curva de calibración de alanino aminotransferasa.

Reactivos	No. de tubo						
	1	2	3	4	5	6	7
Solución sustrato (μl)	250	225	200	175	150	125	100
Solución estándar de piruvato (μl)	----	25	50	75	100	125	150
Buffer de fosfatos (μl)	50	50	50	50	50	50	50
Reactivo cromógeno (μl)	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 (μmoles)	----	0.025	0.05	0.075	0.1	0.125	0.150

Se lee la absorbancia de cada muestra a 515 nm.

5.4.2 Fosfatasa Alcalina

Se determina la actividad enzimática de la FA en el plasma sanguíneo. Los ensayos se realizan por duplicado y con un blanco, siguiendo la siguiente técnica (26):

1.- A cada tubo se le adicionan:

0.25 ml de buffer de glicina 0.1 M y de MgCl_2 1 mM, pH 10.5.

0.25 ml del sustrato p-nitrofenilfosfato.

2.- Se colocan los tubos en baño maría a 37 ° C por 5 minutos.

3.- Se añaden 50 μl de la muestra y mezclar suavemente.

4.- Se incuba a 30 minutos a 37 ° C.

5.- Se para la reacción con 5 ml de NaOH 0.02 N y se agita por inversión.

Se leen las absorbancias a 410 nm en un espectrofotómetro.

Nota: El blanco es idéntico pero se coloca 50 μL de agua en lugar de la muestra.

Curva estándar para la fosfatasa alcalina

Para realizar la curva estándar de calibración, se preparan las siguientes soluciones:

1. p-nitrofenol sol. st. de 10 μ moles/ml.
2. 0.5 mL de solución 1 (st. de p-nitrofenol) se llevan a 100 ml con NaOH 0.02 N.
3. NaOH 0.02 N.

Nota: El blanco se realiza con 5.5 ml de la solución 3 y se leen las absorbancias a 410 nm.

Se siguen la Tabla VII para realizar la curva de calibración:

Tabla VII. Curva estándar de la fosfatasa alcalina.

CURVA ESTÁNDAR PARA LA FOSFATASA ALCALINA			
TUBO	Solución 2 (ml)	Solución 3 (ml)	Sustrato hidrolizado (μ moles)
1	0.5	5	0.025
2	1.0	4.5	0.050
3	2.0	3.5	0.10
4	3.0	2.5	0.15
5	4.0	1.5	0.20
6	5.0	0.5	0.25

Se lee la absorbancia de las muestras a 410 nm.

5.4.3 Gama-glutamyl transpeptidasa

Se rotulan tubos de ensayo de 15 x75 mm por duplicado más un blanco de reacción y se sigue la siguiente técnica (27).

1.- En cada tubo se adiciona:

400 μ l de Tris-HCl 200 mM, pH 8.2

100 μ l de $MgCl_2$ 200 mM

100 μ l de Glicil-glicina 40 mM, pH 8.2.

200 μ l de Gamma-glutamyl-p-nitroanilida 10 mM

2.- Previa incubación durante 10 minutos a 37°C, se inicia la reacción con 200 µl de plasma.

3.- Se incuba a 37°C por 30 minutos y se detiene la reacción con 2 ml de ácido acético 1.5M.

4.- Se lee la absorbancia a 410 nm y se cuantifica la p-nitroanilina producida mediante la curva estándar.

Nota: Se hace un blanco sustituyendo los 200 µL de plasma por agua.

Curva estándar de gamma-glutamyl transpeptidasa

Solución 1: Se pesan 13.81 mg de p-nitroanilina y se llevan a 250 ml con ácido acético 1.5M.

La curva de calibración se realiza como se indica en la Tabla VIII:

Tabla VIII.- Curva de calibración de gamma glutamil transpeptidasa.

TUBO No.	SOLUCIÓN 1 (µl)	H₂O (µl)	nmoles/ml	µmoles/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	0.075
6	500	1500	100	0.1
7	750	1250	150	0.15
8	1000	1000	200	0.20

Se lee la absorbancia a 410 nm.

5.4.5 Peroxidación lipídica

Para realizar esta técnica (28) se utilizaron los siguientes reactivos:

Tris HCl 150 mM, pH=7.4

Ácido tricloroacético (TCA) al 15%.

Ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.375% p/v en TCA al 15% (se prepara en el momento).

Procedimiento:

1. Se pesan 0.5 g de hígado.
2. Se homogeneiza el hígado en 5 ml de agua.
3. Se toman 300 μ l del homogeneizado de hígado al 10% y se agregan 700 μ l de Tris-HCl 150mM pH 7.4 para completar 1 ml.
4. Se agregan 2 ml de TBA al 0.375% disuelto en TCA al 15 %.
5. Se pone a ebullición por 45 minutos.
6. Se centrifuga a 3000 rpm por 10 minutos y se lee el sobrenadante a 532 nm.
7. Se determinan las proteínas del homogeneizado.

5.4.5.1 Determinación de las proteínas por el método de Bradford

Para desarrollar esta técnica se prepara el reactivo de Bradford con los siguientes compuestos:

100 ml de ácido fosfórico al 85 %

50 ml de alcohol etílico

100 mg de azul de Coomasie G-250

Se afora a un litro con agua.

Procedimiento:

1. Se toman 100 μ l de homogeneizado de hígado y se lleva a 1,000 μ l con agua tridestilada.
2. De la dilución anterior se toman 20 μ l + 80 μ l de agua tridestilada.
3. El blanco se prepara con 100 μ l de agua.
4. Se añaden 2.4 ml del reactivo de Bradford.
5. Se lee la absorbancia a 595 nm.

Curva de calibración para las proteínas

Se prepara una curva de calibración utilizando albúmina bovina sérica (1mg/ml), con las siguientes concentraciones.

0, 5, 10, 15, 20, 30, 35, 40, 50, 60, 80, 100 μ l.

Se leen las absorbancias a 595 nm.

5.4.6 Glutación reducido en hígado y sangre

Reactivos:

1. Reactivo de Ellman (DTNB):

- a) Se pesan 40 mg de ácido 5,5'-ditiobis nitrobenzónico (DTNB).
- b) Se preparan 100 ml de citrato de sodio al 1%.
- c) Se disuelven (a) en (b).

Se puede mantener congelado no más de dos semanas.

2. Solución de fosfatos Na_2HPO_4 0.3 M (disuelto en agua).

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

Procedimiento:

1. Se homogeneizan 0.3g de hígado o 0.3 ml de sangre en 1.2 ml de solución precipitante.
2. Se centrifugan por 20 minutos a 12000 rpm (JA-21).
3. Se toman 0.1ml del sobrenadante (por duplicado) y se agregan 2.1 ml de solución del fosfatos y 0.25 ml de reactivo de Ellman.
4. Se agitan y leen en el espectrofotómetro a 412 nm.

Curva estándar de glutatión reducido

Se prepara la solución patrón de GSH 1 (nmol/ μ l). Se pesan 30.733 mg de GSH y se lleva a 100 ml con solución de fosfatos.

Se agita cada tubo y se leen las muestras a 412 nm en un espectrofotómetro.

Tabla IX. Curva de calibración de glutatión reducido en hígado y sangre.

Tubo	GSH (µl)	Nmol	Na₂HPO₄ (ml)	DTNB (ml)
B	0	0	2.2	0.25
1	10	10	2.19	0.25
2	50	50	2.15	0.25
3	100	100	2.10	0.25
4	250	250	1.95	0.25
5	450	450	1.75	0.25
6	650	650	1.55	0.25
7	850	850	1.35	0.25

5.4.7 Catalasa (29)

Reactivos:

1. Buffer de fosfatos: 0.01M, pH 7: Se mezclan nueve partes de PO₄H₂K monobásico 1M con diez partes de PO₄HK₂ dibásico 1M. Se diluye 1:100 para obtener el buffer requerido.
2. H₂O₂ 6mM (0.06 ml 30%/100 ml de buffer de fosfato 0.01 M, pH 7)
3. H₂SO₄ 6N
4. KMnO₄ 0.01 N (458.03 mg/l)

Técnica:

- 1.- Un vez homogeneizado el hígado al 10%, se colocan por duplicado 0.5 ml del sobrenadante en tubos de 20-40 ml que deben estar en hielo (A).
- 2.-Hacer dos blancos (B) colocando 6.5 ml de agua destilada en los tubos.
- 3.- Se inicia la reacción enzimática adicionando 5ml de H₂O₂ fría, a intervalos de tiempo fijos y se mezcla en vortex. Realizar esto con A y B.
- 4.- Después de 3 minutos, parar la reacción adicionando 1ml de H₂SO₄ 6N y mezclar en el vortex.
- 5.- A las muestras (A) y a los blancos (B) se agregan rápidamente 7 ml de KMnO₄. Se mezclan y se leen a 480 nm (entre 30 y 60 segundos, si se tarda más, se puede desarrollar

turbiedad). Para evitar la precipitación del MnO_2 en la celda, lavar la celda con agua destilada entre cada muestra a leer.

Preparación del estándar (St):

- 1.- Se agregan 7 ml de $KMnO_4$ 0.01N a una mezcla de 5.5 ml de buffer y 1.0 ml de H_2SO_4 6N.
- 2.- Se lee la absorbancia a 480 nm. El H_2O_2 se mide por reacción con un exceso del St de $KMnO_4$ y luego se mide el $KMnO_4$ residual. El St siempre tiene que ser mayor que el blanco y que las muestras.

5.4.8 Superóxido dismutasa

La técnica para realizar la determinación de la actividad de la SOD es (30):

Reactivos:

Mezcla de reactivos que por cada litro contiene: Xantina 0.1 mmol, DETAPAC 1mmol, albúmina 50 mg, NBT (Cloruro de nitroblue tetrazolium) 25 μ mol, BCS (Bathocupreine disulfonic acid) 250 μ mol, carbonato de sodio pH 10.2 40 mmol.

Método:

- 1.-Se homogeneiza el hígado en buffer de fosfatos 50 mM para obtener un homogeneizado al 10%. Esto se debe realizar en hielo.
- 2.- Se filtra el homogeneizado con una gasa. Después se centrifuga a 3000 rpm durante 3 minutos, a 4 °C. (Sobrenadante 1).
- 3.- A 0.5 del sobrenadante 1 se le agregan 1.5 ml de agua bidestilada y luego 0.8 ml de una mezcla 3:5 de cloroformo: etanol y se mezcla en vortex por 90 s.
- 4.-La mezcla obtenida se centrifuga a 3000 rpm durante 30 minutos a 4 °C, obteniéndose el sobrenadante 2.
- 5.- En los tubos se colocan 2.45 ml de la mezcla de reactivos.

6.- Se hacen dos blancos por duplicado:

Blanco: se colocan 0.5 ml de agua en cada tubo.

Blanco de reactivos: Se agregan 0.55 ml de agua en cada tubo.

7.- Se colocan 500 μ l del sobrenadante 2 a todos los tubos con la mezcla. Se adicionan 50 μ l de xantina oxidasa 20 U/ml a todos los tubos excepto al Blanco de reactivos, a intervalos de 20 s, para iniciar la reacción (el volumen final de la mezcla es de 3 ml).

8.- Se incuba la mezcla a 25 °C por 20 minutos.

9.- Se termina la reacción por la adición de 1ml de cloruro cúprico 0.8 nmol cada 20 s.

10.- Se lee cada muestra a 560 nm en un espectrofotómetro.

5.4.9 Glutación peroxidasa

La técnica para conocer la actividad de la GPx es la siguiente (31):

Reactivos

Buffer de fosfatos 75 mM, pH 7 y 50 mM, pH 7.4

Glutación 60 mM

Glutación reductasa 30 u/ml

EDTA 15 mM

NADPH 3mM

Hidróxido de cumeno 45 mM

Agua 0.45 ml

Método:

1.- Se homogeneiza una porción de hígado sobre hielo, 1g de hígado en 10 volúmenes de buffer de fosfatos 50 mM, pH 7.4 durante 30 s (o la proporción adecuada para homogeneizar al 10%).

2.-Se filtra el homogeneizado haciéndolo pasar por una gasa y se centrifuga a 3000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Se obtiene un sobrenadante de donde se tomará una muestra adecuada para medir proteínas.

Reacción enzimática:

- 1.- Se agregan en un tubo 2 ml de buffer de fosfatos 75 mM y 50 μ l de glutatión 60 mM, 0.1 ml de NADPH 3 mM, 200 μ l de sobrenadante y 0.45 ml de agua.
- 2.- La reacción se inicia al agregar 0.1 ml de hidroperóxido de cumeno 45 mM.
- 3.- La conversión de NADPH a NADP⁺ se monitorea continuamente a 340 nm por 4 minutos. La actividad de la GPx se expresa como nmol de NADPH oxidado a NADP⁺/min/mg de proteínas, utilizando un coeficiente de extinción de $6.22 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

5.4.10 Glucógeno

La determinación del glucógeno hepático se realiza con la técnica de la antrona (32):

1. Se pesan 0.5 g de hígado en tubos de tapón esmerilado y se les adicionan 1.5 ml de KOH al 30%, se tapan y se hierven en baño de agua, a ebullición, durante 30 minutos.
2. Después de enfriar, se pasan cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 ml y se aforan con agua agitando muy bien.
3. Del matraz anterior, se toman de 40 a 160 μ l con pipeta volumétrica, se llevan a 1 ml en tubos de 13x100 esmerilados por duplicado, se preparan además un tubo blanco que contenga 1 ml de H₂O y 2 estándares con 20 μ l de una solución de glucosa estándar (1 mg/ml) y se llevan a 1 ml con agua.
4. Se prepara una solución de antrona 0.2% en H₂SO₄ concentrado. Se añaden 2 ml de antrona a cada tubo con ayuda de una bureta agitando suavemente y enfriando los tubos en hielo.
5. Se tapan los tubos fríos y se ponen en un baño de agua hirviendo por 15 min.
6. Se enfrían de inmediato sobre agua con hielo.

Cada muestra se debe leer a una absorbancia de 620 nm en un espectrofotómetro.

5.4.11 Colágena

Para cuantificar la colágena se determina la hidroxiprolina (HP) con la siguiente técnica (33):

1. Se pesan 0.1 g de hígado de rata previamente secado con papel filtro y se coloca en una ampolleta.
2. Se agregan 2 ml de HCl 6N y se sellan con un mechero o soplete, posteriormente se colocan a 100 °C en un horno durante 24 h.
3. Una vez hidrolizadas las muestras, se destapan las ampolletas y se colocan nuevamente en el horno a temperatura de 60-80 °C aproximadamente por 24 h o hasta que se sequen.
4. Las muestras ya secas se resuspenden con 2 ml de solución amortiguadora (sol.1); se agitan vigorosamente en un vortex y se vacían en tubos de ensayo, las ampolletas se lavan con la adición de 1 ml de la misma solución.
5. Se centrifugan a 3000 rpm durante 15 min.
6. En un tubo conteniendo una pequeña porción de anorita (carbón activado) se deposita el sobrenadante y se agita durante un minuto. Se centrifugan a 3000 rpm por 15 min, si se observa que el sobrenadante no quedó claro se repite este paso.
7. Se toman 1 ml del sobrenadante más 1 ml de H₂O y 1 ml de cloramina T (sol. 2). Se deja reposar exactamente 20 minutos a temperatura ambiente. Se hace un blanco.
8. Transcurridos los 20 min, se adicionan 0.5 ml de tiosulfato de sodio 2M, 1 ml de NaOH 1N y aproximadamente 2 g de NaCl. Se agita inmediatamente para detener la reacción.
9. A cada tubo se agregan 6 ml de tolueno y se agitan durante 1 minuto. La fase acuosa se utiliza para la cuantificación de HP.
10. 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.
11. Los tubos se enfrían 15 minutos preferentemente en refrigerador. Ya fríos se les adiciona 6 ml de tolueno y se agitan durante 1 minuto.
12. De la fase de tolueno se toman alícuotas de 1 ml por duplicado y se les agregan 4 ml del reactivo de Ehrlich y se agitan fuertemente.

13. Se dejan reposar durante 30 minutos para que se lleve a cabo la reacción colorida. Pasados los mismos, se leen a 560 nm.

Reactivos:

1. Solución amortiguadora: Buffer de acetato de sodio-ácido cítrico, pH 6, se mantiene en refrigeración y es estable por meses (relación para un litro):

50 g de ácido cítrico.

120 g de acetato de sodio.

34 g de hidróxido de sodio.

15 ml de ácido acético glacial.

2. Solución de cloramina T (Cloramina T) (Relación para 10 ml):

Se pesan 0.141 g de cloramina T y se mezcla con 2 ml de agua destilada, 3 ml de etilenglicol y 5 ml de solución amortiguadora. Esta solución se debe preparar en el momento de usarse.

3. Reactivo de Ehrlich.

a) Se toman 27.4 ml de H_2SO_4 concentrado y se agrega lentamente a 200 ml de alcohol absoluto en un vaso sobre hielo.

b) Se pesan 120 g de p-dimetilaminobenzaldehído y se disuelven en 200 ml de alcohol absoluto.

c) La mezcla ácido-etanol (a) se agrega lentamente y con agitación a la solución (b) en hielo, el recipiente se cubre con papel aluminio (solución fotolábil). Se agita durante 15 minutos y se saca del hielo y se sigue agitando hasta que se disuelva.

d) La solución se puede almacenar en el refrigerador por varias semanas.

e) Los cristales que precipitan por el enfriamiento se disuelven calentando a baño María la solución y agitándola.

4. Solución de ninhidrina:

Se pesan 2.50 g de ninhidrina, se disuelven en 60 ml de ácido acético glacial y 40 ml de ácido fosfórico 6N.

Curva estándar de hidroxiprolina

Se pesan 10 mg (76.26 μmol) de HP y se llevan a un volumen de 76.26 ml, lo que da una disolución con una concentración 1 $\mu\text{mol/ml}$ =1nmol/ μl . Posteriormente, se sigue con lo indicado en la Tabla X:

Tabla X. Curva estándar de hidroxiprolina.

Tubo	HP μl	H ₂ O ml	HP nmoles
1	10	1.99	10
2	20	1.98	20
3	50	1.95	50
4	70	1.93	70
5	100	1.90	100
6	150	1.85	150
7	200	1.80	200
8	300	1.70	300
9	400	1.60	400
10	500	1.50	500
B	----	2.00	--

1. En tubos con rosca y tapón se adicionan los reactivos de la Tabla X. Se agregan 1 ml de cloramina T. Se deja reposar 20 minutos a temperatura ambiente.
2. Pasados los 20 minutos, se detiene la reacción por la adición de 500 μl de tiosulfato de sodio 2 M; con 1 ml de NaOH 1N y con aproximadamente 2g de NaCl. Se agita inmediatamente (de esto depende que se detenga la reacción).
3. Se agregan 6 ml de tolueno a cada muestra y se agitan durante 1 minuto.
4. Se extrae la fase de tolueno y se desecha. El contenido acuoso se cubre con su respectivo tapón y se coloca en un baño hirviendo durante 20 minutos.
5. Se enfrían los tubos y nuevamente se les agrega 6 ml de tolueno y se agitan durante 1 minuto.

6. Se toman por duplicado una alícuota de 1 ml de la fase de tolueno y se mezcla con 4 ml del reactivo de Ehrlich y se agita vigorosamente.

7. Se mantiene a temperatura ambiente los tubos por 30 minutos para desarrollar color. Se lee la absorbancia a 560 nm.

5.4.12 Histologías

Las técnicas utilizadas fueron la tinción de H y E y la tricrómica de Masson (34). En la primera se aprecian los núcleos de las células de color violeta-azul y el citoplasma se tiñe de color rosa. En cuanto a la segunda, se busca teñir a las bandas de colágena de color azul, el núcleo celular de color rojo y el citoplasma de color rosa. El procedimiento previo para la preparación de las muestras histológicas para ambas tinciones fue el siguiente:

Cortes gruesos de hígado se depositaron en un vial conteniendo una solución fijadora de formaldehído (formol %)- PBS, el tiempo mínimo de fijación fue de 24 h. Los cortes se lavaron con agua corriente, se deshidrataron en alcoholes y se embebieron en parafina. Se hicieron cortes de 6-7 micras de espesor y se cubrieron con silano. Posteriormente, se realizó la siguiente técnica:

5.4.12.1 Tinción eosina y hematoxilina

Las rebanadas se desparafinaron y rehidrataron con xileno, alcohol absoluto y alcohol al 95%, después, se aplicó la hematoxilina de Harris durante 15 minutos y se enjuagaron con agua corriente por dos minutos. Se diferenciaron en alcohol ácido con tres a diez inmersiones y se verificó la diferenciación con microscopio. Los núcleos deben distinguirse y el fondo debe ser de color muy tenue o incoloro.

Se lavaron con agua corriente brevemente y luego se sumergieron en agua amoniacada o saturada de carbonato de litio hasta que las secciones fueron de color azul brillante, una vez más se lavaron en agua corriente de 10 a 20 minutos. Posteriormente, se tiñeron con eosina de 15 s a 20 minutos, dependiendo de la caducidad de la eosina y del grado de contraste

deseado (contrateñido); se lavaron con alcohol al 95% y luego con alcohol absoluto y con xileno; finalmente, se montaron con el polímero Permout o bálsamo.

5.4.12.2 Tinción tricrómica de Masson

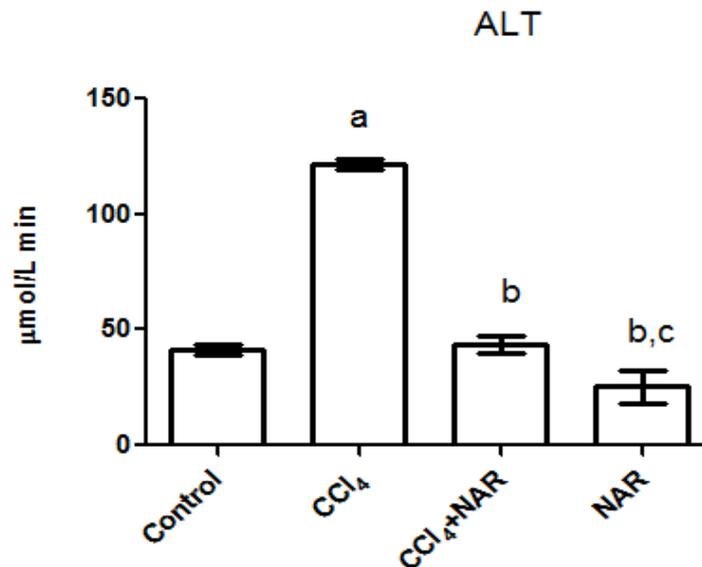
Las rebanadas se desparafinaron y rehidrataron con xileno, alcohol absoluto y alcohol al 95%, se enjuagaron en agua destilada y se sumergieron en el fijador de Bouin por 1h a 56 °C. Posteriormente, se enfriaron y lavaron con agua corriente hasta que el color amarillo desapareció y se enjuagaron con agua destilada para luego sumergirlas en la solución de hematoxilina de hierro de Weigert por 10 minutos y éstas nuevamente se enjuagaron con agua corriente y con agua destilada.

Después, se sumergieron en la solución de fucsina ácido-escarlata de Biebrich por 15 minutos y se enjuagaron con agua destilada para colocarlas en la solución de ácido fosfomolibdico/ ácido fosfotungsténico por 10-15 minutos antes de la solución de anilina azul. Se colocaron en la solución de anilina azul por 5-10 minutos o con la solución verde claro por 1 minuto, se recuperó la solución y se enjuagaron con agua destilada. Se lavaron con agua acética al 1% por 3-5 minutos y luego con alcohol al 95%, alcohol absoluto y con xileno. Finalmente se montaron en el polímero Permout o bálsamo.

6 RESULTADOS

6.1 Actividad Enzimática de la Alanino Aminotransferasa, Fosfatasa Alcalina y Gamma-Glutamil Transpeptidasa

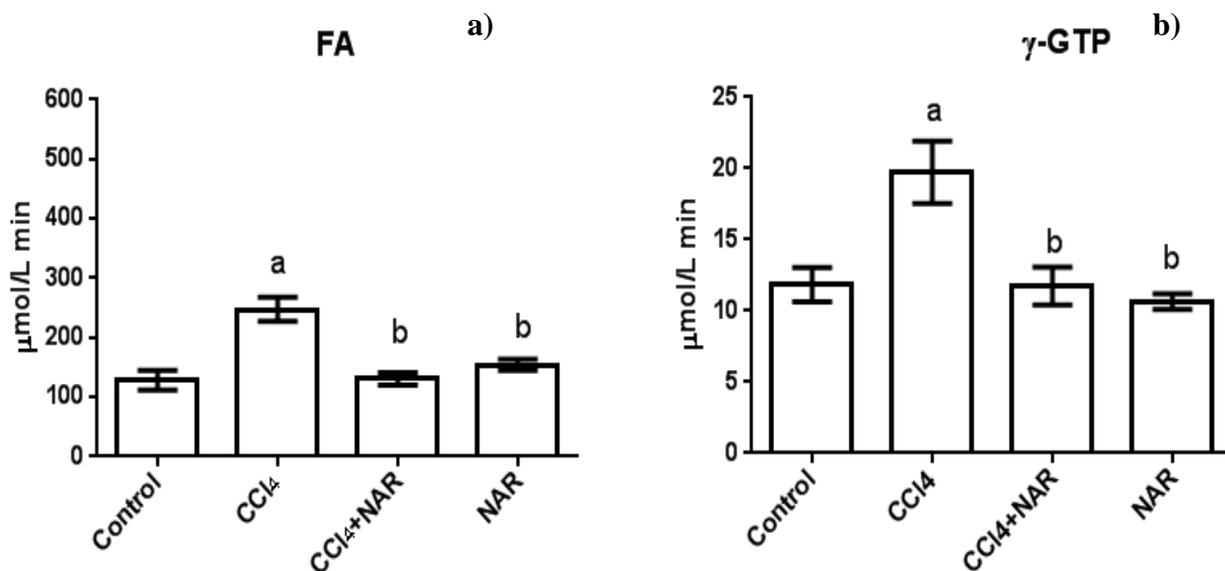
La enzima ALT es un marcador de daño hepático que indica necrosis y su actividad se ve aumentada en el daño hepático. En la Gráfica 1 se observan los resultados de la determinación de la actividad de la ALT; el daño con CCl₄ durante 8 semanas (forma crónica), tuvo como resultado un incremento significativo en la actividad de la ALT de casi el triple comparado con el control, sin embargo, la administración de la NAR durante la inducción del daño con CCl₄ previno considerablemente el aumento en la actividad de la ALT. Cuando la NAR es administrada sola no se aprecian cambios en la actividad de dicha enzima.



Gráfica 1. Actividad de la enzima alanino aminotransferasa (ALT) en el plasma de ratas Control, tratadas con CCl₄, tratadas con CCl₄+NAR y tratadas solamente con NAR. Los valores representan la media de los valores en los ensayos por duplicado (n=8). **a** indica diferencia significativa con respecto al Control. P < 0.05. **b** indica diferencia significativa con respecto al grupo CCl₄, P < 0.05. **c** indica diferencia significativa con respecto al grupo CCl₄+NAR.

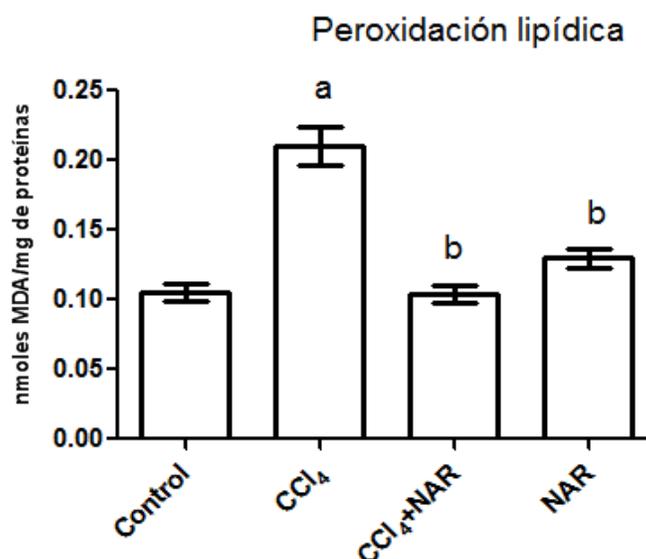
En la Gráfica 2 panel a) se muestra la actividad plasmática de la FA que indica colestasis. El tratamiento crónico con CCl₄ durante 8 semanas incrementó la actividad de esta enzima aproximadamente al doble con respecto al grupo control. La NAR previno dicho incremento ya que redujo la actividad de la FA a valores muy semejantes a los del control. La administración de NAR sola no muestra cambio en la actividad de la FA.

El panel b) se observa la actividad de la enzima γ -GTP, otro marcador de colestasis. Con la administración crónica de CCl_4 se incrementó significativamente la actividad de la γ -GTP con respecto al control, sin embargo, la NAR al ser administrada junto con el CCl_4 , previno la colestasis ya que su actividad no tiene diferencia significativa con respecto al control. Por otro lado, la NAR no produjo cambios en la actividad de la γ -GTP.



6.2 Determinación de la Peroxidación Lipídica

En la Gráfica 3 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de la PL (MDA), un metabolito final de dicho proceso. Como era de esperarse por lo observado en investigaciones anteriores, el tratamiento con CCl_4 aumentó los niveles de MDA, lo que es un indicativo del desarrollo de la PL. Contrario a esto, la administración de NAR al mismo tiempo que el CCl_4 mostró la prevención de la PL. Por otro lado, NAR no causa cambios en la PL con respecto al control.



Gráfica 3. Grado de la peroxidación lipídica en el hígado de las ratas Control, tratadas con CCl₄, tratadas con CCl₄+NAR y tratadas solamente con NAR. Los valores representan la media de los valores en los ensayos por duplicado (n=8). **a** indica diferencia significativa con respecto al Control. P < 0.05. **b** indica diferencia significativa con respecto al grupo CCl₄, P < 0.05.

6.3 Determinación del Glutathión Reducido Hepático y Sanguíneo

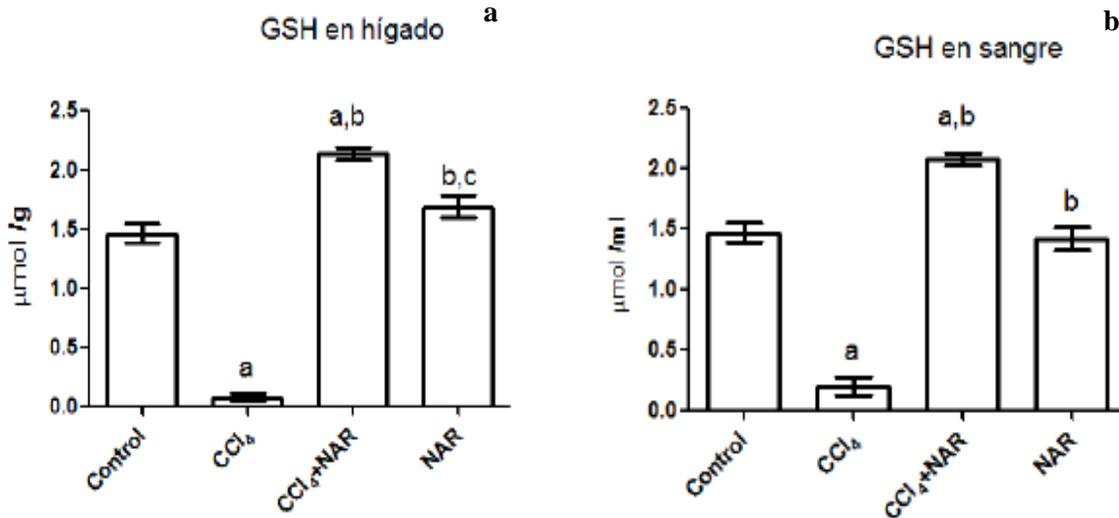
En hígado y plasma (Gráfica 4) se cuantificó el GSH, marcador de estrés oxidativo y que se ve disminuido en el daño hepático. Este antioxidante endógeno disminuyó significativamente al administrar CCl₄ con respecto al grupo control como se esperaba.

En el grupo administrado simultáneamente con CCl₄ y NAR, los niveles de GSH aumentaron con respecto al grupo control, mostrando que la NAR, además de prevenir la disminución del GSH, también interviene en el aumento de este antioxidante.

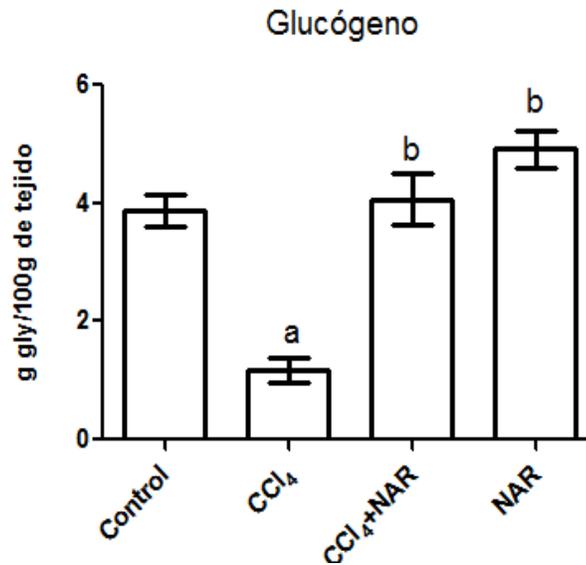
6.4 Determinación del Contenido de Glucógeno

El glucógeno hepático, (Gráfica 5) se cuantificó en las ratas administradas con CCl₄, decreciendo considerablemente, indicando que la capacidad biosintética hepática ha sido dañada.

Al administrar la NAR en forma preventiva, es decir, al mismo tiempo que se inducía el daño, se aprecia que ésta previno el decremento en la cantidad de glucógeno hepático. Por otro lado, la NAR sola no mostró cambios en dicha macromolécula.



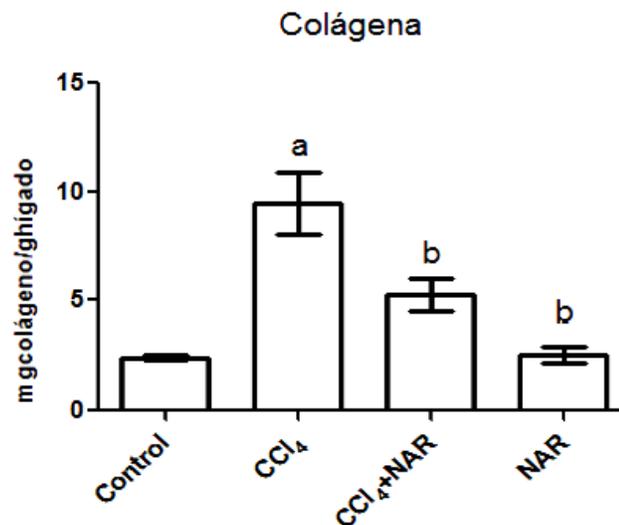
Gráfica 4. Determinación de glutatión reducido (GSH) en hígado (panel a) y plasma (panel b) de ratas Control, tratadas con CCl₄, CCl₄ + NAR y NAR sola, respectivamente, durante 8 semanas cada grupo. Las barras representan la media de los valores de cada parámetro obtenidos en ensayos por duplicado; n=8. **a** indica diferencia significativa con respecto al control, P <0.05. **b** indica diferencia significativa con respecto al grupo CCl₄, P <0.05 y **c** indica diferencia significativa con respecto al grupo CCl₄ + NAR, P <0.05



Gráfica 5. Contenido de glucógeno en el hígado de ratas Control, tratadas con CCl₄, CCl₄ + NAR y NAR sola, respectivamente, durante 8 semanas cada grupo. Las barras representan la media de los valores de cada parámetro obtenidos en ensayos por duplicado; n=8. **a** indica diferencia significativa con respecto al control, P <0.05. **b** indica diferencia significativa con respecto al grupo CCl₄, P <0.05.

6.5 Determinación del Contenido de Colágena

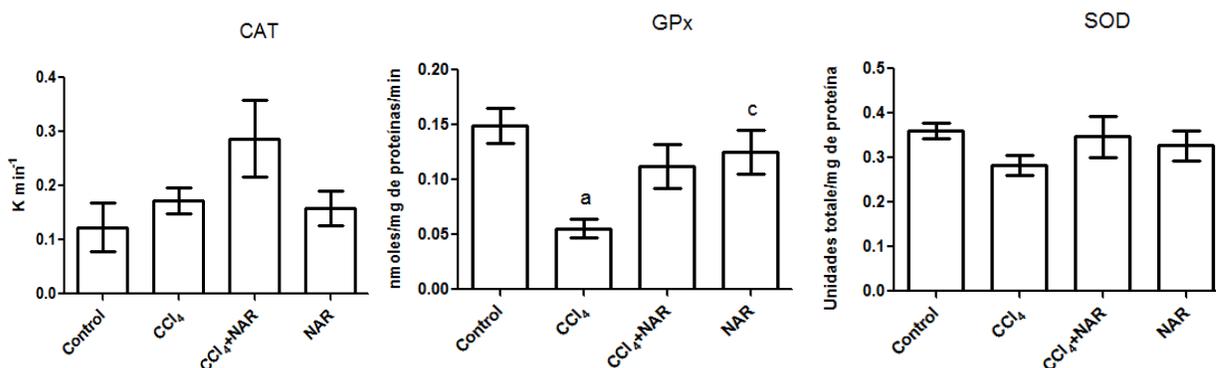
La producción excesiva de colágena es una de las características principales de la fibrosis, al provocarla experimentalmente con el CCl_4 , los niveles de colágena se elevaron cuatro veces con respecto al control. El tratamiento preventivo con NAR mantuvo los niveles de colágena, este grupo no tuvo diferencia significativa con respecto al grupo control pero sí la tuvo con respecto al grupo de CCl_4 (Gráfica 6).



Gráfica 6. Determinación de colágena en hígado de ratas Control, tratadas con CCl_4 , CCl_4 + NAR y NAR sola, durante 8 semanas cada grupo. Las barras representan la media de los valores de cada parámetro obtenidos en ensayos por duplicado; n=8. **a** indica diferencia significativa con respecto al control, $P < 0.05$. **b** indica diferencia significativa con respecto al grupo CCl_4 , $P < 0.05$.

6.6 Actividad Enzimática de la Catalasa, la Glutación Peroxidasa y la Superóxido Dismutasa

Como parte de la evaluación de la NAR como antioxidante, se determinó la actividad de las enzimas CAT, GPx y SOD en el homogeneizado de hígado (Gráfica 7). Estas enzimas están encargadas de eliminar los ROS que se producen en el daño al hígado. Los resultados obtenidos muestran que no hay diferencia significativa entre los cuatro grupos experimentales en las actividades de la CAT y de la GPx. En cuanto a la SOD, se encontró una disminución significativa de su actividad en el grupo de CCl_4 y significativamente importante con respecto al control. La administración de la NAR al mismo tiempo que el CCl_4 mostró una tendencia a prevenir la disminución en la actividad de GPx.



Gráfica 7. Determinación de catalasa (panel a), glutatión peroxidasa (panel b) y superóxido dismutasa (panel c) en hígado de ratas Control, tratadas con CCl₄, CCl₄ + NAR y NAR sola, durante 8 semanas cada grupo. Las barras representan la media de los valores de cada parámetro obtenidos en ensayos por duplicado; n=8. **a** indica diferencia significativa con respecto al control, P <0.05. **b** indica diferencia significativa con respecto al grupo CCl₄, P <0.05 y **c** indica diferencia significativa con respecto al grupo CCl₄ + NAR, P <0.05

6.7 Tinción de Hematoxilina y Eosina

En cuanto al análisis histológico, se realizó la tinción de H y E (Figura 8A-D). La Figura 8A, grupo control, muestra tejido hepático no alterado, la Figura 8B, grupo de daño crónico, se observa la fibrosis, la esteatosis, los hepatocitos hiper Cromáticos y núcleos atípicos pleomorfos. La fibrosis se ve considerablemente disminuida en el grupo tratado preventivamente con la NAR (Figura 8C), aunque persisten ciertos cambios nucleares (núcleos grandes) y escasas zonas de neoformación. El grupo control de NAR es un tejido con parénquima normal (Figura8D).

6.8 Tinción Tricrómica de Masson

La tinción tricrómica de Masson se muestra en la Figura 9A-D. En el grupo control se observan fibras de colágena basales alrededor de una vena central en coloración azul (Figura 9A). En el grupo dañado crónico se aprecia una gran cantidad de colágena alrededor de los nódulos fibróticos (9B). La NAR de forma preventiva disminuyó la colágena en forma significativa (9C). El tejido hepático tratado con NAR no muestra cambios, es un tejido normal (9D).

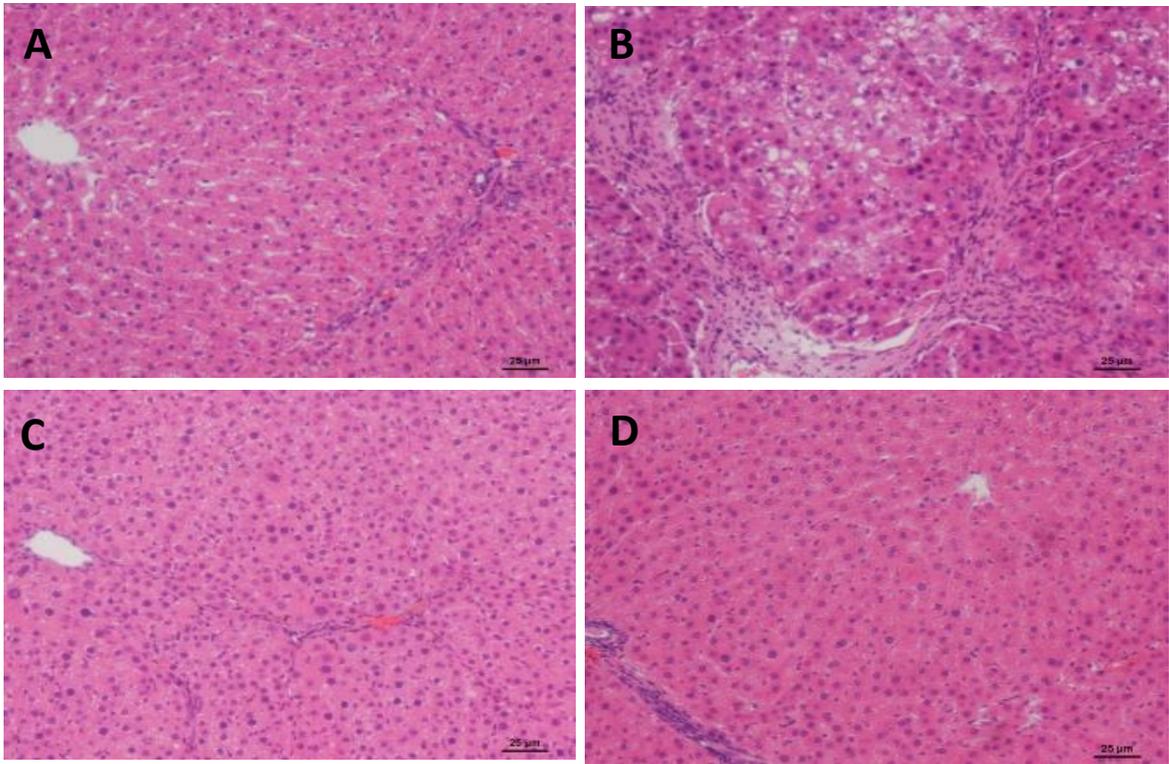


Figura 8. Tinción hematoxilina-eosina de hígado de ratas Control (A), tratadas con CCl_4 (B), CCl_4 + NAR (C) y NAR sola (D), durante 8 semanas cada grupo.

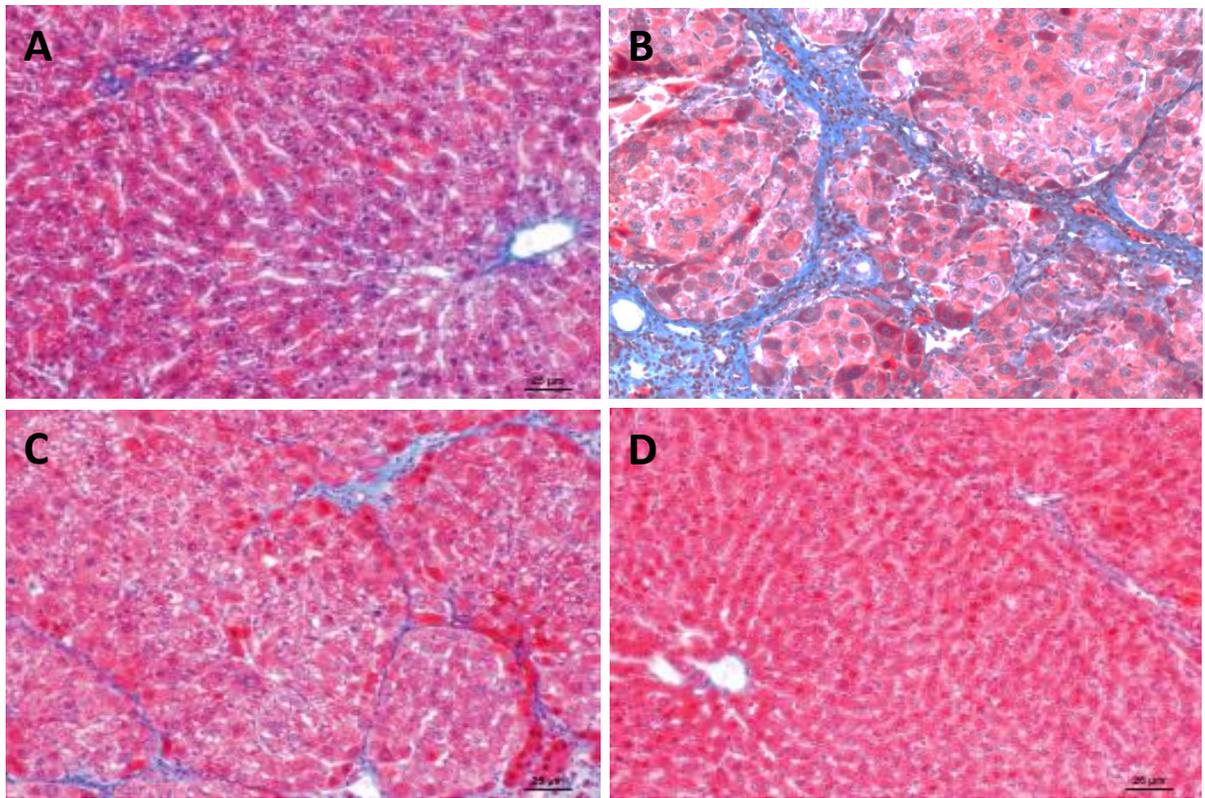


Figura 9. Tinción tricrómica de hígado de ratas Control (A), tratadas con CCl_4 (B), CCl_4 + NAR (C) y NAR sola (D), durante 8 semanas cada grupo.

7 DISCUSIÓN

Las enfermedades hepáticas son una de las principales causas de muerte en nuestro país y sin embargo, no existen fármacos a nivel clínico que logren revertir o prevenir la fibrosis y la cirrosis. Por ello es necesario realizar investigaciones en materia del descubrimiento y desarrollo de fármacos que sean capaces de prevenir o revertir dichas hepatopatías. Para ello, se han desarrollado modelos animales en los que se induce daño hepático.

En este trabajo se utilizó un modelo de daño hepático crónico con CCl₄ en ratas y se evaluó el posible efecto preventivo de la NAR en el desarrollo del daño.

El CCl₄ es un hepatotóxico que causa disrupción de las membranas celulares y activa cascadas de señalización que llevan los hepatocitos a la necrosis. En el desarrollo de la fibrosis se generan radicales libres y ROS que forman aductos con lípidos de la membrana poniendo en riesgo su permeabilidad y su estabilidad hasta que se disrumpe (10).

La ALT es una enzima que se encuentra en el citosol de los hepatocitos y es un marcador de necrosis (34). Otro marcador hepático es la FA que es una enzima integral de la superficie exterior de la membrana del canalículo biliar. Es típico observar elevaciones importantes (del cuádruple o mayores) de la actividad sérica de la FA en pacientes con síndromes colestásicos (35). La γ -GTP es una enzima hepática que está en la membrana canalicular y es un indicador de la colestasis (34). La γ -GTP ha sido ampliamente utilizada como un índice de disfunción hepática. Estudios recientes indican que la γ -GTP en el plasma podría ser útil en el estudio del estrés oxidativo relacionado con los tejidos. Los productos de la reacción de la γ -GTP pueden, a su vez, conducir a una mayor producción de radicales libres, en particular en presencia del hierro. (36).

Los resultados muestran cómo el CCl₄ eleva la actividad de la ALT casi el triple con respecto al control; este aumento indica que se produjo un gran daño hepático, que desencadenó la necrosis de los hepatocitos. La NAR, previno considerablemente el aumento en la actividad de la ALT. Por otro lado, el CCl₄ produjo un aumento significativo

en la actividad de FA y γ -GTP, sin embargo, el tratamiento con NAR previno totalmente la colestasis observada por el aumento de la actividad de la FA y la γ -GTP.

El incremento de la actividad de estas tres enzimas se ha observado en otros estudios (23,24); donde se induce el daño hepático con CCl₄. Son marcadores hepáticos muy importantes que se utilizan de forma rutinaria en laboratorios clínicos. La NAR fue capaz de impedir la necrosis de los hepatocitos y la colestasis, tal como se ha reportado en otros estudios, donde se induce daño hepático con diferentes sustancias como níquel, alcohol, y cadmio. La NAR puede estabilizar a la membrana celular hepática y proteger a los hepatocitos contra los efectos de los tóxicos, lo que puede disminuir la fuga de las enzimas, desde las membranas, hacia la sangre (22,36, 37).

El CCl₄ participa en la activación de las caspasas para inducir la apoptosis de hepatocitos. La inhibición de la activación de la apoptosis, por lo tanto, podría ayudar a prevenir la muerte celular y la lesión del órgano. La NAR muestra efectos inhibitorios sobre la caspasa-3 y la caspasa -9, lo que lleva a una reducción de la necrosis; además, la NAR es un flavonoide que por su relación estructura-actividad tiene capacidad antioxidante ya que los sustituyentes hidroxilos pueden donar hidrógenos a los radicales libres y ROS, permitiéndoles adquirir una estructura estable impidiendo que ataquen la membrana celular (14).

Un mecanismo muy importante en el daño hepático, es la PL, iniciada por las ROS que atacan a los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular extrayendo un hidrógeno y convirtiéndolos por una serie de reacciones posteriores en aldehídos reactivos como el malondialdehído (MDA), el principal producto de la peroxidación. El MDA puede ser detectado con ácido tiobarbitúrico (TBA) (10,38).

Por otro lado, cuando el CCl₄ se activa por el CYP2E1, resulta el CCl₃^{*}, que puede unirse a las proteínas de membrana. Además de los lípidos, estudios han demostrado que las proteínas también pueden ser afectadas por la acumulación de radicales libres. Las

proteínas con altos contenidos de grupos carbonilo son el indicador más común y más utilizado para la detección de la oxidación de las proteínas (10, 37)

La PL se ve aumentada drásticamente en el grupo de daño (Gráfica 3) y sin embargo, cuando la NAR es administrada en conjunto con el CCl₄ previno la formación de MDA. Esto es muy importante ya que NAR logró mantener los niveles basales de MDA.

Se ha informado que la administración de NAR en combinación con vitamina C y E disminuye significativamente los niveles del PL y la oxidación de las proteínas en hígado por el efecto que la NAR produce al atrapar a los radicales libres. Se ha propuesto, que las NAR interrumpe la cadena de reacciones de los radicales libres, convirtiéndose en un radical flavonoide; además, se ha reportado que la NAR puede impedir que los radicales libres ataquen los grupos amino de las proteínas de membrana y así disminuir la producción de grupos carbonilo que se producen en la PL. La naturaleza polar de la NAR puede facilitar que se adhiera a la bicapa lipídica, impidiendo la formación de radicales libres, protegiendo a la membrana celular (22,37). De este modo, se puede explicar que la NAR, con sus mecanismos antioxidantes, pueda prevenir la PL.

El GSH es un tripéptido de L-glutamil-L-cisteinglicina. El GSH es un antioxidante endógeno muy importante contra los radicales libres. Dos moléculas de GSH se oxidan, cuando reduce aun radical libre, formando el glutatión oxidado (GSSG) (39).

El CCl₄ disminuye totalmente el GSH en el hígado como se puede ver en la Gráfica 4 ya que éste continuamente se está oxidando para estabilizar a los radicales libres y así no causen daño a los constituyentes celulares. Posteriormente, el GSSG es reducido por la enzima glutatión reductasa, para que el GSH resultante pueda reducir a otro radical libre, pero cuando hay un desequilibrio en este proceso, llega a reducirse considerablemente el poder antioxidante del GSH (39).

Sin embargo, la NAR al tener un gran poder antioxidante previene la disminución del GSH manteniéndolo en niveles incluso superiores a los basales o control. Se cree que esto es

debido a que la NAR capta eficazmente los radicales libres y ROS, por la propiedad de los hidroxilos de su anillo B para donar electrones (37).

Por otro lado, se ha reportado, que la NAR tiene la capacidad de restablecer el GSH, repletado por diferentes sustancias tóxicas al hígado y en colitis inducida en ratas. Además, aumenta la actividad de la enzima glutatión reductasa, que es crucial para el mantenimiento normal de los niveles de GSH en el hígado (22, 36, 37, 40).

El glucógeno es una macromolécula muy importante ya que es una forma de almacenamiento de la glucosa. El glucógeno se sintetiza en el hígado y es un indicador de la funcionalidad y de daño. En el daño hepático, las funciones de la mitocondria se ven comprometidas, con pérdida de ATP y activación de fosfatasa lo que lleva a la disminución del glucógeno.

El daño crónico inducido en las ratas produjo pérdida de la capacidad biosintética hepática ya que los niveles de glucógeno se redujeron por debajo de los niveles basales. Sin embargo, la NAR fue capaz de prevenir la disminución de la funcionalidad hepática tanto que los niveles son iguales al control.

Como parte de la evaluación de la NAR como antioxidante, se determinó la actividad de las enzimas SOD, CAT y GPx. La enzima antioxidante SOD cataliza la reacción $O_2^- + O_2^- \rightarrow H_2O_2$. El O_2^- es un radical que a la larga produce respuestas inflamatorias en las células de Kupffer y fibrosis; por ello se elimina del organismo (4, 39). La SOD es considerada como la primera línea de defensa contra los efectos perjudiciales de los ROS en las células. La inhibición de la SOD puede resultar en un aumento del flujo de iones superóxido en compartimentos celulares, que puede ser la razón en el aumento en los índices de peroxidación lipídica (37).

La CAT se encuentra en los peroxisomas y tiene la función de eliminar el H_2O_2 , generando agua. La CAT actúa como un antioxidante preventivo y juega un papel importante en protección contra los efectos deletéreos de la PL. La GPx también se encarga de eliminar

H₂O₂ del medio. La disminución de su actividad puede ser debida a que puede ser inhibida por cualquier radical libre, además, su inactivación depende del agotamiento de sus sustratos, como el GSH (37).

Los resultados obtenidos muestran que no hay diferencia significativa entre los cuatro grupos experimentales en la actividad de la CAT, sin embargo se aprecia una clara tendencia en el aumento de la actividad de dicha enzima antioxidante, en el grupo de prevención, efecto causado por la NAR. En cuanto a la actividad de la GPx, se observa que el CCl₄ disminuyó de forma significativa la actividad de la GPx con respecto al control. La NAR muestra una tendencia para aumentar la actividad de la GPx. Por otro lado, la SOD, muestra una tendencia hacia la disminución de su actividad en el grupo de daño. La administración de la NAR al mismo tiempo que el CCl₄ no mostró diferencia significativa con respecto al control y tampoco con respecto al grupo de daño con CCl₄.

Se ha reportado que la NAR tiene la capacidad de restablecer la actividad de las enzimas CAT, GPx y SOD, no solo en hígado, sino también en riñón (22, 36, 37, 41).

La fibrosis hepática es la acumulación excesiva de proteínas de la ECM, principalmente colágena. La fibrosis resulta del daño crónico al hígado en conjunto con la acumulación de proteínas de la ECM, llevando a la formación de cicatrices tisulares, pérdida de la arquitectura tisular, posterior desarrollo de nódulos de regeneración de los hepatocitos y fallo del órgano. La síntesis de colágena de forma excesiva es el resultado del daño hepático, por lo tanto, su cuantificación es un indicador muy importante del estado de la fibrosis (3,4).

Los resultados muestran una importante producción de colágena en el grupo de daño; los niveles son cuatro veces más altos que en el grupo control. La NAR pudo prevenir la síntesis de colágena, manteniéndola en niveles muy semejantes al control, sin diferencia significativa entre esos grupos. Esto es muy importante ya que la síntesis descontrolada de esta proteína de ECM es producto de una serie de cascadas de señalización promovidas por

el TGF- β , una citocina profibrogénica que lleva a la activación de la HSC, principales productoras de colágena.

Algunos antecedentes que muestran que la NAR podría ser un buen hepatoprotector, muestran que la NAR no sólo reduce la acumulación de ECM, incluyendo colágena y fibronectina, sino también la producción de Smad3 inducida por TGF- β tanto en ARNm como en los niveles de proteína de una forma dependiente de la dosis. Además, la NAR inhibe selectivamente la transcripción de Smad3, pero no otras Smads involucradas en las vías de señalización del TGF- β 1, esto en el cultivo de células estelares de rata (21). Se ha reportado que la NAR es un inmunomodulador potencial en la inhibición de la fibrosis pulmonar, ya que reduce notablemente los niveles del TGF- β en un modelo de fibrosis inducida por bleomicina (42). Estos efectos se pueden explicar debido a que la NAR reduce la probabilidad de unión del TGF- β 1 con su receptor específico el T β RII. Así, se inhibe la dimerización del receptor T β RII con el T β RI y la activación de su cascada de señalización por medio de la Smad3 (43).

Los resultados bioquímicos en conjunto muestran que la NAR es un poderoso hepatoprotector en un modelo de daño hepático crónico en el que se induce fibrosis y cirrosis, pero estos datos estarían incompletos si no se tuvieran estudios histopatológicos, donde se puedan apreciar los cambios morfológicos que se presentan en el CCL₄ y en el grupo de prevención.

Al observar la Figura 8, la fibrosis se ve considerablemente disminuida en el grupo tratado preventivamente con la NAR así como la esteatosis observada en el grupo dañado. En la Figura 9 la colágena se ha teñido de azul por la técnica tricrómica de Masson. Los resultados histológicos de esta prueba son muy importantes ya que permiten apreciar la considerable prevención de la síntesis de colágena inducida por la NAR.

En un modelo de intoxicación con cadmio en ratas se observó que la administración de NAR mejoró significativamente las alteraciones histopatológicas y bioquímicas, además la

NAR, en tratamiento concomitante con las vitaminas C y E, tuvieron un mejor efecto sobre el daño (22).

Estos datos sugieren que la NAR podría ser usada en la prevención de la fibrosis hepática causada por el CCl₄.

8 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo donde se evaluaron los posibles efectos hepatoprotectores de la NAR en un daño hepático experimental, llevan a las siguientes conclusiones:

- 1.- La NAR es capaz de prevenir la necrosis hepática y la colestasis.
- 2.- El estrés oxidativo fue prevenido porque la NAR logró mantener los niveles de PL y de GSH normales.
- 3.- La NAR previene la pérdida de la función biosintética del hígado al mantener normales los niveles de glucógeno.
- 4.- La NAR muestra una tendencia a restablecer la actividad enzimática de la CAT, la GPx y la SOD.
- 5.- La fibrosis es prevenida por la NAR al mantener los niveles de colágena sin diferencia significativa con respecto al control.
- 6.- La NAR tiene efectos protectores en el modelo de daño hepático crónico de CCl₄.

9 REFERENCIAS

1. Tortora, G. y Derrickson, B. (2011). El aparato digestivo. En *Principios de Anatomía y Fisiología* (11ª edición). Editorial Médica Panamericana. España. 924-927.
2. Ganong, W.F. (2006). Regulación de la función gastrointestinal. En *Fisiología Médica* (18ª edición). Editorial El Manual Moderno. Madrid, España. 544-545.
3. Pellicoro, A., Ramachandran, P., and Iredale J.P. (2012). Reversibility of liver fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. **5**(Suppl 1): 26-29.
4. Bataller, R., and Brenner, D.A. (2005). Liver fibrosis. *Science in Medicine*. **115**: 209-218.
5. Kisseleva, T., and Brenner, D.A. (2007). Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. **22** (Suppl 1): 73-78.
6. Friedman, L.S. (2003). Liver fibrosis-from bench to bedside. *Journal of Hepatology*. **38**:38-57.
7. Iredale, J.P. (2003). Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments. *BMJ*. **327**: 143-147.
8. Schuppan, D., and Afdhal, N.H. (2008). Liver Cirrhosis. *The Lancet*. **371**: 838–851.
9. Iredale, J.P. (2007). Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *The Journal of Clinical Investigation*. **117**:539-548.
10. Weber, L. W. D., Meinrad, B., and Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical Reviews in Toxicology*. **33**:105-136.

11. Sahu, S.C. (2007). Some experimental models of liver damage. En *Hepatotoxicity: from Genomics to in Vitro and in Vivo Models*. John Wiley and Sons. Inglaterra. 119-123.
12. Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*. **24**: 851-874.
13. Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., y Tuñón, M.^a J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. **6**: 271-278.
14. Feng-Lin, Y., Tzu-Hui, W., Liang-Tzung, L., Thau-Ming, C., and Chun-Ching, L. (2009). Naringenin-loaded nanoparticles improve the physicochemical properties and the hepatoprotective effects of naringenin in orally-administered rats with CCl₄-induced acute liver failure. *Pharmaceutical Research*. **26**: 893-902.
15. Ribeiro, M.H. (2011). Naringinases: occurrence, characteristics, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **90**:1883–1895.
16. Slimestad, R., and Verheul, M. (2011). Properties of chalconaringenin and rutin isolated from cherry tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **59**: 3180–3185.
17. Shimizu, T., Lin, F., Hasegawa, M., Okada, K., Nojiri, H., and Yamane, H. (2012). Purification and identification of naringenin 7-*O*-methyltransferase, a key enzyme in biosynthesis of flavonoid phytoalexin sakuranetin in rice. *Journal of biological chemistry*. **287**: 9315–19325.
18. Erlund, I., Meririnne, E., Alfthan, G., and Aro, A., (2001). Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *The Journal of Nutrition*. **131**: 235–241.
19. Meng-Ju, W., Pei-Dawn, L.C., Yu-Chi, H., Su-Lan, H., Kuo-Ching, W., and Shang-Yuan, T. (2006). Pharmacokinetics and conjugation metabolism of naringin and naringenin

in rats after single dose and multiple dose administrations. *Journal of Food and Drug Analysis*. **14**:247-253.

20. Kanaze, F.I., Bounartzi, M.I., Georgarakis, M., and Niopas, I. (2007). Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*. **61**:472-477.

21. Liu, X., Wang, W., Hu, H., Tang, N., Zhang, C., Liang, W., and Wang, M. (2006). Smad3 specific inhibitor, naringenin, decreases the expression of extracellular matrix induced by TGF- β 1 in cultured rat hepatic stellate cells. *Pharmaceutical Research*. **23**:82-89.

22. Prabu, M. S., Shagirtha, K., and Renugadevi, J. (2011). Naringenin in combination with vitamin C and E potentially protects oxidative stress-mediated hepatic injury in cadmium-intoxicated rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. **57**:177-185.

23. Muriel, Pablo., Alba, N., Pérez-Álvarez, V. M., Shibayam, M., and Tsutsumi, V.K. (2001). Kupffer cells inhibition prevents hepatic lipid peroxidation and damage induced by carbon tetrachloride. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **130**:219-226.

24. Chávez, E., Reyes-Gordillo, K., Segovia, J., Shibayama, M., Tsutsumi, V., Vergara, P., Moreno, M.G., and Muriel, Pablo. (2008). Resveratrol prevents fibrosis, NF- κ B activation and TGF- β increases induced by chronic CCl₄ treatment in rats. *Journal of Applied Toxicology*. **28**: 35-43.

25. Reitman, S., and Frankl, A. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic pyruvic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathology*. **28**: 56-63.

26. Berger, L., and Rudolph, G.G. (1963). Alkaline phosphatase. En Standards Method of Clinical Chemistry. Academic Press, New York. 211-221.

- 27.** Glossmann, M., and Neville, D. M. (1972). Gamma- glutamyl transferase in kidney brush border membranes. *FEBS Letters*. **19**: 340-344.
- 28.** Buege, J.A., and Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. **52**:302-310.
- 29.** Cohen, G., Dembiec, D., and Marcus, J. (1970). Measurement of catatase activity in tissue extracts. *Biochemistry*. **34**: 30-38.
- 30.** Sun, Y., Oberley, L.W., and Ying, L. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*. **34**:497-500.
- 31.** Lawrence, R.A., and Burk, R.E. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **71**: 952-958.
- 32.** Seifter, S., Seymour, B., Novic, B., and Montwyler, E. (1950). The estimation of glycogen whit the anthrone regeant. *Archives of Biochemistry*. **25**: 191-199.
- 33.** Rojkind, M. and González, E. (1974). An improved method for determining special radioactivities of proline and hidroxiproline. *Analitycal Biochemistry*. **57**: 1-7.
- 34.** Gordillo, K. (2008). 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 de Doctorado, Departamento de Farmacología, CINVESTAV-IPN. México, D.F. México. 119 p.
- 35.** Kelley, W. N. (1993). Enfoque del paciente con anomalías del hepatograma. En *Medicina Interna*. (2da edición). Editorial Médica Panamericana. Argentina. 703.
- 36.** Pari, L., and Amudha, K. (2011). Hepatoprotective role of naringin on nickel-induced toxicity in male Wistar rats. *European Journal of Pharmacology*. **650**: 364-370.

- 37.** Jayaraman, J., Veerappan, M., and Namasivayam, N. (2009). Potential effect of naringenin on lipid peroxidation and antioxidant status in rats with ethanol-induced hepatotoxicity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **61**: 1383-1390.
- 38.** Brent, J.A., and Rumack, B.H. (1993). Role of free radicals in toxic hepatic injury. *Clinical Toxicology*. **31**: 139-171.
- 39.** Davies, K.J.A. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*. **50**: 279–289.
- 40.** Al-Rejaie, S.S., Abuhashish, H.M., Al-Enazi, M.M., Al-Assaf, A.H., Parmar, M.Y., and Ahmed, M.M. (2013). Protective effect of naringenin on acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *World Journal Gastroenterology*. **34**: 5633-5644.
- 41.** Hermenean, A., Ardelean, A., Stan, M., Herman, H., Mihali, C.V., Costache, M., and Dinischiotu, A. (2013). Protective effects of naringenin on carbon tetrachloride-induced acute nephrotoxicity in mouse kidney. *Chemico-Biological Interactions* **2**:138-47.
- 42.** Du, G., Jin, L., Han, X., Song, Z., Zhang, H., and Liang, W. (2009). Naringenin: a potential immunomodulator for inhibiting Lung fibrosis and metastasis. *Cancer Research*. **69**:3205-3212.
- 43.** Yang, Y., Xu, Y., Xia, T., Chen, F., Zhang, C., Liang, W., Lai, L., Fang, X.(2011). A single-molecule study of the inhibition effect of naringenin on transforming growth factor- β ligand–receptor binding. *Chemical Communications*. **47**:5440-5442.