



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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**“Estudio del efecto de la quercetina sobre los cambios bioquímicos e histológicos
inducidos en hígado de rata tras la exposición a tetracloruro de carbono (CCl₄)”**

TESIS

Que presenta

I.B.Q. LUIS FRANCISCO VÁZQUEZ FLORES

Para Obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Director de Tesis: Dr. Pablo Muriel de la Torre

México, Distrito Federal

Diciembre, 2014

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: **513921.**

Agradecimientos

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), por el apoyo y la oportunidad brindados para el desarrollo de mis estudios de posgrado y con ello contribuir en mi crecimiento tanto profesional como personal.

A mis padres, por la vida y su confianza, por caminar conmigo y apoyar todos y cada uno de mis proyectos, a mi hermano Octavio porque pese el tiempo y las circunstancias su presencia y soporte siempre han sido latentes, y a mi tía Lilia, a quien reitero mi más sincero agradecimiento pues sus acciones y apoyo para conmigo continúan trascendiendo más que mil palabras.

Al Dr. Pablo Muriel por brindarme la oportunidad de colaborar en su equipo de investigación, por la confianza depositada en mí para la realización del presente proyecto, por sus enseñanzas, su paciencia y el apoyo brindado. A las Doctoras Mineko Shibayama y Liliana Favari por aceptar ser mis sinodales, por sus observaciones, consejos y el tiempo brindado para fortalecer los frutos de la investigación, en verdad muchas gracias.

A mis compañeros de generación y del laboratorio, me gustaría nombrar a cada uno de ellos, pero dadas las pequeñas líneas destinadas a este apartado, me limito a decirles que agradezco su apoyo técnico, académico, y sobre todo la compañía, su confianza, los consejos, los buenos momentos y todo lo que contribuyó a sentirme augusto en lo que se convirtió en mi segundo hogar en los últimos dos años y medio; lo reitero, sinceramente muchas gracias.

La colaboración de las Lic. en Enf. Rosa E. Flores Beltrán y Laura Dayana Buendía, de la Q.F.B. Silvia Galindo Gómez, de la Hidrobióloga Teresa García Camacho y de los C. Benjamín Salinas H. y L. Ramón Hernández, su asistencia técnica fue importante para el desarrollo y conclusión de la presente investigación.

Finalmente, agradezco al personal técnico de la UPEAL del Cinvestav-IPN: M.V.Z. Benjamín Chávez Álvarez, M.V.Z. Ricardo Gaxiola Centeno, y al M.V.Z. Rafael Leyva Muñoz.

Luis F. Vázquez Flores

Índice general

Índice general	I
Índice de figuras	IV
Índice de tablas	VI
Resumen	VII
Abstract.....	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Anatomía del hígado</i>	1
1.2. <i>Fisiología del hígado</i>	3
1.3. <i>Biología celular del hígado</i>	4
1.3.1. Hepatocitos	4
1.3.2. Colangiocitos	6
1.3.3. Células endoteliales.....	7
1.3.4. Células estelares hepáticas	8
1.3.5. Células de Kupffer	9
1.3.6. Células de Pit	10
1.4. <i>Daño hepático</i>	11
1.4.1. Fibrosis hepática.....	12
1.4.2. Cirrosis hepática	13
1.4.2.1. Biología celular y molecular de la cirrosis hepática	14
1.5. <i>Modelos experimentales de daño hepático</i>	19
1.5.1. Intoxicación por xenobióticos	19

1.5.1.1.	Tetracloruro de carbono (CCl ₄) y tioacetamida (TAA)	19
1.5.1.2.	D-galactosamina (DGal)	21
1.5.1.3.	Lipopolisacárido (LPS)	22
1.5.2.	Obstrucción biliar	23
2.	ANTECEDENTES.....	25
2.1.	<i>Radicales libres y estrés oxidativo</i>	25
2.2.1.	Flavonoides.....	26
2.2.1.1.	Quercetina (Q)	27
2.2.1.1.1.	Farmacocinética de la Q	29
2.2.1.1.2.	La Q como hepatoprotector	30
3.	JUSTIFICACIÓN.....	34
4.	OBJETIVOS.....	35
4.1.	<i>Objetivo general</i>	35
4.2.	<i>Objetivos particulares</i>	35
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
5.1.	<i>Reactivos</i>	36
5.2.	<i>Modelo de daño y tratamiento de los animales</i>	36
5.3.	<i>Determinaciones Bioquímicas</i>	38
5.3.1.	Fosfatasa alcalina (ALP)	38
5.3.2.	Gamma-glutamil transpeptidasa (γ -GTP).....	40
5.3.3.	Alanina aminotransferasa (ALT)	41
5.3.4.	Glutati3n reducido (GSH)	43
5.3.5.	Gluc3geno	45
5.3.6.	Col3gena	48
5.4.	<i>Estudios histol3gicos</i>	52

5.4.1.	Tinción de hematoxilina y eosina (H&E)	52
5.4.2.	Tinción tricrómica de Masson	53
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
6.1.	<i>Enzimas hepáticas</i>	55
6.2.	<i>Glutación reducido</i>	61
6.3.	<i>Glucógeno</i>	63
6.4.	<i>Colágena y posible papel fibrolítico de la Q</i>	67
7.	CONCLUSIONES.....	72
7.1.	<i>Conclusiones particulares</i>	72
7.2.	<i>Conclusión general</i>	72
8.	APÉNDICE. Curvas de calibración	73
8.1.	<i>Fosfatasa alcalina</i>	73
8.2.	<i>Gamma-glutamil transpeptidasa</i>	74
8.3.	<i>Alanina aminotransferasa</i>	75
8.4.	<i>Glutación reducido</i>	76
8.5.	<i>Colágena</i>	77
9.	BIBLIOGRAFÍA	79

Índice de figuras

Figura 1. Anatomía del hígado	1
Figura 2. Esquema representativo del lobulillo hepático clásico o de Kiernan	2
Figura 3. Dirección del flujo sanguíneo y biliar en el lobulillo hepático clásico	3
Figura 4. Morfología de los hepatocitos	5
Figura 5. Proceso de activación de las células estelares hepáticas (HSC)	10
Figura 6. Participación del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) en el proceso de fibrogénesis	16
Figura 7. Papel del inhibidor de la activación de plasminógeno tipo 1 (PAI-1) en la cascada de fibrólisis	17
Figura 8. Amplificación de la señal fibrogénica del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) por acción del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF)	19
Figura 9. Efecto citotóxico del tetracloruro de carbono (CCl ₄) y la tioacetamida (TAA)	21
Figura 10. Eventos celulares asociados a la hepatotoxicidad de la D-galactosamina	22
Figura 11. Acción de radicales libres	26
Figura 12. Estructura química fundamental de los flavonoides	27
Figura 13. Estructura química de la quercetina	27
Figura 14. Estructura química de la taxifolina	28
Figura 15. Farmacocinética de la quercetina	29
Figura 16. Efecto hepatoprotector de la administración de quercetina (Q)	31
Figura 17. Efecto de la quercetina (Q) en los niveles del factor nuclear kappa B (NF- κ B)..	32
Figura 18. Efecto antiapoptótico de la quercetina (Q)	32
Figura 19. Reacción de la fosfatasa alcalina (ALP) en presencia de p-nitrofenil-fosfato.....	39
Figura 20. Generación del cromóforo p-nitroanilina tras la actividad de la gamma-glutamyl transpeptidasa (γ -GTP) sobre el sustrato γ -glutamyl-p-nitroanilida.....	41
Figura 21. Fundamento de la reacción colorimétrica para determinar la actividad de la enzima alanina aminotransferasa (ALT)	42

Figura 22. Papel del glutatión reducido (GSH) en la regeneración de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx)	44
Figura 23. Reacción de condensación entre el furfural y la antrona.....	46
Figura 24. Modificaciones postraduccionales en la biosíntesis de colágena	49
Figura 25. Producción de pirrol.....	50
Figura 26. Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) en el modelo de daño agudo de CCl ₄ ...	56
Figura 27. Actividad de la gamma-glutamil transpeptidasa (γ -GTP) en el modelo de daño agudo de CCl ₄	56
Figura 28. Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) en el modelo de daño crónico de CCl ₄ .	57
Figura 29. Actividad de la gamma-glutamil transpeptidasa (γ -GTP) en el modelo de daño crónico de CCl ₄	57
Figura 30. Actividad de la alanina aminotransferasa (ALT) en el modelo de daño agudo de CCl ₄	58
Figura 31. Actividad de la alanina aminotransferasa (ALT) en el modelo de daño crónico de CCl ₄	59
Figura 32. Tinción de hematoxilina y eosina (H&E), modelo de daño crónico.....	60
Figura 33. Niveles hepáticos de glutatión reducido (GSH) en el modelo de daño crónico .	61
Figura 34. Niveles hepáticos de glutatión reducido (GSH) en el modelo de daño agudo ...	62
Figura 35. Contenido hepático de glucógeno en el modelo de daño crónico	64
Figura 36. Contenido hepático de glucógeno en el modelo de daño agudo.....	65
Figura 37. Modelo de la acción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) como agente causal de la resistencia hepática a la insulina.....	67
Figura 38. Tinción tricrómica de Masson, modelo de daño crónico.....	69
Figura 39. Contenido hepático de colágena en el modelo de daño crónico.	70

Índice de tablas

Tabla 1. Modelo de daño agudo de CCl ₄	37
Tabla 2. Modelo de daño crónico de CCl ₄	37
Tabla 3. Determinación de la ALT	43
Tabla 4. Curva de calibración de la ALP	73
Tabla 5. Curva de calibración de la γ -GTP	74
Tabla 6. Curva de calibración de la ALT	76
Tabla 7. Curva de calibración del GSH	77
Tabla 8. Curva de calibración de la HP	78

Resumen

El hígado es uno de los órganos más versátiles del cuerpo humano, está involucrado en diversos procesos metabólicos y debido a su proximidad anatómica al suplemento sanguíneo y al tracto digestivo y su contribución en el proceso de desintoxicación sanguínea, es un blanco potencial para sufrir afectaciones tanto a nivel anatómico como fisiológico. Un ejemplo de tales desórdenes es el trastorno conocido clínicamente como **cirrosis hepática**, que de acuerdo a la Dirección General de Información en Salud, en México mueren aproximadamente 30 mil personas al año a causa de esta patología.

Pese al impacto en la salud pública derivado de la cirrosis hepática, hasta hoy no existe una terapia efectiva para tratar tanto los síntomas como sus consecuencias, por ello, el objetivo central de la presente investigación fue evaluar si la administración de quercetina (Q) es capaz de prevenir y revertir el daño hepático causado por la administración aguda o crónica de CCl₄.

Ratas Wistar macho se dividieron aleatoriamente en los siguientes grupos: **I)** control; **II)** CCl₄ (v.o.) 4g/kg; **III)** Q (i.p.) 50 mg/kg/7 días, en el día 7 las ratas recibieron dos dosis de Q más CCl₄ (v.o.) 4g/kg; **IV)** CCl₄ (i.p.) 400 mg/kg/3 veces/semana/8 semanas; **V)** CCl₄ (i.p.) 400 mg/kg/3 veces/semana/8 semanas, a partir de la novena semana se administró Q (v.o.) 50 mg/kg/día/4 semanas; **VI)** CCl₄ (i.p.) 400 mg/kg/3 veces/semana/8 semanas, a partir de la novena semana se administró petrolato (v.o.) 1 mL/día/4 semanas. Concluido el periodo de administración, las ratas se sacrificaron a las 24 (daño agudo) ó 72 (daño crónico) h. A partir de las muestras sanguíneas se obtuvo el plasma para medir la actividad enzimática de fosfatasa alcalina (ALP), γ -glutamil transpeptidasa (γ -GTP) y alanino aminotransferasa (ALT). Las muestras de hígado se emplearon para las tinciones de hematoxilina y eosina (H&E) y tricrómica de Masson, así como para cuantificar el glutatión reducido (GSH), el glucógeno y la colágena.

La Q pudo prevenir y revertir la colestasis y necrosis causadas por el CCl₄, asimismo preservó la función del sistema antioxidante al mantener y restablecer los niveles de GSH cercanos a los del

grupo control. Aunque el flavonoide fue incapaz de prevenir el decremento en la reserva de glucógeno tras la dosis única de CCl_4 , su administración resultó útil para recuperar la capacidad biosintética del hígado al contrarrestar el descenso en la cantidad de glucógeno inducido por el hepatotóxico. Finalmente, es posible que el flavonoide actúe como un agente fibrolítico al contribuir en la recuperación de la arquitectura de los hepatocitos y promover un descenso en la deposición del tejido fibrótico, medido como cantidad de colágena.

Tomando en conjunto los resultados obtenidos en el presente proyecto, se puede concluir que la Q es capaz de prevenir y revertir parcialmente, los cambios bioquímicos e histológicos causados por la exposición a CCl_4 . Es pertinente sugerir que aumentar la dosis y/o el periodo de tratamiento con el flavonoide pudiera mejorar los efectos benéficos evidenciados en el presente estudio, haciendo posible el uso de este compuesto para el tratamiento de las hepatopatías en el humano.

Abstract

The liver is related with multiple metabolic processes and plays an important role in the blood detoxification. Because this characteristics and its anatomic position, the liver is commonly affected by etiologic agents which can produce anatomic and physiological alterations that finally induce chronic diseases as liver cirrhosis. According to the statistics, in Mexico every year around 30 000 patients die from this pathology.

In spite of the economic and health problems related with the cirrhosis there is not an effective therapeutic strategy to the treatment of its symptoms and consequences as the jaundice, hepatorenal syndrome and hepatic encephalopathy. Take into account the aforementioned, the aim of this project was to determine the effect of quercetin flavonoid (Q) to prevent and reverse the liver damage induced by acute or chronic treatment with CCl₄.

Male Wistar rats were randomized into the groups: **I**) control; **II**) CCl₄ (p.o.) 4g/kg; **III**) Q (i.p.) 50 mg/kg/7 days, in the 7th day the rats received two doses of Q and CCl₄ (p.o.) 4g/kg; **IV**) chronically intoxicated with CCl₄ (i.p.) 400 mg/kg/3 times/week/8 weeks; **V**) chronically intoxicated with CCl₄ (i.p.) 400 mg/kg/3 times/week/8 weeks and from 9th week on animals were treated with Q (p.o.) 50 mg/kg/day/4 weeks; **VI**) chronically intoxicated with CCl₄ (i.p.) 400 mg/kg/3 times/week/8 weeks and from 9th week on animals were treated with mineral oil (p.o.) 1 mL/day/4 weeks. 24 h (acute damage) or 72 h (chronic damage) after the last dose of CCl₄, the effect of Q was evaluated with the enzymatic activity of alkaline phosphatase (ALP), γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) and alanine aminotransferase (ALT) in blood plasma samples. To analyse the morphological changes produced in the hepatic lobule, hematoxylin and eosin (H&E) and Masson's stains were performed. Finally, liver samples were used to determine the reduced glutathione (GSH), glycogen and collagen content.

According to the biochemical and histological analysis the antioxidant Q prevented and reversed the cholestasis and necrosis of the hepatocytes induced by CCl₄, also showed the ability to

suppress the changes in the GSH levels caused by liver damage. The flavonoid compound was able to recover the glycogen storage when the animals were chronically treated with the xenobiotic, however, the dose and/or the period of time of the treatment with Q was not enough to avoid the alteration in the biosynthetic function of the liver produced by a simple but significant dose of CCl₄. Lastly, there is the possibility that the antioxidant molecule acts as a fibrolytic agent because it reduced the collagen content and recovered the normal architecture of the hepatocytes, reversing the excessive degree of deposition of fibrotic tissue.

Summarizing, the flavonoid counteracts the characteristic changes of the liver damage induced by acute and chronic exposure to carbon tetrachloride. According to the results, it is important to point out that the increase of the dose and/or the length of treatment could improve the anatomic and physiologic benefits caused by the Q, making possible its use as therapeutic tool to treat human liver diseases.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Anatomía del hígado

El hígado se encuentra ubicado en el cuadrante superior derecho, por debajo del diafragma y por encima del estómago, cubriendo a éste casi en su totalidad (figura 1). Se encuentra cubierto por una matriz de fibroblastos, colágena y pequeños vasos sanguíneos denominada Cápsula de Glisson [1, 2].

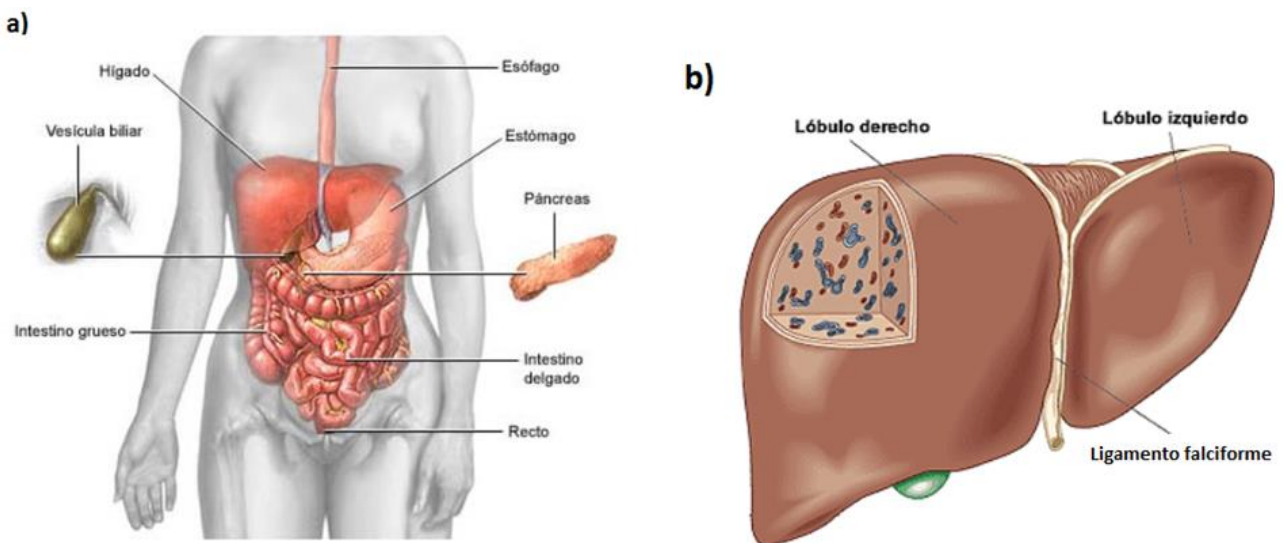


Figura 1. Anatomía del hígado. a) El esquema ilustra la posición del hígado entre el diafragma y el estómago.

b) Lóbulos izquierdo y derecho del hígado separados por el ligamento falciforme.

Tomado de <http://www.bing.com/images/searc> [3].

Después de la piel es considerado el órgano más grande del cuerpo humano, con un peso aproximado de 1.0 a 1.4 kg en un adulto sano, variando según la edad, sexo y raza. Anatómicamente se puede considerar que el hígado está conformado por los lóbulos derecho, que representa un 65% del volumen total, y el izquierdo de menor tamaño [1].

Es un órgano altamente irrigado con la capacidad de almacenar aproximadamente el 12% del volumen sanguíneo total. Recibe sangre de dos fuentes principales: la **vena porta**, que lleva la sangre desde el bazo y las venas mesentéricas inferior y superior hasta el hígado. La sangre

transportada por esta vía es rica en nutrientes y representa aproximadamente el 75% del suplemento del parénquima hepático; mientras que la **arteria hepática**, la cual transporta sangre rica en oxígeno, provee sólo el 25% del suministro sanguíneo. Ambas aferentes ramifican en la masa intrahepática, formando, de acuerdo con el modelo de Kiernan (1833), una red capilar que delimita las células del parénquima en un prisma de geometría hexagonal, considerando este espacio como la unidad funcional del hígado, **denominada lobulillo hepático clásico**. En el lobulillo de Kiernan los hepatocitos están dispuestos en torno a la vena central, y en tres de los seis vértices del hexágono confluyen el **conducto biliar**, la vena porta y la arteria hepática, integrando con ello la **triada portal** (figura 2) [1, 4].

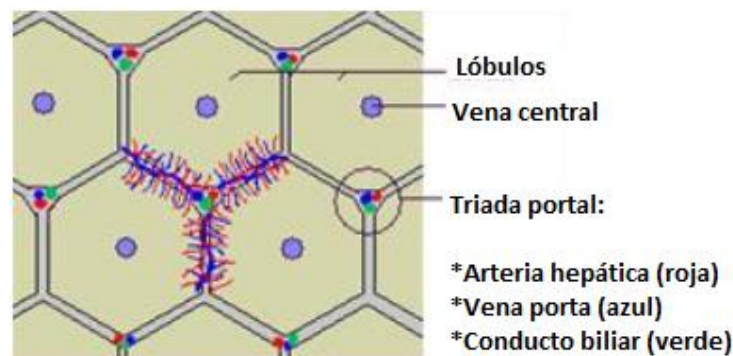


Figura 2. Esquema representativo del lobulillo hepático clásico o de Kiernan

Tomado de <http://handresen.perulactea.com/2009/02/24/capítulo-8-disfunción-hepática> [5].

La disposición de los hepatocitos y la triada portal, contribuye con la dinámica fisiológica del hígado al permitir que la sangre fluya desde las aferentes (vena porta y arteria hepática) hacia la vena central, favoreciendo con ello el intercambio de nutrientes desde los sinusoides hacia los hepatocitos y de metabolitos desde las células que constituyen el parénquima hacia la sangre que será conducida, a través de la vena central, a la vena cava inferior y de ésta al resto del organismo (figura 3). Por el contrario, la bilis producida por los hepatocitos es secretada en la luz de los canalículos biliares (delimitados por la membrana canalicular), que son drenados por los conductos biliares primarios, también llamados canales de Hering (constituidos por hepatocitos y colangiocitos pequeños), los cuales desembocan en el conducto biliar que constituye la triada portal [1, 4].

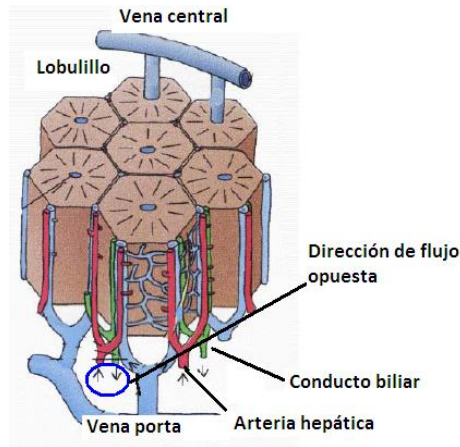


Figura 3. Dirección del flujo sanguíneo y biliar en el lobulillo hepático clásico.

La sangre viaja a través de las aferentes (vena porta y arteria hepática) en dirección a la vena central y la bilis lo hace en dirección opuesta, desde la vena central hacia la triada portal.

Tomado de Demetris, 2008 [1].

1.2. Fisiología del hígado

El hígado es una máquina metabólica altamente dinámica, cuya fisiología permite al organismo mantener la homeostasis de la glucosa en sangre, actuando ante las señales hormonales mediadas por la insulina, que indican la necesidad de almacenar los excedentes de este azúcar en moléculas complejas de glucógeno; o bien, en respuesta al glucagón, desencadenar la glucogenólisis a fin de abastecer de glucosa a los tejidos que al momento demanden un alto consumo energético [6].

No obstante, la función del hígado no se limita al mantenimiento de los niveles circulantes de glucosa. Este órgano juega un papel importante en el proceso de la desintoxicación sanguínea al fagocitar partículas infecciosas que consiguen atravesar las paredes del tracto digestivo y circulan en la sangre transportada por la vena porta [2, 7].

Asimismo, participa activamente en los procesos de biotransformación de xenobióticos tales como fármacos y etanol; desempeñando esta función las oxigenasas dependientes de citocromo (denominadas CYP450), las flavin monooxigenasas (denominadas FMO) y las enzimas involucradas

en las reacciones de conjugación o fase II (UDP glucuronil transferasas, sulfottransferasas y metiltransferasas, por citar algunas) [8].

Además, está implicado en la síntesis del fibrinógeno (factor de coagulación), la ceruloplasmina (encargada de transportar, en plasma, aproximadamente el 95% del cobre) y la albúmina sérica, proteína principal en sangre involucrada en el transporte de bilirrubina no conjugada, algunos fármacos y hormonas tiroideas y liposolubles. Es considerado el principal reservorio de hierro en mamíferos, incluido el hombre, e investigaciones recientes destacan su función en la regulación de la homeostasis sistémica de este metal [9 – 11].

En cuanto a la injerencia del hígado en el metabolismo de lípidos y ácidos grasos, se puede citar la capacidad de este órgano tanto en la síntesis de colesterol como en su biotransformación a ácidos biliares conjugados, contribuyendo de esta manera con el mantenimiento adecuado de los niveles de este lípido. A su vez, los ácidos biliares derivados de dicho esteroles forman parte de la bilis sintetizada y secretada por los hepatocitos, y que se almacena en la vesícula biliar hasta liberarse en la segunda porción del duodeno para emulsificar las grasas y favorecer con ello su digestión [2, 12]. Tomando en cuenta su tamaño y la función desempeñada en el proceso digestivo por uno de sus productos de desecho (secreción biliar), el hígado es considerado la glándula más grande del organismo [2].

1.3. Biología celular del hígado

Para desempeñar las múltiples funciones citadas, el hígado está constituido por un conjunto de células de diversa morfo y fisiología.

1.3.1. Hepatocitos

Del total de células hepáticas, los hepatocitos representan aproximadamente un 60% y convencionalmente se les ha definido como las células que integran el parénquima del hígado.

Dada la intensa actividad metabólica desempeñada por el hígado, cada hepatocito posee, en promedio, 1700 mitocondrias, 370 peroxisomas y 250 lisosomas. Aproximadamente, el 15% del volumen celular es ocupado por agregados del retículo endoplásmico rugoso y liso, siendo este último el sitio principal en el que se localizan las enzimas y moléculas involucradas en la síntesis y degradación del glucógeno [4, 13].

Los hepatocitos son células polarizadas en las que aproximadamente el 35% de la superficie celular se pliega formando múltiples microvellosidades proyectadas hacia el **espacio de Disse**, manteniendo con ello íntimo contacto con los sinusoides; esta región está especializada en la extracción de moléculas procedentes de la sangre y en la liberación de sustancias metabolizadas por el hígado, las cuales serán eliminadas a través de las heces u orina (por ejemplo, metabolitos de fármacos), o cumplirán una función particular en algún tejido u órgano (ejemplo lipoproteínas). Un 50% de su membrana plasmática está en contacto con células adyacentes a través de complejos de adhesión intercelulares, excepto en una pequeña porción, de apenas un 13%, en la que las membranas de hepatocitos contiguos se pliegan para dar origen a los canalículos biliares (figura 4) [4].

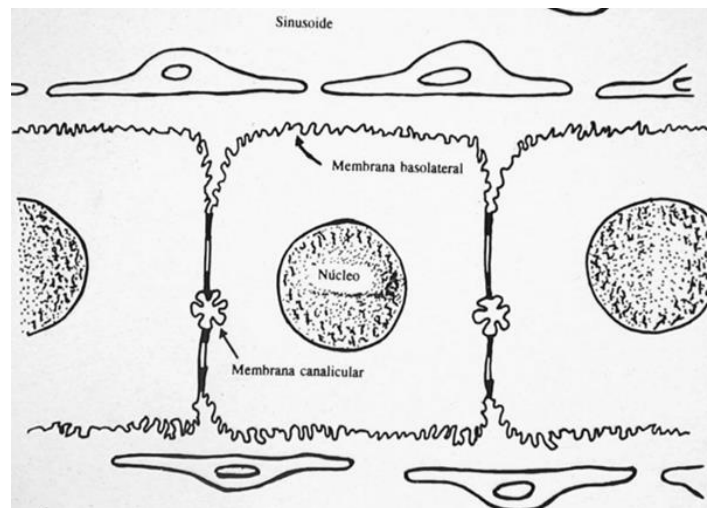


Figura 4. Morfología de los hepatocitos.

En el esquema es posible apreciar las membranas canalicular y basolateral, y que gracias a los pliegues (microvellosidades) de esta última existe un íntimo contacto entre los hepatocitos y los sinusoides.

1.3.2. Colangiocitos

El conducto biliar intrahepático es una estructura tubular que se extiende desde los conductos hepáticos derecho e izquierdo hasta los canales de Hering, localizados en la proximidad del parénquima y del sistema portal [14].

El conducto biliar intrahepático está conformado por células epiteliales denominadas colangiocitos [4]. Estas células están rodeadas del plexo vascular que deriva de la arteria hepática y desemboca en los sinusoides hepáticos, y cuentan con una extensa inervación de neuropéptidos. Los colangiocitos son células polarizadas de morfología columnar o cuboide, más pequeñas que los hepatocitos y con un menor número de organelos, aunque poseen una cantidad abundante de filamentos del citoesqueleto. La superficie membranal forma numerosas microvellosidades y frecuentemente se encuentran vesículas pinocíticas [14].

Los colangiocitos están especializados en los fenómenos de secreción de solutos y reabsorción de agua, ambos altamente ligados al proceso de síntesis biliar. Tanto la secreción de solutos como la reabsorción de agua ocurre de manera no uniforme a lo largo del ducto biliar y depende de las señales hormonales (respuesta a secretina o somatostatina) o de transportadores (por ejemplo intercambiador H^+/HCO_3^- o Na^+/Cl^-). La glicoproteína biliar I, la β_2 -microglobulina, γ -glutamil transpeptidasa (γ -GTP) e integrina VLA 3 son algunas de las proteínas que se emplean como marcadores bioquímicos para identificar, de manera inequívoca, a las células del epitelio biliar. De hecho, algunos de estos marcadores son utilizados en el diagnóstico diferencial entre carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma [4, 14].

Las células del epitelio biliar tienen capacidad para absorber ácidos biliares, bilirrubina conjugada y glucosa. Además, cuentan con enzimas que participan en las reacciones de biotransformación de la fase II, contribuyendo con las reacciones de desintoxicación; sintetizan proteínas de la matriz extracelular (MEC), específicamente laminina y colágena tipo IV, y colesterol. Finalmente, se ha

sugerido la participación de los colangiocitos en la respuesta inmune, mediada particularmente por el péptido inmunosupresor timosina $\beta 4$ y la inmunoglobulina A (IgA) [14].

1.3.3. Células endoteliales

Las células endoteliales que forman parte del tejido hepático, se diferencian de las encontradas en otros capilares en tres aspectos básicos: carecen de membrana basal, se encuentran altamente fenestradas y presentan una intensa actividad pinocítica, contribuyendo con las células de Kupffer y de Pit en el sistema de defensa del hígado [7, 15].

Junto con las células de Kupffer, las células estelares y las de Pit, las células endoteliales constituyen la estructura vascular denominada **sinusoide hepático**. Los sinusoides se distribuyen entre las placas de hepatocitos desde el tracto portal hasta la vena central, y es precisamente en los sinusoides en donde la sangre procedente de la arteria hepática y de la vena porta se mezcla y se filtra a través de las fenestraciones de las células endoteliales. Además, los sinusoides hepáticos ofrecen una extensa área de superficie endotelial que facilita la interacción con las células inmunes circulantes, y son el sitio principal de intercambio de solutos entre la sangre y el parénquima hepático [7, 15, 16].

El diámetro de las células endoteliales oscila de 4 μm en el área portal a 5.5 μm cerca de la vena central, debido a ello y tomando en cuenta que existe un mayor número de fenestraciones en la zona centrolobulillar (cerca de la vena central) respecto de la zona periportal (cerca de la triada portal), a pesar de que en esta región las fenestraciones son de mayor tamaño, el endotelio centrolobulillar presenta mayor porosidad [7, 15].

Puesto que los eritrocitos y leucocitos son de mayor tamaño, ambos grupos celulares sufren una distorsión al pasar a través de los sinusoides, proceso referido como “masaje endotelial”, el cual permite un intercambio eficiente de solutos desde la sangre hacia el espacio de Disse, hendidura localizada entre los sinusoides y los hepatocitos adyacentes [15, 16].

Las células endoteliales hepáticas poseen enzimas oxidativas (de la familia de citocromos P450) y postoxidativas (epóxido hidrolasas y glutatión transferasas), contribuyendo en los procesos de biotransformación de sustancias xenobióticas. Asimismo, se ha demostrado su capacidad como células presentadoras de antígenos de origen bacteriano, al contar con moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) y participar en la producción de interleucina 1 (IL-1) después del procesamiento de los antígenos. La intervención de estas células en el reconocimiento y procesamiento de antígenos tiende a evitar la inflamación hepática derivada de la presencia de endotoxinas en la sangre transportada por la vena porta [15].

1.3.4. Células estelares hepáticas

En 1876, Carl Kupffer, mediante la tinción de cloruro de oro identificó por primera vez un conjunto de células de morfología similar a una estrella (figura 5). Por su localización en torno a los capilares de los sinusoides hepáticos, Kupffer les asignó funciones vasculares. Más tarde, en 1951, Ito las describió como células con capacidad para almacenar lípidos y en 1958 Suzuki las encontró en el espacio de Disse, aseverando que se encontraban involucradas en la transmisión de impulsos nerviosos hacia los hepatocitos. Por su parte, Kent y Popper, diecisiete años más tarde, demostraron el papel que las células estelares juegan en el desarrollo de la fibrosis hepática [17].

La característica principal de estas células es la presencia de gotículas citoplásmicas de lípidos, particularmente retinoides (vitamina A), en proximidad al núcleo. En condiciones fisiológicas normales se encuentran en estado quiescente, con una baja tasa proliferativa y además de almacenar vitamina A se encargan de producir pequeñas cantidades de laminina y colágena tipo IV (proteínas de la MEC) para formar la membrana basal. Sin embargo, tras el daño de los hepatocitos y la subsecuente activación de las células de Kupffer, las células estelares hepáticas (HSC, por sus siglas en inglés) son estimuladas por especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y citocinas como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , por sus siglas en inglés), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , por sus siglas en inglés). Posterior al estímulo, las HSC son activadas, pierden

su capacidad para almacenar lípidos, incrementan su tasa proliferativa y sufren un proceso de transdiferenciación que las convierte en células similares a miofibroblastos (MF), que se caracterizan por la producción de una gran cantidad de proteínas de la MEC (figura 5) y la capacidad de regular, al menos en parte, el flujo sanguíneo sinusoidal [17 – 20].

1.3.5. Células de Kupffer

Las células de Kupffer (en inglés KC) están involucradas en la endocitosis de células, agentes infecciosos y xenobióticos que circulan en la sangre y llegan a los sinusoides, clasificándose por dichas funciones como macrófagos residentes del hígado. Se encuentran adheridas a la superficie de los sinusoides, localización que les permite entrar en contacto con el flujo sanguíneo y por ende ejercer su función fagocítica [7].

A lo igual que las HSC, las KC se distribuyen de manera desigual a lo largo del lobulillo hepático clásico, encontrando mayor concentración en la región periportal, donde a su vez son células más grandes y de mayor actividad fagocítica con respecto a la región centrolobulillar. Esta disposición no uniforme refuerza la función primordial de los macrófagos, pues la sangre entra al hígado por la zona periportal, por lo tanto, es favorable que ahí se intensifique la purificación del fluido para evitar que lleguen sustancias tóxicas y agentes patógenos a la vena central y en consecuencia se distribuyan al organismo a través de la vena cava inferior [7].

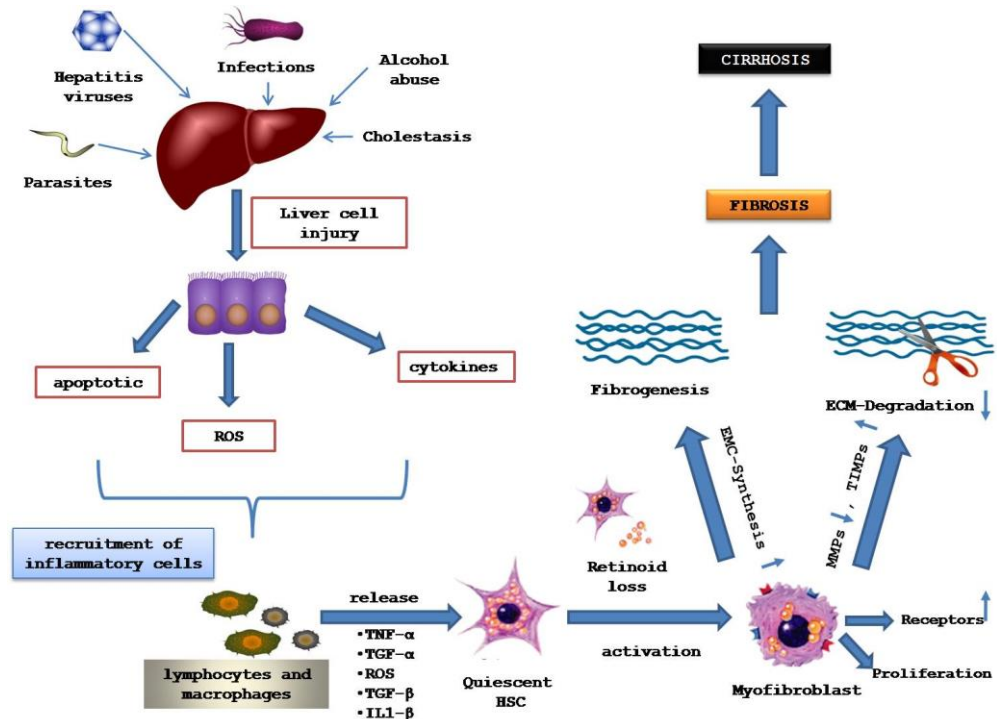


Figura 5. Proceso de activación de las células estelares hepáticas (HSC).

Se identifican las principales moléculas que estimulan a las HSC después el daño hepático: especies reactivas de oxígeno (ROS), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Además puede verse el papel activo de estas células en la fibrogénesis, al adquirir características similares a miofibroblastos.

Tomado de Muriel and Arauz, 2012 [21].

1.3.6. Células de Pit

En la década de los setenta, aplicando la técnica de perfusión-fijación, Wisse y Maems lograron aislar, además de las KC, las células endoteliales y las HSC, linfocitos de gran tamaño antes no visualizados. De acuerdo a la descripción de los autores, las células eran polarizadas, con la mayor parte de los organelos orientados hacia un extremo del núcleo y con pseudópodos, lo que presumía su capacidad locomotora. La presencia de gránulos citoplásmicos similares a semillas o huesos de fruta, motivó a Wisse y colaboradores a nombrarlas células de pit. Estas células están adheridas a la pared sinusoidal, aunque es posible que microvellosidades o pseudópodos atraviesen las fenestraciones distintivas de las células endoteliales hepáticas, lo que les permite entrar en contacto con las células del parénquima (hepatocitos). Tienen la capacidad de expresar marcadores antigénicos tales como CD8⁺, CD5⁻ y asialo-GM1[±] y a partir de cuerpos multivesiculares

desarrollan gránulos densos que almacenan sustancias citotóxicas como la perforina (proteína que forma canales transmembranales en las células blanco) [22].

Los trabajos de Bouwens y colaboradores en 1987, quienes coincubaron una preparación celular enriquecida con células de Pit y una línea celular de linfoma de ratón, revelaron que las células de Pit constituyen la inmunidad celular (natural) del hígado, al actuar como células citotóxicas denominadas asesinos naturales (NK, del inglés natural killer). En concordancia con la función descrita por Bouwens y su equipo de trabajo, se ha propuesto el papel de estas células en la regulación del crecimiento y regeneración de hepatocitos, para actuar como mecanismo de resistencia natural frente a la neoplasia hepática y las infecciones causadas por los virus de hepatitis A y B [22].

1.4. Daño hepático

El hígado, es un blanco potencial para sufrir afectaciones tanto a nivel anatómico como fisiológico, debido a su implicación en diversos procesos metabólicos como la secreción biliar, la biotransformación de xenobióticos como el etanol y fármacos y la síntesis de glucógeno y colesterol, por referir algunos, así como por su proximidad anatómica al suplemento sanguíneo y el tracto digestivo [2, 23].

El daño hepático implica la pérdida en la arquitectura normal del parénquima y consecuentemente un desempeño deficiente de las actividades metabólicas propias del hígado, conduciendo inclusive, a una pérdida de la homeostasis a nivel sistémico. Dentro de los agentes etiológicos que conducen al establecimiento de las alteraciones referidas podemos citar el abuso en el consumo de bebidas alcohólicas, la infección por los virus de la hepatitis, afectaciones en el conducto biliar, o intoxicación por fármacos, por ejemplo el acetaminofén (paracetamol) [24 – 26].

De acuerdo al periodo de exposición frente al agente etiológico, el daño hepático puede clasificarse como agudo (menor a 28 días) o crónico (más de 28 días) [27]. Evidentemente, existen

claras diferencias entre los tipos de daño hepático; mientras que en el daño agudo hay una pérdida masiva de los hepatocitos que constituyen el parénquima, además de una acentuada reacción inflamatoria que está íntimamente relacionada con la infiltración de células de la respuesta inmune y la activación de cascadas inflamatorias intrahepáticas, en el daño crónico, la exposición moderada pero repetida al agente etiológico, por un periodo prolongado, evita la regeneración del tejido, manifestándose un proceso de cicatrización que más tarde conduce a la fibrosis, estado patológico que precede a la **cirrosis hepática**, la cual hasta hoy, es convencionalmente considerada como una enfermedad irreversible [27, 28].

1.4.1. Fibrosis hepática

La fibrosis hepática se define como el estado patológico caracterizado por la acumulación excesiva de proteínas que constituyen la MEC [29]. A nivel mundial, la hepatitis viral crónica es la causa principal de fibrosis hepática, mientras que en los países occidentales, además de este agente causal, la hepatopatía alcohólica y la enfermedad de hígado graso no alcohólico son considerados los principales agentes etiológicos [30].

Las primeras etapas del establecimiento de la fibrosis se caracterizan por la activación de las células inflamatorias propias del hígado y el reclutamiento de células inflamatorias adicionales. Paralelo a ello, existe un aumento en la cantidad de mediadores inflamatorios circulantes, los cuales son liberados no sólo por los hepatocitos dañados sino también por los colangiocitos y las células endoteliales e inflamatorias. Posterior a la iniciación de la reacción inflamatoria, la activación de las HSC denota una etapa crítica entre la transición que involucra la afectación al tejido o su regeneración. Como se explicó en el apartado anterior, las HSC residen en el espacio de Disse y su función principal radica en el almacenamiento de vitamina A; sin embargo, tras su activación, consecuencia del daño a los hepatocitos y estimulación de los macrófagos, estas células se transdiferencian hacia MF con capacidad contráctil y proliferativa, además de ser las principales células responsables de la secreción de proteínas de la MEC (figura 5) [30].

Si persiste la activación de las HSC y la acumulación tanto de elastina como de fibras de colágena tipo I y IV, el resultado neto implica la formación de septos fibróticos y nódulos de regeneración que caracterizan el establecimiento de la cirrosis. Por el contrario, la producción del ligando inductor de apoptosis relacionada con TNF- α (TRAIL, en inglés) y de la metaloproteinasa 9 (MMP-9), por los macrófagos tanto residentes en el tejido hepático (KC) como los reclutados después del daño hepático, contribuye con la apoptosis de las HSC activadas y la remodelación de la MEC, favoreciendo la regeneración del tejido y con ello a la resolución de la fibrosis [30].

1.4.2. Cirrosis hepática

La cirrosis hepática es considerada como el estadio final resultante de una o varias patologías crónicas que afectan la anatomía y fisiología hepáticas, y se considera a la fibrosis como antecedente directo de esta hepatopatía [28].

La etiología de la cirrosis es función del área geográfica, en África y Asia los virus de las hepatitis B y C son las principales causas de cirrosis, mientras que en países desarrollados como Estados Unidos, el abuso en el consumo de alcohol es el principal agente causal [31]. No obstante, la cirrosis hepática tiene otros agentes causales tales como la enfermedad de hígado graso de origen no alcohólico (en inglés NAFLD), patologías hereditarias como la enfermedad de Wilson y la hemocromatosis, la hepatitis autoinmune, la cirrosis biliar primaria, y en años recientes, los desórdenes alimenticios asociados con el abuso en el consumo de alimentos ricos en grasas y carbohidratos son considerados como factores de riesgo al desencadenar un cuadro de obesidad, que en algunos casos detona en el desarrollo de hígado graso y consecuentemente, en cirrosis [28, 32].

Cuando se alcanza un estado cirrótico, el hígado pierde su arquitectura y función normales, distinguiéndose la presencia de nódulos fibróticos, un aumento en la resistencia del flujo sanguíneo hacia el hígado (hipertensión portal), pérdida de la capacidad para almacenar glucógeno, sintetizar colesterol y secretar bilis [33].

1.4.2.1. Biología celular y molecular de la cirrosis hepática

El establecimiento de la cirrosis involucra una compleja interacción entre los diferentes tipos celulares que forman el tejido hepático y moléculas, entre las que se incluyen radicales libres y factores de crecimiento.

Los hepatocitos son las principales células afectadas por el agente etiológico, tomando en cuenta que estos desempeñan la mayoría de las funciones metabólicas y ocupan más del 50% del volumen total del hígado. Posterior a la exposición al citotóxico, tanto la función de los organelos como la integridad de la membrana de los hepatocitos se ve comprometida, lo que se traduce en la necrosis y la muerte celular programada (apoptosis) de éstos. La apoptosis mediada por receptor es el mecanismo predominante después del daño hepático e implica la activación del receptor al factor de necrosis tumoral 1 (TNFR-1) o bien el receptor al ligando Fas (fas/CD95), los cuales frecuentemente se encuentran sobreexpresados durante la fibrosis hepática. Es importante señalar, que ambos receptores poseen actividad proinflamatoria al intervenir en la expresión de quimosinas y citocinas que favorecen la inflamación, así como en el reclutamiento de neutrófilos [20, 34].

Los cuerpos apoptóticos son ingeridos y degradados por las KC, las cuales resultan ser la principal fuente de citocinas fibrogénicas, TGF- β , por ejemplo y factores de crecimiento, principalmente PDGF, que estimularán la transdiferenciación de las HSC hacia MF. Asimismo, las KC refuerzan el proceso inflamatorio, producen los ligandos Fas y TNF- α que intervienen en los procesos apoptóticos y secretan un grupo de gelatinasas que degradan la colágena tipo IV, desencadenando el cambio fenotípico de las HSC [28, 29].

Por su parte, las células endoteliales también juegan un papel importante en el desarrollo de la fibrosis y subsecuentemente de la cirrosis. Sin importar las causas que conducen al establecimiento de la cirrosis, la defenestración de las células endoteliales y la presencia de la membrana basal

subendotelial (capilarización de los sinusoides), son características distintivas de un hígado cirrótico, y se consideran las principales causas del fallo hepático global, al alterar el intercambio bidireccional de solutos entre las células que constituyen el parénquima y la sangre que circula a través de los sinusoides. Además, ambos fenómenos (defenestración y capilarización) suponen un factor clave en el inicio de la fibrosis perisinusoidal al alterar el metabolismo del retinol. De hecho, en apoyo a la aseveración anterior, Roger y colaboradores demostraron, en 1992, que estas alteraciones estructurales frenaban el consumo de retinol por el parénquima hepático y su posterior almacenamiento en las células HSC, promoviendo con ello la transdiferenciación de estas últimas a MF [35].

No obstante la participación de las demás células hepáticas, diversos autores han definido a las HSC como las “protagonistas” en el proceso de fibrogénesis y en consecuencia en el desarrollo del estado cirrótico. En párrafos anteriores se ha expuesto que las HSC son estimuladas por el TGF- β y el PDGF, favoreciendo su transdiferenciación hacia células fenotípicamente similares MF. Entre otras propiedades, las HSC activadas son células con una elevada tasa proliferativa, caracterizadas por una disminución significativa en el contenido de vitamina A, un incremento en la sensibilidad de respuesta ante estímulos tanto paracrinos como autocrinos (por ejemplo, respuesta al TGF- β producido tanto por las KC como por las propias HSC activadas) y por adquirir la capacidad contráctil al expresar alfa actina de músculo liso (α -SMA) (figura 5) [36].

Durante la cirrosis existe un notorio desbalance en la remodelación de la MEC debido principalmente al incremento en la síntesis de colágena, la regulación a la baja en secreción y actividad de metaloproteinasas (MMP's), proteasas de la MEC, y la paralela sobreexpresión de los inhibidores de la degradación de colágena, denominados inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP, de sus siglas en inglés). Los eventos descritos están mediados por la acción que ejerce el TGF- β sobre las HSC (figura 5) [29, 36].

La señal mediada por el TGF- β inicia cuando esta citocina se une a su receptor transmembranal cinasa de serina/treonina tipo II (TGFR II), posteriormente, dicho receptor transfosforila el domino

GS del receptor transmembranal cinasa de serina/treonina tipo I (TGFRI), formando un complejo heterodimérico. El receptor TGFRI fosforila a un grupo de proteínas reguladas por receptor que se denominan SMADS, particularmente las isoformas 2 y 3 (Smad2/Smad3). Una vez fosforilada, la proteína Smad2/3 se separa del receptor TGFRI y transloca al núcleo unida a la isoforma Smad4 (o co-Smad). En el núcleo, el complejo Smad2/3 - Smad4 actúa como factor transcripcional con la capacidad de unirse a sitios promotores y en conjunto con coactivadores o corepresores de la transcripción promueve o inhibe, según el caso, la expresión de genes blanco (figura 6) [28, 36 – 38].

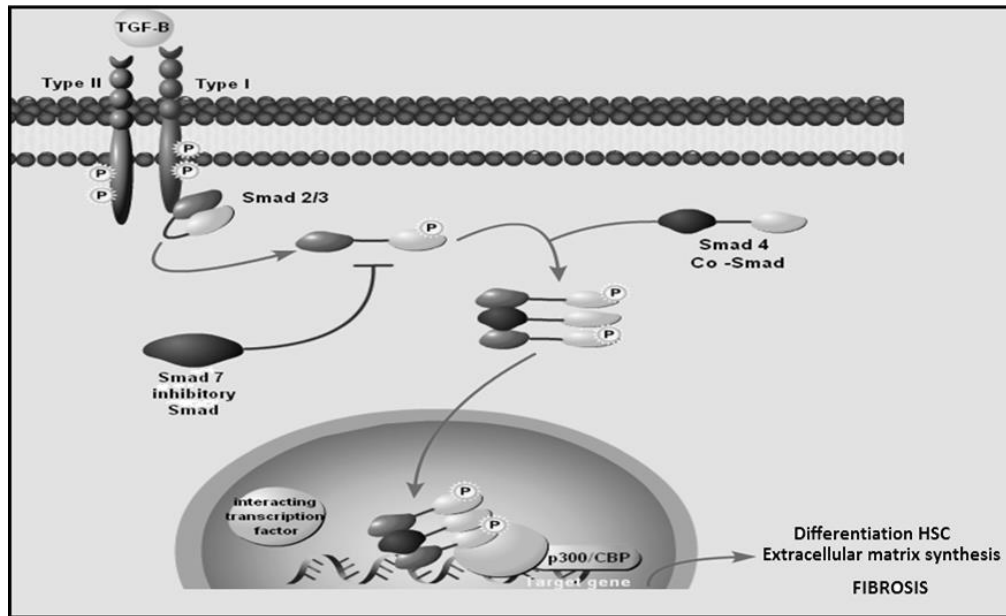


Figura 6. Participación del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) en el proceso de fibrogénesis.

El TGF- β promueve la formación del complejo heterodimérico entre los receptores I y II a TGF-β. La activación del receptor tipo I fosforila las isoformas 2/3 de las SMADS, las cuales se separan de los receptores y translocan al núcleo unidas a la co-Smad 4. En el núcleo el complejo Smad 2/3 – co-Smad 4 favorece la expresión de genes que contribuyen en la transdiferenciación de las células estelares hepáticas (HSC) y en el proceso de fibrogénesis.

Tomado y modificado de Muriel y Arauz, 2010 [38].

Además de las MMP's, los TIMP's y genes que participan en la síntesis de fibras de colágena, el TGF-β controla la expresión del inhibidor de la activación de plasminógeno tipo 1 (PAI-1, de sus siglas en inglés) por medio de la vía de las Smads o de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK); reforzando con ello el proceso de fibrogénesis, pues la activación de plasminógeno implica la producción de plasmina, la cual directa o indirectamente, a través de MMP's, interviene en la

degradación de MEC (figura 7) [39, 40]. Aunado a ello, el TGF- β estimula a los hepatocitos para convertirlos en la fuente principal del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) en el hígado, el cual parece jugar un papel importante como mediador río abajo que amplifica la señal profibrogénica del TGF- β (figura 8) [41].

Sumado a su participación en el proceso de fibrogénesis, el TGF- β interviene en otros fenómenos que contribuyen a la pérdida de las funciones hepáticas durante la cirrosis. Por un lado, incrementa su propia expresión y de receptores a PDGF en las HSC activadas, además de prolongar la supervivencia de éstas al reducir el proceso de apoptosis, efecto opuesto al que ejerce en los hepatocitos, en donde al inhibir la síntesis de ácido desoxirribonucleico (DNA) contribuye a la pérdida de masa tisular y por ende, favorece la disminución del tamaño del hígado [19, 28].

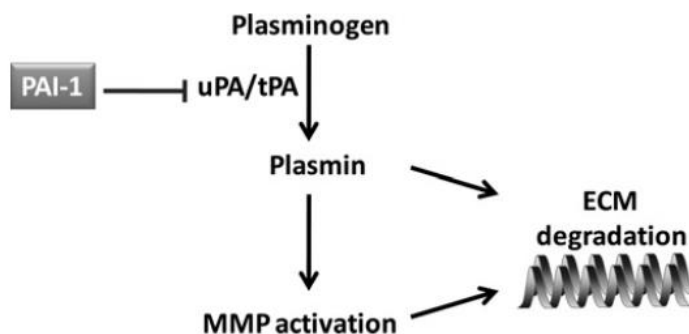


Figura 7. Papel del inhibidor de la activación de plasminógeno tipo 1 (PAI-1) en la cascada de fibrólisis.

La activación del plasminógeno estimula la actividad de la plasmina y ésta a su vez, activa a las metaloproteinasas (MMP). Tanto la plasmina como las MMP participan en el proceso de degradación de la matriz extracelular. PAI-1: inhibidor de la activación de plasminógeno tipo 1, ECM: matriz extracelular, uPA: activador de plasminógeno tipo urocinasa, tPA: activador tisular de plasminógeno.

Tomado de Beier y Arteel, 2012 [40].

La señal mediada por TGF- β puede frenarse a través de la activación de un asa de retroalimentación negativa que involucra la expresión de una isoforma inhibitoria de la familia de las SMADS, propiamente la Smad7 (figura 6). Esta isoforma se expresa después de que el complejo Smad3-Smad4 transloca al núcleo y se une al promotor para Smad7; sin embargo, cabe señalar que en el daño crónico, la señal de TGF- β deja de ser transitoria debido a la fosforilación constitutiva de

Smad2 y la paralela disminución en los niveles de la expresión de Smad7, lo que mantiene la capacidad fibrogénica de las HSC [37].

Otra de las moléculas que participa activamente en el proceso fibrogénico y consecuentemente en el desarrollo de la cirrosis es el PDGF, al desempeñarse como el principal agente mitogénico de las HSC [28].

Tanto el PDGF como sus receptores son sobreexpresados en tejidos fibróticos y su actividad se incrementa conforme progresa la fibrosis hepática. Este factor de crecimiento es liberado por las KC y actúa sobre los receptores tirosina cinasa (PDGFR α y β) localizados en la membrana de las HSC. Tras la unión de PDGF a su receptor ocurre un cambio conformacional en el dominio extracelular de éste, promoviendo la dimerización de receptores y el acercamiento de los dominios de cinasa citoplásmicos, favoreciendo con ello la transfosforilación de tirosinas, las cuales se convierten en sitios de unión para el reclutamiento de las proteínas involucradas en la señalización mitogénica de PDGF. Este factor de crecimiento puede ejercer su actividad río abajo a través de moléculas tales como la cinasa regulada por la señal extracelular (ERK1/2), cinasa N-terminal de C-Jun (JNK), la proteína cinasa p38 activada por mitógeno (MAPK) y la proteína cinasa B (PKB) también conocida como Akt [28, 42]. El resultado final tras la activación de cualquiera de las vías citadas es la proliferación celular, característica distintiva de las HSC activadas; de manera que PDGF contribuye de manera indirecta en el aumento de la síntesis de colágena y la inhibición de la degradación de MEC. Al margen del hecho anterior, destaca el trabajo de Czochra y colaboradores en 2006 y recientemente, en 2013, de Martin y su equipo de investigación, quienes demostraron que el PDGF favorece la sobreexpresión de las MMP-2 y 9 y de TIMP-1, además de inhibir la acción de colagenasas [28].

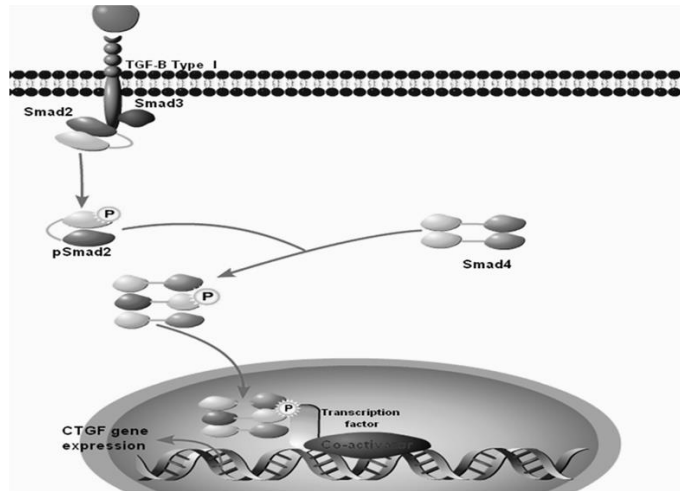


Figura 8. Amplificación de la señal fibrogénica del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) por acción del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF).

El factor TGF-β se une a sus receptores transmembranales localizados en los hepatocitos, promoviendo la síntesis de CTGF y su secreción desde estas células, reforzando de esta forma la producción de colágena y con ello, el desarrollo de la fibrosis.

Tomado y modificado de Muriel y Arauz, 2010 [38].

1.5. Modelos experimentales de daño hepático

1.5.1. Intoxicación por xenobióticos

1.5.1.1. Tetracloruro de carbono (CCl₄) y tioacetamida (TAA)

El CCl₄ y la TAA son los principales compuestos químicos utilizados para inducir daño hepático a nivel experimental. Ambos xenobióticos sufren un proceso de bioactivación por acción de enzimas que pertenecen al sistema de citocromos P450, principalmente la isoforma CYP2E1. Después de su metabolismo se convierten en compuestos inestables y altamente reactivos conocidos como radicales libres. De manera específica, el triclorometilo (CCl₃·) y el triclorometilperoxilo (CCl₃OO·), derivados del CCl₄, o la tioacetamida-S,S-dióxido (TASO₂), metabolito de la TAA, alteran la integridad de los hepatocitos, induciendo necrosis y la generación de ROS que modifican la función normal del sistema antioxidante, produciendo así un desbalance en el estado redox de la célula [43 – 45].

Asimismo, los radicales libres tienen la capacidad de atacar y destruir los ácidos grasos poliinsaturados, principalmente los asociados a fosfolípidos, afectando con ello la permeabilidad de la membrana citoplásmica, la mitocondrial y la del retículo endoplásmico. La reacción de peroxidación lipídica desencadenada por los metabolitos de la TAA y el CCl₄ puede monitorizarse en el laboratorio cuantificando los niveles de malondialdehído (MDA), el cual es uno de los productos derivados del acortamiento de la cadena de los ácidos grasos afectados (figura 9) [44 – 46].

En respuesta al estrés oxidativo al que son sometidas las células hepáticas, la actividad del sistema antioxidante endógeno se ve atenuada, pues la tasa de generación de peróxidos lipídicos y ROS es superior a la capacidad que dicho sistema tiene para inactivar a los radicales libres. El hecho anterior se refleja en una disminución en la concentración de glutatión reducido (GSH), la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa (GPx), la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT), en hígado [45].

Además de las alteraciones moleculares inducidas por los xenobióticos, la cirrosis experimental se caracteriza por un incremento en los niveles de las citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 (IL-1), la interleucina 6 (IL-6), la interleucina 8 (IL-8) y el TNF- α (figura 9); la elevada deposición de proteínas de la MEC (colágena) y la infiltración de leucocitos. Otros cambios histopatológicos incluyen la congestión de sinusoides, las alteraciones nucleares y la necrosis centrolobulillar [47 – 49].

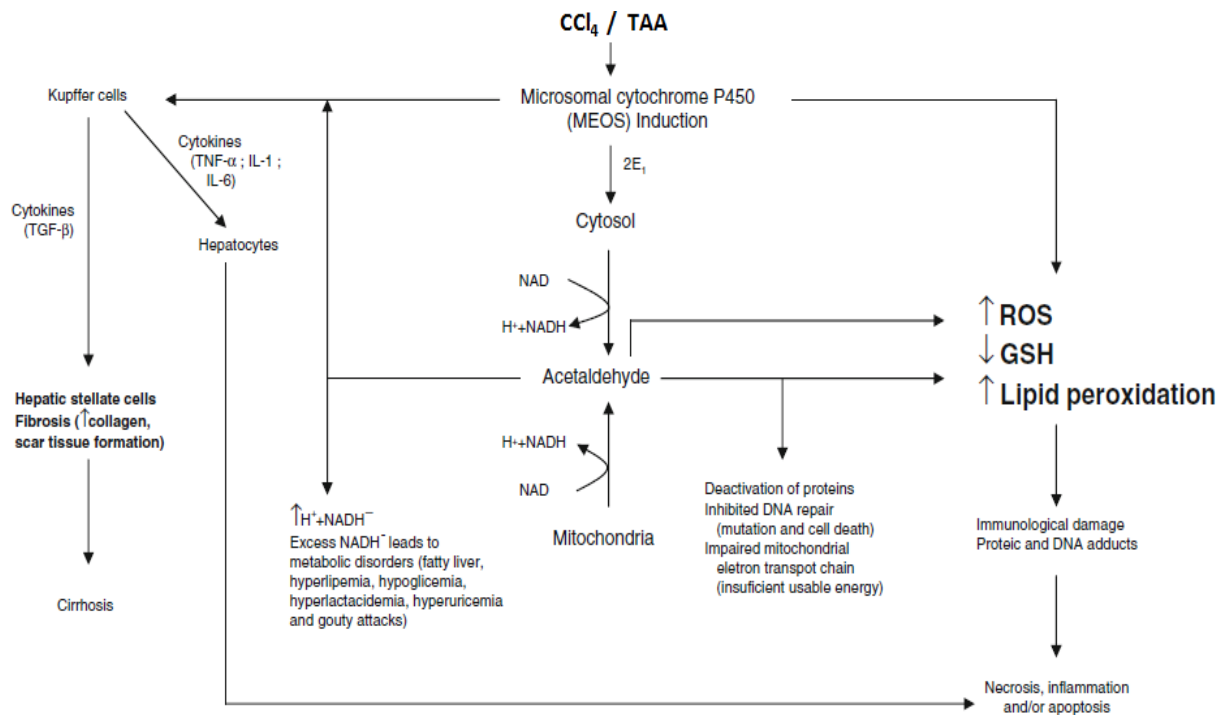


Figura 9. Efecto citotóxico del tetracloruro de carbono (CCl₄) y la tioacetamida (TAA).

Se describe brevemente el efecto que ejercen los xenobióticos sobre la integridad de los hepatocitos, la actividad de las células de Kupffer y el papel de las células estelares en el establecimiento de la fibrosis y cirrosis hepática. En términos generales, hay un incremento en la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS), síntesis de colágena, peroxidación lipídica, moléculas relacionadas con el proceso de la inflamación, apoptosis y necrosis. Los niveles de glutatión reducido (GSH) y energía útil se ven disminuidos, además de favorecerse la alteración de biomoléculas como el ácido desoxirribonucleico (DNA) y proteínas.

Tomado y modificado de Muriel, 2009 [47]

1.5.1.2. D-galactosamina (DGal)

La D-galactosamina es un aminoazúcar utilizado en el laboratorio para emular las características morfológicas y funcionales de la hepatitis viral humana [50]. Stachlewitz y colaboradores proponen que la hepatotoxicidad de esta molécula está mediada por la activación de KC y la producción de TNF- α , fenómenos que desencadenan la necrosis y apoptosis de los hepatocitos [51].

De acuerdo a los autores, la DGal activa directamente los mastocitos produciendo la liberación de histamina, la cual incrementa la permeabilidad intestinal. Posteriormente, las KC secretan TNF- α después de ser activadas por los productos bacterianos que son secretados desde el intestino.

Aunado a lo anterior, este aminoazúcar provoca la disminución en la reserva de nucleótidos de uridina en los hepatocitos, inhibiendo, específicamente en estas células, la síntesis de ácido ribonucleico mensajero (mRNA) y en consecuencia de proteínas (figura 10). Asimismo, la DGal promueve la dilatación de los vasos sanguíneos y el conducto biliar, la congestión del tracto periportal tras el reclutamiento de leucocitos, linfocitos e histiocitos y una significativa disminución en el contenido de glucógeno [50 – 53].

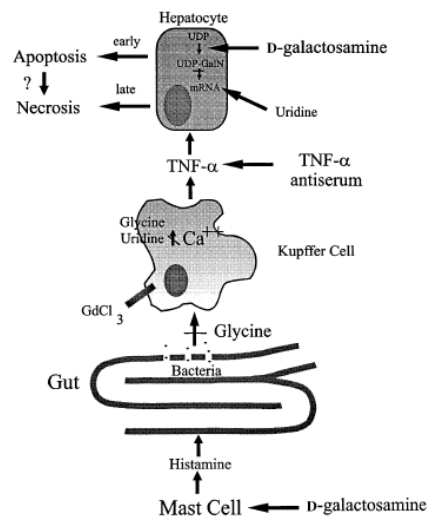


Figura 10. Eventos celulares que desencadenan la hepatotoxicidad de la D-galactosamina.

De acuerdo al modelo, la D-galactosamina induce el daño hepático básicamente por dos fenómenos: la activación de las células de Kupffer y la subsecuente activación de TNF- α . Además enfatiza el hecho de que la apoptosis precede a la necrosis de los hepatocitos.

Tomado de Stachlewitz R. y cols, 1999 [51]

1.5.1.3. Lipopolisacárido (LPS)

El LPS es el principal componente de la membrana extracelular de las bacterias Gram negativas, y se considera el factor principal que desencadena las reacciones tóxicas y el cuadro inflamatorio generalizado que caracteriza a las infecciones bacterianas en seres humanos. Además de intervenir en estos procesos y contribuir a la integridad de la membrana, el LPS es un elemento que influye directamente en la viabilidad de los microorganismos, pues cepas bacterianas que carecen de la capacidad para producir esta molécula son incapaces de desarrollarse [54].

Químicamente, el LPS está constituido por una sección hidrofóbica denominada lípido A, un núcleo hidrofílico (cadena de polisacáridos) y el antígeno O (una cadena lateral de oligosacáridos), que es específico del serotipo bacteriano. Esta endotoxina es utilizada para inducir daño hepático por su capacidad para interactuar, a través de su componente estructural denominado lípido A, y activar a las células endoteliales y a las KC; la estimulación de estas últimas se traduce en la producción de ROS, lípidos bioactivos, óxido nítrico (NO) y mediadores de la inflamación como TNF- α e interleucinas 1, 6, 8 y 10, citocinas que promueven la activación del factor nuclear-kappa B (NF- κ B, por sus siglas en inglés) [54, 55]. El resultado de la acción del LPS sobre el tejido hepático, es el desarrollo de un cuadro patológicamente similar al desencadenado por TAA y CCl₄, pues la generación de ROS conduce eventualmente a la alteración de la permeabilidad membranal, la necrosis de hepatocitos y generación de cuerpos apoptóticos; estos últimos refuerzan la activación de las KC, con lo cual se incrementa la secreción de citocinas que estimulan las HSC (figura 5), favoreciendo su transdiferenciación a células similares a MF y consecuentemente a la fibrogénesis.

Finalmente, cabe resaltar que diversos estudios han demostrado que la combinación de LPS con DGal potencia el efecto hepatotóxico causado por ambas moléculas, de tal forma que los resultados derivados de dicho modelo experimental presentan mayor similitud a lo que acontece en el humano. De hecho, tomando en cuenta que los roedores son aproximadamente mil veces menos sensibles que los humanos a los efectos del LPS, es recomendable sensibilizar a estas especies con un pretratamiento con DGal [52, 56, 57].

1.5.2. Obstrucción biliar

La obstrucción biliar se logra al ligar el conducto biliar común en las ratas. Este modelo representa una buena alternativa para estudiar los rasgos histopatológicos, bioquímicos y moleculares distintivos de un cuadro colestático, que se caracteriza por la inflamación del conducto biliar, la acumulación de bilis en el parénquima hepático con la consecuente liberación de pigmentos biliares hacia el torrente sanguíneo y la paralela pigmentación de tejidos (ictericia) y el desarrollo de fibrosis periductal, que eventualmente desencadenará un estado cirrótico [2, 44, 58].

El espacio canalicular es uno de los principales blancos que se ven afectados tras la ligadura del conducto biliar común (LCBC), en consecuencia los niveles plasmáticos de fosfatasa alcalina (ALP; en inglés) y γ -GTP, enzimas localizadas en la membrana canalicular, se consideran marcadores bioquímicos tempranos para estudiar las alteraciones propias de la colestasis, mientras que el nivel de bilirrubina conjugada es un buen marcador para estados tardíos [59].

Asimismo, la LCBC desencadena una reacción inflamatoria aguda, particularmente en la región portal, colestasis extrahepática, anastomosis bilioduodenal, fibrosis y finalmente cirrosis descompensada caracterizada por la formación de ascitis e hipertensión portal, asociada con esplenomegalia. El modelo de obstrucción biliar promueve, por una parte, la proliferación de colangiocitos y hepatocitos, así como la infiltración de neutrófilos en torno al conducto biliar, contribuyendo con ello en la inflamación del área portal y la invasión de redes fibróticas hacia el parénquima hepático; mientras que en este último favorece la necrosis de hepatocitos y la acumulación de fibrina [44, 60].

Por último, de acuerdo al trabajo de Muriel y Suárez publicado en 1994, es pertinente destacar que la peroxidación lipídica parece ser más bien una consecuencia y no una causa de la muerte celular en el modelo de obstrucción biliar; a pesar de que trabajos anteriores demostraron que la coincubación de ácidos biliares con hepatocitos aislados de rata promovió la reacción de peroxidación lipídica con la paralela pérdida de la viabilidad celular [61].

2. ANTECEDENTES

2.1. Radicales libres y estrés oxidativo

Los radicales libres son moléculas, átomos o iones que poseen un electrón desapareado, lo que los convierte en sustancias altamente inestables y reactivas. Estos se generan de manera normal como parte del metabolismo celular y aunque las principales especies derivan del oxígeno (ROS), también existen radicales libres derivados del metabolismo del nitrógeno y azufre (especies reactivas de nitrógeno RNS y RSS, respectivamente) [62].

Los radicales libres son estabilizados por el sistema antioxidante celular; sin embargo, cuando ocurre un desequilibrio entre la producción y la neutralización de las especies reactivas, la célula entra en un estado patológico conocido como estrés oxidativo. Las moléculas blanco de los radicales libres son el DNA, el RNA, las proteínas, los azúcares y los lípidos (figura 11) [47, 62, 63]. A nivel del DNA, las especies reactivas generan cambios químicos y estructurales entre los que destacan: delección de bases, cambio en el marco de lectura, modificación de las bases nitrogenadas, alteraciones cromosomales, rupturas en las cadenas de DNA y entrecruzamiento entre DNA y proteínas. En cuanto a las afectaciones que sufren las proteínas, los radicales libres inducen la modificación oxidativa de aminoácidos específicos, rompimiento de péptidos y el entrecruzamiento entre proteínas, consecuencia de las reacciones de peroxidación lipídica [62].

El daño glucooxidativo se caracteriza por la formación de glucoaldehídos, cuya cadena es demasiado corta para ciclarse, por lo cual se favorece su autooxidación y la producción de radicales superóxido ($O_2\cdot^-$) que contribuyen a la propagación de la reacción en cadena y la generación de α y β -dicarbonilos, productos altamente mutagénicos [62]. Por último, los ácidos grasos poliinsaturados son más susceptibles al ataque por radicales libres respecto a los ácidos saturados y monoinsaturados. Tras el ataque, la cadena lateral de los ácidos grasos sufre un acortamiento generando radicales peroxilo con capacidad de sustraer átomos de hidrógeno de las moléculas circundantes, con lo cual se establece y propaga la reacción de peroxidación lipídica [47, 62].

2.2. Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas que en concentraciones inferiores a las del sustrato biológico oxidable, tienen la capacidad de retardar o inhibir la oxidación mediada por los radicales libres, actuando directamente a nivel intracelular o bien, en la membrana celular (figura 11). Estas moléculas se encuentran de manera natural en el organismo, por ejemplo el GSH y enzimas como la CAT, la GPx, la SOD y la coenzima Q; o se pueden obtener a través de la dieta, por ejemplo el caroteno y las vitaminas C y E [63].

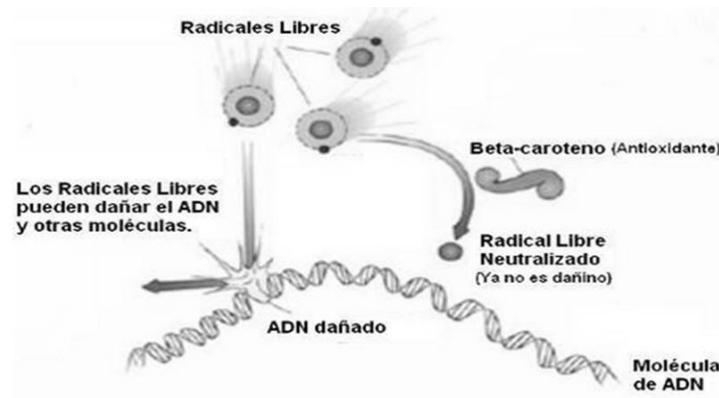


Figura 11. Acción de radicales libres.

Las moléculas inestables conocidas como radicales libres tienen como blancos principales moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA), proteínas y lípidos, alterando la integridad celular y por ende conducir a la muerte de la célula.

Tomado de <http://genteconconciencia.es/blog/wp-content/uploads/2012/01/antioxidantes-radicales-libres1> [64].

2.2.1. Flavonoides

Los flavonoides, metabolitos secundarios de organismos vegetales, son un grupo de antioxidantes constituido por más de 4000 compuestos polifenólicos de bajo peso molecular. Todos ellos poseen una estructura común de fenilbenzopirona (figura 12) y son clasificados, de acuerdo al nivel de saturación y las características del anillo central de pirano, en cinco grupos principales: flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonas y flavanoles [31, 65]. Debido a los grupos hidroxilo fenólicos y otras características químicas comunes en su estructura, actúan como agentes quelantes de hierro y otros metales de transición, poseen la capacidad de atacar los radicales hidroxilo y superóxido generados durante el daño oxidativo característico de padecimientos como la cardiopatía

isquémica, la aterosclerosis y el cáncer, previenen la oxidación de lipoproteínas de baja densidad y se les ha vinculado en procesos antiinflamatorios, antiprostanoideos y antitrombóticos [66].

Finalmente, diversos estudios demuestran que algunos flavonoides, por ejemplo, la catequina [65], la silimarina [26], la naringenina [67], la hesperidina [68], el kaempferol y la quercetina [69] actúan como hepatoprotectores.

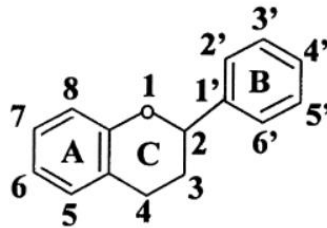


Figura 12. Estructura química fundamental de los flavonoides

El esqueleto de fenilbenzopirona está formado por dos anillos de fenilo (A y B) ligados a través de un anillo pirano (C).

Tomado de Heim y cols., 2002 [65].

2.2.1.1. Quercetina (Q)

La Q, químicamente 3,3',4',5,7-pentahidroxi flavona (figura 13), destaca como uno de los flavonoides mayormente distribuido en la dieta humana, y su consumo representa en promedio el 70% de la ingestión total por día de este grupo de antioxidantes. Se encuentra principalmente en frutas como la manzana y los arándanos, vegetales como la cebolla, así como en el té negro, el vino tinto y jugos de diversos frutos [70, 71].

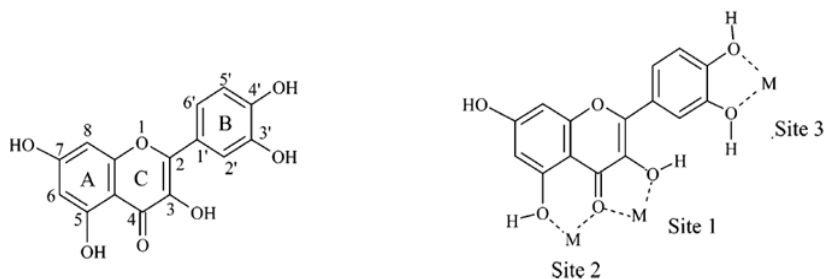


Figura 13. Estructura química de la quercetina.

En el esquema, se identifica el núcleo básico de fenilbenzopirona, compartido por los flavonoides, el grupo O-catecol en el anillo B, la insaturación en las posiciones 2 y 3 y la función carbonilo (4-oxo) conjugada con los grupos hidroxilo en los carbonos 3 y 5.

Asimismo exhibe los sitios de unión para la quelación de metales que intervienen en los procesos oxidativos.

Tomado de Fiorucci y cols., 2007 [72].

La Q reúne dos de las características químicas que definen el potencial antioxidante de los flavonoides.

- Presencia de grupos hidroxilo: la configuración de los grupos hidroxilo en el anillo B de la Q (figura 13) es el principal determinante de la capacidad de esta molécula para estabilizar las ROS y RNS, al donar un átomo de hidrógeno y un electrón a grupos hidroxilo, peroxilo y peroxinitrito. Asimismo, la estructura 3'4'-catecol contribuye de manera importante en la inhibición la peroxidación lipídica [65].

El potencial antioxidante de los flavonoides es altamente dependiente de la presencia de un grupo hidroxilo en el carbono 3 del anillo de pirano. De hecho, los compuestos que conjuntan esta característica con la presencia del 3'4'-catecol han demostrado mayor potencia para frenar la reactividad de los peroxinitritos. Adicionalmente, los flavonoles con el grupo 3-OH son planares, geometría que permite la conjugación y deslocalización electrónica, contribuyendo con la capacidad antioxidante de la Q [65].

- Insaturación en la posición 2-3 y función 4-oxo: Ratty y Das, en 1988, demostraron que la formación de sulfato ferroso inducida por MDA es más sensible a la inhibición por acción de la Q respecto a la taxifolina (figura 14). Los autores atribuyen este potencial a la presencia tanto de la función 4-oxo como del doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C, insaturación ausente en la taxifolina [65].

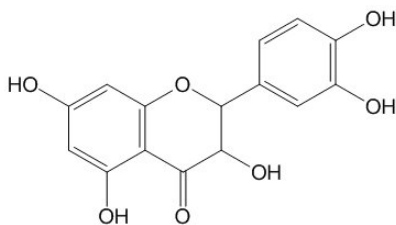


Figura 14. Estructura química de la taxifolina.

Contrario a la quercetina, la taxifolina carece del doble enlace en las posiciones 2 y 3 del anillo de pirano (anillo C), siendo ésta la única diferencia entre ambas moléculas.

Tomado de <http://spanish.alibaba.com/product-free/taxifolin-antioxidant-104980791.html> [73].

Por último, cabe señalar que la conjugación entre los anillos A y B (figura 13) permite un efecto de resonancia del núcleo aromático, estabilizando al radical flavonoide que deriva de la reacción entre el antioxidante y el radical libre generado durante las reacciones de oxidación [65].

2.2.1.1.1. Farmacocinética de la Q

Los estudios en modelos animales y humanos han demostrado que la Q es altamente biotransformada tanto a nivel intestinal como por efecto del primer paso, siendo los derivados metilados, glucoronidados y sulfatados, los principales compuestos encontrados en el plasma. Alternativamente, la Q puede ser degradada a diferentes ácidos fenólicos, como el ácido 3,4-dihidroxifenil acético y a dióxido de carbono (CO₂) por acción de la microbiota del colón (figura 15). Las reacciones de biotransformación referidas y la afinidad de la Q a la albúmina disminuyen considerablemente la biodisponibilidad de este compuesto [70].

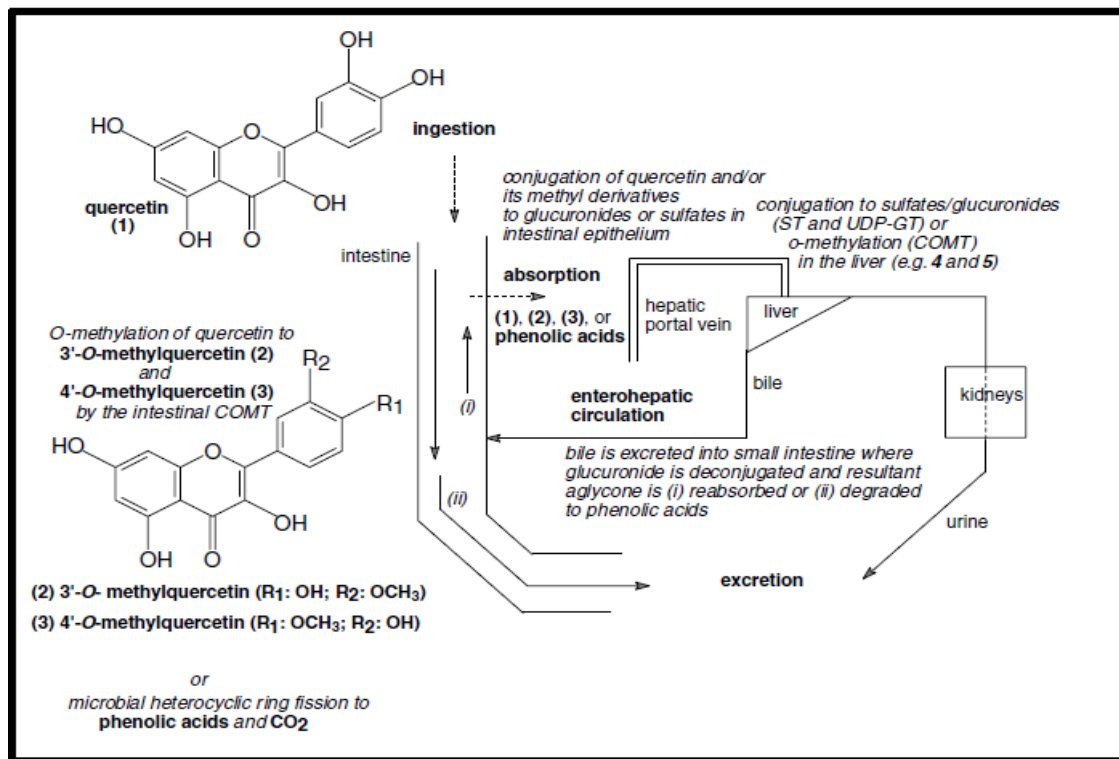


Figura 15. Farmacocinética de la quercetina (Q).

En el esquema se describen, en forma general, los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción después de la ingestión oral de Q.

Tomado de Harwood y cols., 2007 [70].

Se sabe que los posibles efectos farmacológicos y/o tóxicos que ejerce una molécula dependen, al menos en parte, de su distribución en el organismo. Diversos autores han reportado que la Q se concentra principalmente en el pulmón, el riñón, el hígado, el corazón y los testículos. Estudios con ratas revelaron que después de la administración oral de Q, ésta se excretó principalmente por tres vías: 45% en heces fecales, 35% como CO₂ y un 10% como conjugados glucoronidados o sulfatos en orina (figura 15) [70].

2.2.1.1.2. La Q como hepatoprotector

En décadas recientes ha incrementado el interés por conocer los efectos benéficos que los antioxidantes ejercen sobre la salud. Particularmente, la Q muestra actividad como carcinostático, antiviral, cardioprotector, antiinflamatorio, inhibidor de la agregación plaquetaria, la angiogénesis y la actividad de enzimas como la proteína cinasa C (PKC) y la enzima convertidora de angiotensina (ACE) [31, 74].

Además, distintos grupos de investigación han reportado el efecto hepatoprotector de la Q en modelos de daño con CCl₄ y TAA. Por ejemplo, Pavanato y colaboradores publicaron que la administración intraperitoneal (i.p.) de 150 µmol de Q/kg de peso/ día durante tres semanas, es capaz de reducir el incremento en los niveles séricos de alanina y aspartato aminotransferasas (ALT y AST, respectivamente) y bilirrubina, así como la cantidad de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) causado por la administración crónica durante 14 semanas de CCl₄. Paralelo a ello, el mismo grupo de trabajo publicó que la actividad de enzimas antioxidantes como SOD, GPx y CAT, alcanzan una recuperación significativa respecto a los grupos de daño con CCl₄ que no recibieron Q, aunque aún distan de los valores basales (figura 16) [75, 76].

Table 2 Effects of CCl₄ and quercetin (Q) on serum enzyme activities, total and conjugated bilirubin, and factor V

Parameter	Group		
	Control	CCl ₄	CCl ₄ + Q
ALT (IU/L)	15 ± 2	415 ± 101 ^a	101 ± 28 ^{a,b}
AST (IU/L)	62 ± 4	552 ± 141 ^a	103 ± 18 ^{a,b}
Total bilirubin (mg/dl)	0.42 ± 0.02	0.55 ± 0.08 ^a	0.34 ± 0.05 ^{a,b}
Conjugated bilirubin (mg/dl)	0.10 ± 0.02	0.18 ± 0.04 ^a	0.10 ± 0.02 ^b
Factor V (IU/L)	4.9 ± 0.8	2.5 ± 0.4 ^a	5.5 ± 0.9 ^b

Note. Values are the mean ± SE for six rats.

^aP < 0.05, significantly different from control.

^bP < 0.05, significantly different from CCl₄.

Table 3 Effects of CCl₄ and quercetin (Q) on lipid peroxidation and on antioxidant enzyme activities in liver tissue

Parameter	Group		
	Control	CCl ₄	CCl ₄ + Q
TBARS (nmol/mg)	24.58 ± 1.69	48.67 ± 4.20 ^a	31.43 ± 3.28 ^{a,b}
GSH (μmol/g)	4.86 ± 0.07	4.40 ± 0.06 ^a	4.48 ± 0.13 ^{a,b}
SOD (U/g)	15.64 ± 1.18	5.79 ± 0.52 ^a	9.87 ± 0.91 ^{a,b}
CAT (pmol/g)	8.29 ± 0.39	2.76 ± 0.45 ^c	4.88 ± 0.26 ^{a,b}
GPx (μmol/min · g)	0.41 ± 0.02	0.13 ± 0.01 ^c	0.20 ± 0.01 ^{a,b}
GST (μmol/min · g)	0.60 ± 0.03	0.25 ± 0.02 ^c	0.38 ± 0.02 ^{a,b}

Note. Values are the mean ± SE for six rats.

^aP < 0.05, significantly different from control.

^bP < 0.05, significantly different from CCl₄.

^cP < 0.001, significantly different from control.

Figura 16. Efecto hepatoprotector de la administración de quercetina (Q).

La Q mostró capacidad para reducir el aumento en los niveles séricos de alanina y aspartato aminotransferasa (ALT y AST, respectivamente) y bilirrubina conjugada, así como la cantidad de especies reactivas a ácido tiobarbitúrico (TBARS) en hígado de ratas tratadas crónicamente con CCl₄.

Tomado de Pavanato y cols., 2007 [75].

Por otra parte, con el propósito de determinar los cambios moleculares promovidos por la Q, que pudieran contribuir con su efecto terapéutico, Domitrovic y su equipo de trabajo cuantificaron la cantidad del NF-κB, el TNF-α y la isoforma inducible de la sintasa de óxido nítrico (iNOS). En el estudio, la administración de CCl₄ a ratones macho, incrementó los niveles de expresión de las tres proteínas, lo cual es asociado con el proceso inflamatorio (mediado por TNF-α) y el desarrollo de necrosis hepática causada por la nitración de proteínas en residuos de tirosina y la producción de peroxinitritos a partir de la reacción entre el óxido nítrico y el radical superóxido. La administración intraperitoneal de Q (50 mg/kg peso) durante cinco días, previno el aumento en la cantidad de NF-κB (figura 17), TNF-α e iNOS, provocado por el CCl₄. La reducción en los niveles de expresión de iNOS fue similar a lo reportado por Pavanato y colaboradores, quienes trataron ratas macho con Q [76, 77].

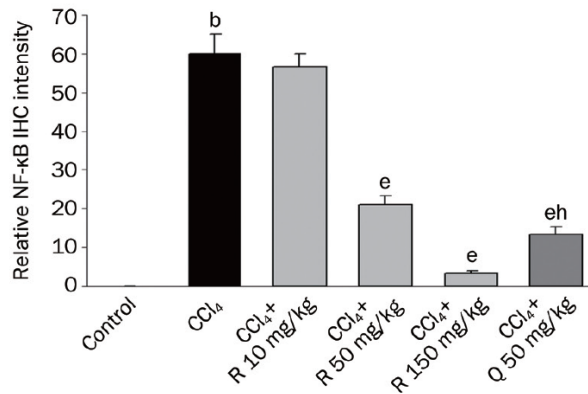


Figura 17. Efecto de la quercetina (Q) en los niveles del factor nuclear kappa B (NF-κB).

La Q previene el aumento en los niveles del NF-κB que causa la administración de una dosis de CCl₄. R: rutina.

Tomado de Domitrovic y cols, 2012 [77].

En cuanto a los modelos experimentales de daño hepático inducido por la administración aguda de TAA, es pertinente destacar el trabajo publicado por De David y colaboradores. Con su investigación, los autores pudieron demostrar que la Q es capaz de revertir los cambios en los niveles de Bax y Bcl-2, proteínas pro y antiapoptóticas, respectivamente, causados por dos dosis i.p. de 350 mg/kg de TAA. De acuerdo a la investigación, el tratamiento con este flavonoide reduce significativamente el índice Bax/Bcl-2, lo que inhibe las características apoptóticas de la patología, a través de una reducción en la generación de ROS (figura 18) [48].

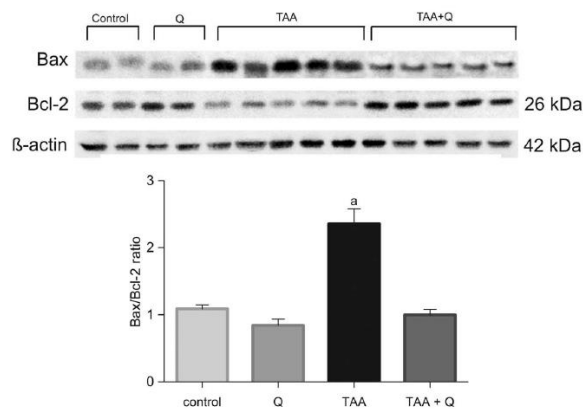


Figura 18. Efecto antiapoptótico de la quercetina (Q).

La Q es capaz de revertir el efecto pro-apoptótico inducido por la TAA, manteniendo la relación entre las proteínas Bax (pro-apoptótica) y Bcl-2 (antiapoptótica).

Tomado de De David y cols., 2011 [48].

Por último, con el trabajo de Kerber y su equipo de investigación se demostró que la administración i.p. de 50 mg de Q/kg de peso durante 14 días, es capaz de prevenir el incremento en los niveles de TBARS, la ALP y las aminotransferasas, causado por la LCBC de ratas Wistar macho; asimismo, ayuda a recuperar la actividad de las enzimas GPx, SOD y CAT, y evita la fibrosis y necrosis hepática [78].

3. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a la Dirección General de Información en Salud, dependencia de la Secretaría de Salud, la cirrosis hepática es la sexta causa de mortalidad en México, cobrando cerca de 30 mil fallecimientos anuales. Por otra parte, el especialista David Kershenobich, investigador de la Unidad de Medicina Experimental del Hospital General de México dio a conocer que la cirrosis se ubica entre las primeras causas de hospitalización en las instituciones médicas y agregó que el 70% de los pacientes con cirrosis padece alguno de los cuatro grados de encefalopatía hepática (uno de los síntomas que caracteriza la cirrosis descompensada) y 30% de ellos fallece por esta complicación [79, 80].

Pese el impacto en la salud pública derivado de esta patología, hasta hoy no existe una terapia efectiva que permita revertir los cambios anatómicos y fisiológicos característicos de la cirrosis, por lo cual es importante que las áreas de investigación afines unan esfuerzos para explorar, en principio, el potencial de sustancias de origen natural y/o sintético para prevenir y/o revertir el curso normal de esta enfermedad, y en segundo lugar, permita establecer el mecanismo molecular de la acción de dichos xenobióticos.

Considerando la necesidad de desarrollar una estrategia farmacológica efectiva para el tratamiento de la cirrosis y el potencial de la Q como hepatoprotector, demostrado en los estudios científicos citados en el apartado anterior, el objetivo central de la presente investigación fue evaluar si la administración de Q es capaz de prevenir y/o revertir la cirrosis hepática causada por la administración aguda o crónica de CCl₄.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el potencial de la Q para prevenir y/o revertir el daño hepático causado por la administración aguda o crónica de CCl₄.

4.2. Objetivos particulares

- Determinar la capacidad de la Q para prevenir y/o revertir la necrosis y colestasis inducidas por la administración de CCl₄.
- Evaluar cuál es el potencial del flavonoide para preservar y restablecer tanto el sistema antioxidante como la función del hígado, cuantificando los niveles de glutatión reducido y glucógeno.
- Estudiar el efecto del antioxidante sobre los cambios histológicos causados en los hepatocitos de ratas expuestas a CCl₄.
- Determinar el papel de la Q como posible agente fibrolítico cuantificando los niveles de colágena en hígado de ratas tratadas crónicamente con el hepatotóxico.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos

La Q (número de catálogo Q4951-100G), el CCl_4 (número de catálogo 1512), petrolato (número de catálogo A1015) y la carboximetilcelulosa (CMC, número de catálogo 5895-1000) se adquirieron de Sigma Aldrich, J.T Baker México, High Purity México DF y Química Meyer, respectivamente.

5.2. Modelo de daño y tratamiento de los animales

Ratas Wistar macho de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN, fueron alimentadas con una dieta rat chow y libre acceso a agua y se mantuvieron en cajas de policarbonato bajo condiciones controladas de temperatura (22 ± 2 °C), humedad relativa (50 – 60%) y ciclos de 12 h luz – oscuridad.

Modelo de daño agudo: para evaluar la capacidad de la Q para prevenir el daño hepático causado por una dosis elevada de CCl_4 , ratas con un peso inicial de 220 – 250 g se dividieron aleatoriamente en seis grupos y se trataron de acuerdo al diseño experimental mostrado en la tabla 1.

Modelo de daño crónico: para evaluar la capacidad de la Q para revertir el daño hepático causado por la administración crónica de CCl_4 , ratas con un peso inicial de 100 - 110 g se dividieron aleatoriamente en 7 grupos y se trataron de acuerdo al diseño experimental mostrado en la tabla 2.

Tabla 1. Modelo de daño agudo de CCl₄.

Grupo	Periodo	Dosis	Vía administración
Control (animales sanos)	1 día	Dieta rat chow y libre acceso a agua	v.o.
Control fármaco (Q)	7 días	50 mg Q/kg peso	i.p.
Control vehículo Q	7 días	1 mL CMC	i.p.
Control vehículo CCl₄	1 día	1 mL petrolato	v.o.
Daño (CCl₄)	1 día	4 g CCl ₄ /kg peso	v.o.
Tratamiento (Q + CCl₄)	Q: 7 días. Día 7: 2 dosis, 1 c/ 12 h CCl ₄ : 1 dosis en el día 7	50 mg Q/kg peso 4 g CCl ₄ /kg peso	Q: i.p. CCl ₄ : v.o.

Tabla 2. Modelo de daño crónico de CCl₄.

Grupo	Periodo	Dosis	Vía administración
Control (animales sanos)	12 semanas (sem)	Dieta rat chow y libre acceso a agua	v.o.
Control fármaco (Q)	4 sem	50 mg Q/kg peso/día	v.o.
Control vehículo Q	4 sem	1 mL CMC/día	v.o.
Control vehículo CCl₄	8 sem	1 mL petrolato, 3 veces/sem	i.p.
Daño (CCl₄)	8 sem	400 mg CCl ₄ /kg peso, 3 veces/sem	i.p.
Tratamiento (CCl₄ + Q)	12 sem	400 mg CCl ₄ /kg peso, 3 veces/sem/8 sem 50 mg Q/kg peso/día/4 sem, contadas a partir de la semana 9.	CCl ₄ : i.p. Q: v.o.
Reversión espontánea (CCl₄ + V)	12 sem	400 mg CCl ₄ /kg peso, 3 veces/sem/8 sem 1 mL petrolato/día/4 sem, contadas a partir de la semana 9.	CCl ₄ i.p. Vehículo v.o.

Después de 24 (daño agudo) ó 72 h (daño crónico) de concluir con el periodo de administración (tablas 1 y 2) las ratas fueron anestesiadas con una disolución de ketamina - xilacina en proporción 3:1 para extraer la sangre mediante punción cardiaca. Las muestras sanguíneas se centrifugaron a 3 mil revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos utilizando la centrifuga Beckman modelo TJ-6. El plasma obtenido se empleó para medir la actividad enzimática de ALP por el método de Berger y Rudolph (1963), γ -GTP de acuerdo a la técnica de Glossmann y Nevilie (1972), y ALT según el método de Reitman y Frankel (1957).

Además, muestras de hígado se emplearon para cuantificar la cantidad de glucógeno de acuerdo a la técnica de Seifter y colaboradores (1950), los niveles de GSH mediante el método colorimétrico empleado previamente por Hernández (2013) y la cantidad de colágena (en el modelo de daño crónico) siguiendo la técnica de Prockop y Udenfriend (1960).

Por otra parte, se realizaron cortes de hígado y se fijaron en formol al 10% para evaluar los cambios histológicos mediante las tinciones de hematoxilina y eosina (H&E) y tricrómica de Masson (para daño crónico).

5.3. Determinaciones Bioquímicas

5.3.1. Fosfatasa alcalina (ALP)

Fundamento: la ALP es una enzima que cataliza, a un pH óptimo de 9 - 10, la hidrólisis del enlace éster fosfórico entre un grupo fosfato y un radical orgánico. Se encuentra en hueso, hígado, riñón e intestinos; siendo las isoformas del hígado y hueso (LALP y BALP, respectivamente) las que predominan [81 – 83].

En el hígado, la ALP se localiza en el canalículo hepático y la membrana sinusoidal, de manera que el incremento en los niveles séricos de esta enzima deriva principalmente de patologías asociadas a la obstrucción del conducto biliar, aunque no permite discriminar entre colestasis intra o

extrahepática; además la actividad de ALP es empleada como indicador de tumores hepáticos. Sin embargo, debido a su distribución en el organismo y tomando en cuenta que su actividad varía de acuerdo a la edad, la cuantificación de los niveles séricos de esta enzima resulta ser un marcador poco específico para el diagnóstico certero de una hepatopatía [81].

En el laboratorio, la actividad enzimática de ALP en plasma se puede determinar utilizando p-nitrofenilfosfato como sustrato. El grupo fosfato es escindido de la molécula orgánica generando el producto colorido p-nitrofenol (figura 19), que en disolución alcalina absorbe energía a una longitud de onda de 405 nm [82].

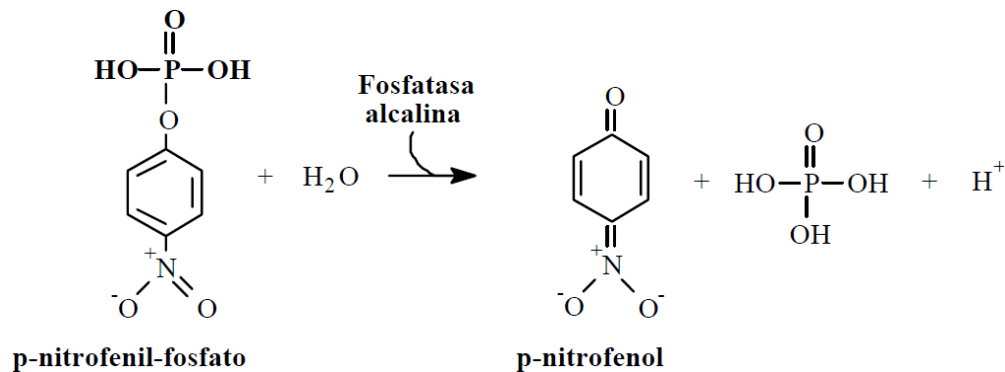


Figura 19. Reacción de fosfatasa alcalina (ALP) en presencia de p-nitrofenil-fosfato.

El grupo fosfato del sustrato es escindido por la acción de la enzima fosfatasa alcalina, liberándose p-nitrofenol como producto de la reacción.

Tomado de Bárcena y cols. [82]

Procedimiento: la determinación se realizó por duplicado utilizando un blanco de reactivos y siguiendo el protocolo a continuación descrito.

A cada tubo se le adicionaron 0.25 mL de buffer de glicina 0.1 M - MgCl₂ 1 mM (pH 10.5) y 0.25 ml del sustrato p-nitrofenilfosfato. Posteriormente, los tubos se colocaron en baño maría a 37 °C por 5 minutos, transcurrido el periodo de preincubación se añadieron 50 µL de la muestra de plasma y se mezclaron suavemente. En el caso del blanco los 50 µL de muestra se sustituyeron por agua destilada.

Los tubos se incubaron por 30 minutos a 37 °C y concluido este periodo la reacción de detuvo añadiendo 5 mL de NaOH 0.02 N y agitando por inversión. Después de homogeneizar los tubos de reacción, la absorbancia se leyó a 410 nm en el espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-1201.

Para conocer el valor de la actividad enzimática y reportarla en μmol de producto por volumen por tiempo de reacción ($\mu\text{mol/Lmin}$), los valores de absorbancia fueron interpolados utilizando una curva de calibración que se preparó como se indica en el apéndice 8.1.

5.3.2. Gamma-glutamil transpeptidasa (γ -GTP)

Fundamento: la γ -GTP, al igual que la ALP, se distribuye ampliamente en el cuerpo, destacando su presencia en el tracto biliar, el páncreas, las vesículas seminales y el cerebro; se encuentra unida a la membrana y del 80 – 90% de la actividad reportada para γ -GTP es encontrada en el tracto biliar. Su función, consiste esencialmente en la transferencia del grupo γ -glutamil del glutatión a diversos α -aminoácidos [81, 84].

El incremento en los niveles séricos de γ -GTP es asociado a patologías como la obstrucción biliar, la pancreatitis, el hipertiroidismo y la artritis reumatoide, disminuyendo con ello la especificidad como marcador bioquímico en el diagnóstico de hepatopatías. En cuadros colestáticos, esta enzima tiende a formar un complejo con la lipoproteína-X (LP-X), lo que explica la disminución en los valores de esta proteína [81].

La técnica para cuantificar la actividad de γ -GTP se basa en la producción de p-nitroanilina a partir del sustrato γ -glutamil-p-nitroanilida. La reacción en medio alcalino (pH aproximado de 8.2) y en presencia de iones Mg^{2+} es catalizada por la enzima γ -GTP, la cual favorece la transferencia del grupo γ -1-glutamil del sustrato al aceptor glicil-glicina (figura 20). El producto de la reacción es un compuesto colorido (p-nitroanilina) cuya absorbancia puede medirse por espectrofotometría a una longitud de onda de 410 nm [84].

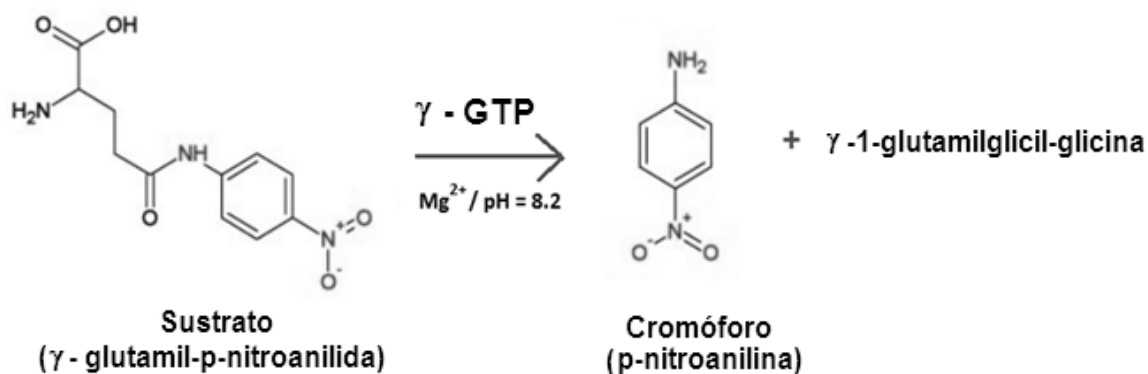


Figura 20. Generación del cromóforo p-nitroanilina tras la actividad de la gamma-glutamyl transpeptidasa (γ -GTP) sobre el sustrato γ -glutamyl-p-nitroanilida.

La γ -GTP cataliza la transferencia del γ -1-glutamyl desde el sustrato hacia el receptor glicil-glicina, generando un compuesto cromóforo cuya longitud de onda de máxima absorción corresponde a 410 nm.

Procedimiento: la determinación se realizó por duplicado utilizando además un blanco de reactivos. En cada tubo se adicionaron 400 μL de Tris-HCl 200 mM (pH 8.2), 100 μL de MgCl_2 200 mM, 100 μL de glicil-glicina 40 mM (pH 8.2) y 200 μL del sustrato γ -glutamyl-p-nitroanilida 10 mM. Los tubos se mezclaron suavemente y fueron preincubados por 10 minutos a 37 $^\circ\text{C}$.

Después del periodo de incubación se agregaron 200 μL de plasma (o de agua destilada en el caso del blanco) y se permitió el desarrollo de la reacción durante 30 minutos a 37 $^\circ\text{C}$. La reacción se detuvo agregando 2 mL de ácido acético 1.5 M y agitando vigorosamente con vórtex hasta obtener una disolución translúcida. Finalmente, la absorbancia se leyó a 410 nm y la actividad enzimática se cuantificó mediante la curva estándar construida según el apéndice 8.2.

5.3.3. Alanina aminotransferasa (ALT)

La ALT es una enzima que se localiza en el citoplasma de los hepatocitos, por lo que la determinación de esta enzima es un parámetro que permite diagnosticar un aumento en la permeabilidad de la membrana, que puede o no significar necrosis hepatocelular [81].

La actividad en suero de ALT puede incrementarse hasta 1000 veces respecto a los valores normales, en enfermedades metabólicas agudas, por ejemplo, intolerancia hereditaria a la fructosa; mientras que en patologías como la hepatitis fulminante aguda (causada por infección viral o la enfermedad de Wilson), la elevación es mínima [81].

A pesar de encontrarse en células del corazón, eritrocitos, tejido muscular, páncreas y riñón, el mayor porcentaje de actividad enzimática se reporta en el hígado, convirtiéndola en un indicador específico de daño hepatocelular [81, 85].

El método colorimétrico aplicado en la presente investigación fue desarrollado por Tonhazy, White y Umbreit, y Reitman y Frankel lo adaptaron en 1957 a la prueba en plasma. La determinación está basada en la transferencia del grupo amino de la alanina al aceptor 2-oxoglutarato, también conocido como α -cetoglutarato o 2-oxopentanoato. Después de la reacción se generan L-glutamato y piruvato, que en presencia de 2,4 dinitrofenilhidracina (2,4 DNPH) forman el derivado colorido 2,4 dinitrofenilhidrazona (figura 21). La cantidad de 2,4 dinitrofenilhidrazona es proporcional a la actividad de ALT y puede cuantificarse a 505 nm en un espectrofotómetro de luz visible [86].

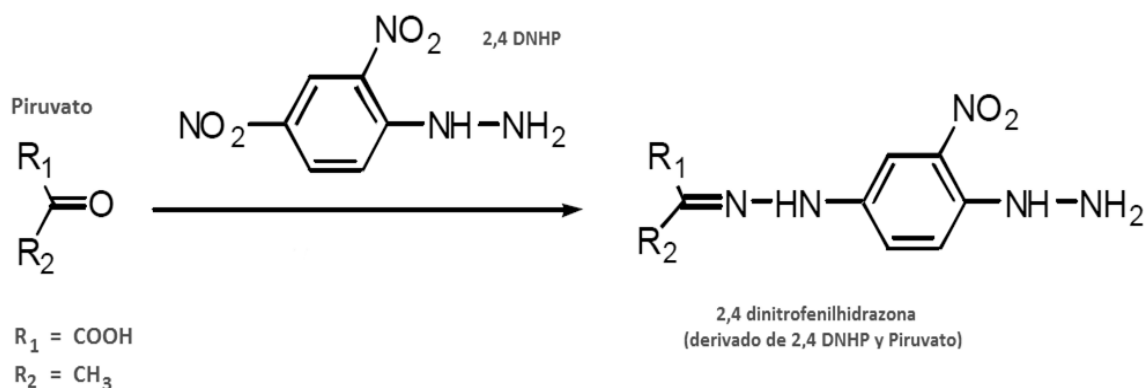


Figura 21. Fundamento de la reacción colorimétrica para determinar la actividad de la enzima alanina aminotransferasa (ALT).

El piruvato, formado tras la desaminación de alanina, reacciona con la 2,4 dinitrofenilhidracina (2,4 DNPH) para generar el compuesto colorido 2,4 dinitrofenilhidrazona, cuya concentración es proporcional a la actividad plasmática de la ALT.

Tomado y modificado de <http://www2.uca.es/grup-invest/corrosion/integrado/P15.pdf> [87]

Procedimiento: la determinación se realizó por duplicado utilizando el plasma sanguíneo como muestra y preparando un blanco de reactivos para cada una de las muestras según lo indica la tabla 3.

Tabla 3. Determinación de ALT.

Reactivos	Tubo blanco (μL)	Tubo problema (μL)
Sustrato	250	250
Plasma	---	50
Los tubos se mezclaron por agitación suave y se incubaron en el baño maría a 37 °C durante 60 minutos		
Reactivo cromógeno	250	250
Plasma	50	---
Los tubos se mezclaron por agitación suave y se incubaron en el baño maría a 37 °C durante 15 minutos		

Concluidos los 15 minutos del segundo periodo de incubación, la reacción se detuvo adicionando 2.5 mL de hidróxido de sodio 0.4 N. La mezcla se agitó vigorosamente utilizando un vórtex y las absorbancias se leyeron en el espectrofotómetro a una longitud de 515 nm.

La actividad enzimática se calculó a partir de la concentración de producto, la cual se obtuvo con la curva de calibración descrita en el apéndice 8.3.

5.3.4. Glutación reducido (GSH)

Fundamento: químicamente el glutación es un tripéptido del ácido glutámico, la cisteína y la glicina (Glu-Cys-Gly), es considerado el compuesto de bajo peso molecular con grupo sulfhidrilo más importante en las células animal y vegetal, y en estado reducido (GSH) se conoce como N-(N-L-gamma-glutamil-L-cisteinil) glicina. Su síntesis depende de la actividad de la enzima gamma glutamil cisteinil sintasa (γ -GCS) y la captación de cada órgano o tejido es dependiente de la actividad de la enzima γ -GTP [88].

El corazón, el riñón, los pulmones y el hígado son los principales órganos encargados de la homeostasis del GSH. Particularmente, en el hígado, su concentración oscila entre 5 – 7 mM, y en la excreción biliar alcanza una concentración de hasta 10 mM. En las células, el GSH se localiza principalmente en la mitocondria, el retículo endoplásmico y el núcleo, siendo en este organelo en donde incrementa su concentración durante la apoptosis [88].

El GSH interviene en algunos procesos de desintoxicación, controla la permeabilidad de la membrana y el transporte de aminoácidos, actúa como coenzima y participa en los procesos de síntesis proteica, de DNA y RNA. De manera importante, el GSH mantiene el estado redox celular, interviniendo activamente en la defensa frente al estrés oxidativo; de hecho, es considerado el principal antioxidante endógeno de la célula. En su estado reducido, el grupo tiol de la cisteína tiene la capacidad de donar un equivalente de reducción a moléculas inestables como los radicales libres; además, favorece la regeneración de la enzima GPx (figura 22), permitiéndole a ésta continuar su acción sobre la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) [88].

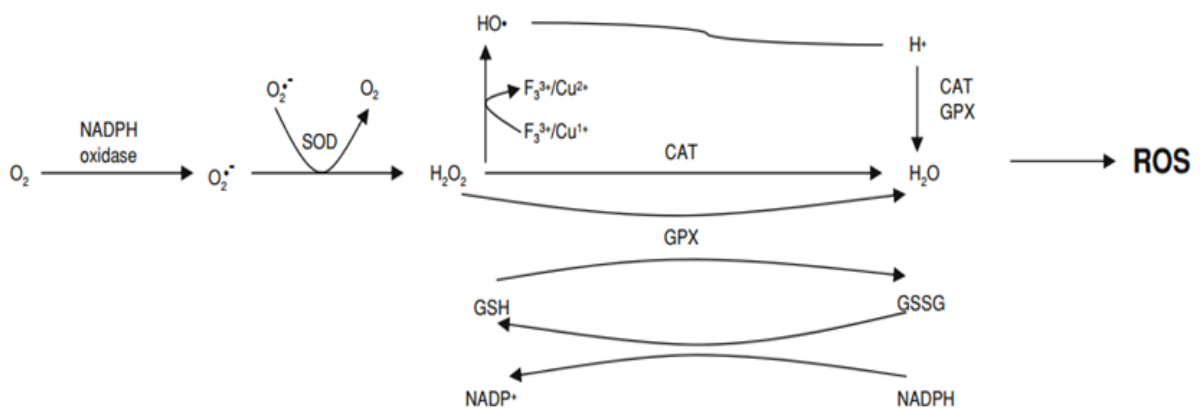


Figura 22. Papel del glutatión reducido (GSH) en la regeneración de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx).

Al donar un equivalente de reducción, el GSH se convierte a su forma oxidada (GSSG), permitiendo con ello restablecer la actividad de GPx en la descomposición del peróxido de hidrógeno.

Tomado de Muriel, 2009 [47].

La técnica para determinar el GSH en hígado se basa en la reacción entre el grupo sulfhidrilo de la cisteína del glutatión y el ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) del reactivo de Ellman.

Posterior a la reacción se obtiene como producto el ácido 5-tio-2-dinitrobenzoico, compuesto colorido que se lee en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 412 nm [89].

Procedimiento: para conocer la cantidad de GSH hepático, las muestras de hígado se homogeneizaron en una disolución precipitante de EDTA 5 mM, en cuya preparación se utilizó ácido tricloroacético (TCA) al 5% como disolvente.

Se homogeneizaron 0.3 g de hígado con 1.2 mL de disolución precipitante, el homogeneizado obtenido se centrifugó a 12 000 rpm por 20 minutos en la centrífuga Beckman J2-21 y se agregaron 100 µL del sobrenadante a un tubo que contenía 2.1 mL de disolución acuosa de fosfatos (Na_2HPO_4 0.3 M). Finalmente, se adicionaron 250 µL del reactivo de Ellman, los tubos se agitaron y la absorbancia se leyó a 412 nm en el espectrofotómetro.

La determinación se llevó a cabo por duplicado y se incluyó un blanco de reactivos en el que los 100 µL de sobrenadante derivado de la muestra, se sustituyeron por 100 µL de agua destilada. Para conocer la cantidad de GSH se elaboró una curva de calibración (apéndice 8.4) para interpolar los valores de absorbancia obtenidos de las muestras problema.

5.3.5. Glucógeno

Fundamento: el glucógeno es la forma principal que emplea el organismo para almacenar la glucosa, químicamente es un polímero formado por moléculas del monosacárido unidas a través de enlaces α -1,4 y α -1,6 glucosídicos [90].

Los principales almacenes de glucógeno son el hígado y el músculo esquelético; sin embargo, este último carece de la enzima glucosa-6-fosfatasa, por lo cual el hígado se convierte en la única fuente de glucosa para el resto de los tejidos. Tanto la síntesis como la degradación del glucógeno ocurren en torno al retículo endoplásmico liso (SER, en inglés) de los hepatocitos y son procesos dependientes de los niveles sanguíneos de glucosa y de la respuesta hormonal ante estos [13, 90].

Cuando la concentración de glucosa en sangre disminuye, las células α del páncreas secretan la hormona glucagón, este péptido se une a sus receptores en los hepatocitos y desencadena la activación de la enzima glucógeno fosforilasa, la cual promueve la glucogenólisis, generando como producto de la reacción unidades de glucosa-6-fosfato, finalmente, la enzima glucosa-6-fosfatasa promueve la hidrólisis del grupo fosfato y la glucosa puede ser exportada a la circulación sistémica para transportarse a los tejidos que la requieran. Por el contrario, cuando los niveles de glucosa incrementan, las células β de los islotes de Langerhans del páncreas liberan insulina, hormona que induce la desfosforilación de la enzima glucógeno sintetasa, activándola y favoreciendo con ello la síntesis de glucógeno [6, 90].

Cuando el hígado es afectado por un agente etiológico, los niveles de glucógeno se ven disminuidos, lo que refleja una pérdida de las funciones metabólicas propias del órgano. La concentración de glucógeno en muestras de hígado se puede conocer aplicando el método propuesto por Seifter y colaboradores. De acuerdo a la técnica citada, las muestras de tejido hepático previamente hidrolizadas en medio alcalino, se hacen reaccionar con una disolución ácida de antrona. El ácido sulfúrico provoca la deshidratación de los azúcares que se generaron durante la hidrólisis, convirtiéndolos en sus derivados tipo furfural; los furfurales condensan con la antrona produciendo un compuesto colorido que puede leerse en el espectrofotómetro a una longitud de 620 nm (figura 23) [91].

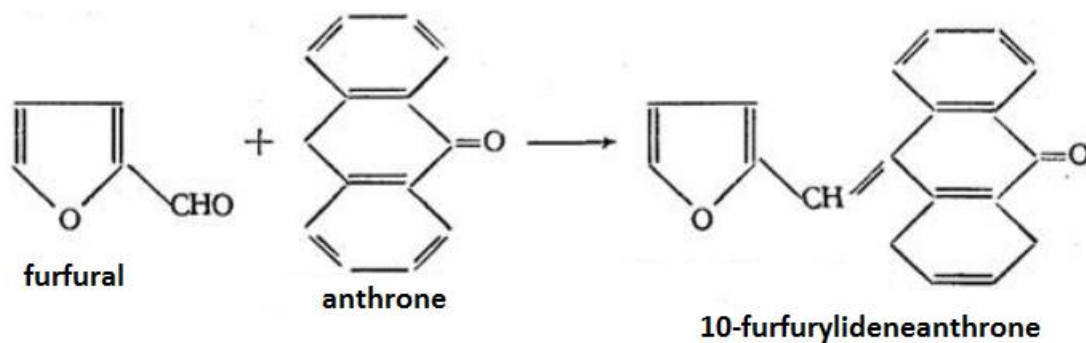


Figura 23. Reacción de condensación entre el furfural y la antrona.

El furfural, derivado de la deshidratación de los azúcares producidos después de la hidrólisis del glucógeno, condensa con la antrona para generar un compuesto de color verde – azul, cuya absorbancia puede ser leída a 620 nm.

Tomado y modificado de http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/internal/pharma_2/lectures_stud/ [92].

Procedimiento: en tubos de vidrio de tapón esmerilado se colocaron 0.5 g de hígado y 1.5 mL de KOH al 30% se. Los tubos se taparon y se colocaron a ebullición en baño maría por 30 minutos. Transcurrido el periodo de incubación, los tubos se enfriaron y el hidrolizado se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL en donde se aforaron con agua destilada para finalmente agitarlos vigorosamente utilizando un vórtex. Se tomaron de 40 a 160 μ L, dependiendo del tratamiento, de la mezcla anterior y se llevaron a 1 mL con agua destilada en tubos de vidrio esmerilados; este proceso se realizó por duplicado.

Además de los tubos problema se prepararon un blanco de reactivos con 1 mL de agua destilada y 2 estándares de glucosa, adicionando 980 μ L de agua destilada y 20 μ L de una disolución de glucosa de concentración 1 mg/mL.

A cada uno de los tubos se les añadieron 2 mL de disolución 0.2% de antrona en H₂SO₄ concentrado, los tubos se agitaron suavemente y se enfriaron. Después del enfriamiento, se calentaron en baño maría por 15 minutos. Finalmente, se dejaron enfriar y las absorbancias se leyeron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 620 nm.

Los microgramos de glucógeno contenidos en las alícuotas se calcularon utilizando la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g glucógeno} = (20 \times A_{\text{mtra}}) / (1.11 \times A_{\text{st}})$$

A_{mtra} = promedio de absorbancias de las muestras

A_{st} = promedio de absorbancias de los estándares

Tomando en cuenta la serie de diluciones se calcularon los gramos de glucógeno por cada 100 gramos de hígado.

5.3.6. Colágena

Fundamento: la colágena es una proteína fibrilar insoluble que forma parte de las proteínas de la MEC y del tejido conectivo. Se han identificado al menos 16 tipos de colágena; sin embargo, del 80 al 90% de dicha proteína corresponde a los tipos I, II y III. Sin importar el tipo y estructura formada, esencialmente las fibras de colágena se encargan de dar soporte al tejido [93].

En general, cada molécula de colágena está formada por tres subunidades α , específicamente dos α_1 y una α_2 , enrolladas sobre si mismas para formar una estructura helicoidal, con una longitud aproximada de 300 nm y un diámetro de 1.5 nm. Cada cadena contiene 1050 aminoácidos, predominantemente glicina, prolina e hidroxiprolina (HP), que se enrollan uno alrededor de otro, lo que contribuye con la estructura tipo hélice que presenta la molécula completa. Las diferencias entre los tipos de colágena son asociadas principalmente a los segmentos que interrumpen la estructura helicoidal y que se pliegan para dar origen a otra disposición tridimensional. Los enlaces por puente de hidrógeno entre el grupo amino (NH) de la glicina y el grupo carbonilo (C=O) de un aminoácido en la cadena polipeptídica adyacente contribuyen fuertemente a mantener la estructura tridimensional de la colágena [93].

La biosíntesis de colágena implica tres modificaciones postraduccionales relevantes. Primeramente, en el retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi, los residuos de hidroxilisina son glicosilados con unidades de glucosa y galactosa, además los oligosacáridos son adicionados en residuos específicos de asparagina, localizados en el extremo carboxilo terminal de los propéptidos. Segundo, ciertos residuos de prolina y lisina, ubicados a la mitad de la cadena de colágena, son hidroxilados por enzimas hidroxilasas unidas a la membrana. Finalmente, se establecen enlaces disulfuro entre los extremos carboxilo y amino de las cadenas de los propéptidos, lo que permite la alineación de éstas. La triple hélice se forma en el retículo endoplásmico e implica el cierre de la porción central de las cadenas polipeptídicas, desde el extremo carboxilo hacia el amino terminal (figura 24) [93].

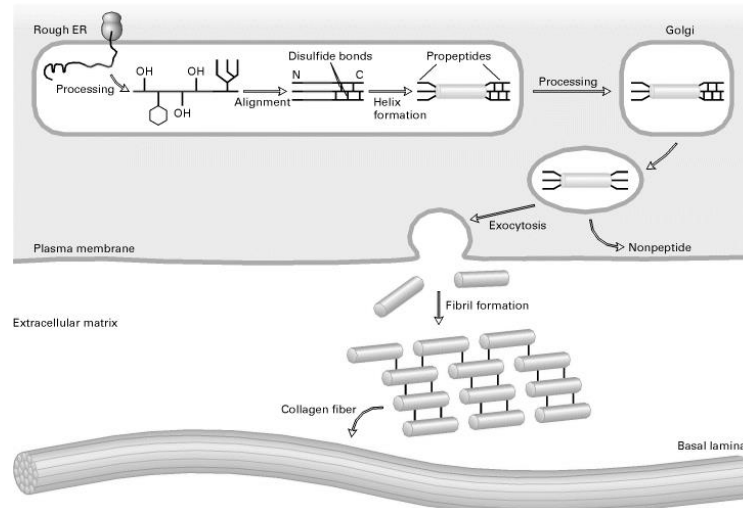


Figura 24. Modificaciones postraduccionales en la biosíntesis de colágena.

1) Los residuos de hidroxilisina son glicosilados con unidades de glucosa y galactosa, además los oligosacáridos son adicionados en residuos específicos de asparagina. 2) Algunos residuos de prolina y lisina son hidroxilados por hidroxilasas unidas a la membrana. 3)

La formación de enlaces disulfuro permite la alineación de las cadenas de propéptidos.

Tomado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21582/figure/A6551/?report=objectonly> [94].

Rojkind y González, en 1973 describieron un método para cuantificar la cantidad de HP utilizando p-dimetilaminobenzaldehído como cromógeno. De acuerdo al método referido, la cantidad de HP puede cuantificarse a partir del producto generado tras la reacción entre el p-dimetilaminobenzaldehído (reactivo de Ehrlich) y el pirrol derivado de la oxidación de los residuos de HP. La oxidación de HP ocurre en dos etapas; la primera, que implica una oxidación parcial, se desarrolla a temperatura ambiente y en ella se emplea cloramina T como agente oxidante. Posterior a la adición de tolueno se forman dos fases, la orgánica se desecha pues contiene los derivados oxidados de la prolina, mientras que la fase acuosa se somete a ebullición para inducir la oxidación total de los residuos de HP, generándose grupos pirrol como productos de la reacción (figura 25). Los grupos pirrol son recuperados con tolueno y se hacen reaccionar a temperatura ambiente por 30 minutos con el reactivo de Ehrlich, para generar un producto de coloración amarillo – anaranjado, que es medible a una longitud de onda de 560 nm [96, 97].

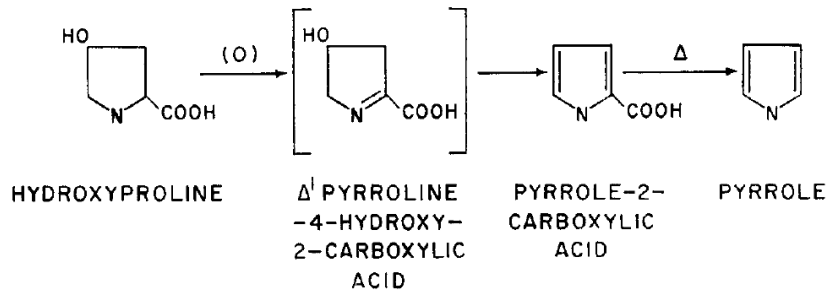


Figura 25. Producción de pirrol.

Reacción secuencial que describe desde la oxidación y descarboxilación de los residuos de hidroxiprolina presentes en la molécula colágena, hasta la formación del pirrol, compuesto que reacciona con el p-dimetilaminobenzaldehído del reactivo de Ehrlich para formar un compuesto colorido cuya absorbancia se lee a 560 nm.

Tomado de Prockop y Udenfriend, 1960 [97].

Procedimiento: se describe a continuación la preparación de las disoluciones que fueron empleadas para cuantificar la cantidad de colágena en tejido hepático.

- a) **Disolución amortiguadora:** Buffer de acetato de sodio - ácido cítrico (pH 6). Se pesaron y mezclaron 50 g de ácido cítrico, 120 g de acetato de sodio, 34 g de hidróxido de sodio y 15 mL de ácido acético glacial. La disolución se aforó a un litro con agua destilada.
- b) **Disolución de cloramina T:** se pesaron 0.141 g de cloramina T y se disolvieron con 2 mL de agua destilada, 3 mL de etilenglicol y 5 mL de disolución amortiguadora. La disolución se preparó al momento de usarse.
- c) **Reactivo de Ehrlich:** se tomaron 27.4 mL de H₂SO₄ concentrado y se agregaron lentamente a 200 mL de alcohol etílico absoluto en un vaso sobre hielo. Posteriormente 120 g de p-dimetilaminobenzaldehído disueltos en 200 mL de etanol se mezclaron con la disolución ácido-etanol, agitándose por 15 minutos. Finalmente, el recipiente se retiró del hielo y se continuó la agitación a temperatura ambiente hasta lograr la disolución.
- d) **Disolución de ninhidrina:** se pesaron 2.50 g de ninhidrina y se disolvieron en 60 mL de ácido acético glacial y 40 mL de ácido fosfórico 6 N.

Para conocer la cantidad de colágena, primeramente se determinó el contenido de HP en las muestras de hígado. Para tal propósito 0.1 g de hígado de rata, previamente secado con papel

filtro, se colocaron en una ampollita de vidrio a la cual se le adicionaron 2 mL de HCl 6 N, las ampollitas se sellaron con un mechero y posteriormente se colocaron a 100 °C en un horno durante 24 h. Transcurrido el periodo de hidrólisis, las ampollitas se destaparon y fueron colocadas en horno a 60 °C durante 96 h para garantizar la evaporación total del ácido.

Las muestras secas se resuspendieron con 2 mL de disolución amortiguadora, se agitaron vigorosamente con ayuda de un vórtex y se vaciaron en tubos de ensayo; después de vaciar el contenido, las ampollitas se lavaron adicionando 1 mL de disolución amortiguadora. Después, los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante se depositó en tubos que contenían una pequeña porción de carbón activado, se agitaron durante un minuto y se centrifugaron a 3000 rpm por 15 min.

Un mL del sobrenadante se mezcló con 1 mL de agua destilada y 1 mL de cloramina T, se incluyó un blanco de reactivos sustituyendo la cantidad de sobrenadante por agua destilada. Transcurridos 20 minutos de reacción a temperatura ambiente, se adicionaron 0.5 mL de tiosulfato de sodio 2 M, 1 mL de NaOH 1 N, aproximadamente 2 g de NaCl y los tubos se agitaron inmediatamente para detener la reacción.

A cada tubo se agregaron 6 mL de tolueno, se agitaron durante 1 minuto, se extrajo la capa de tolueno y la fase acuosa se sometió a ebullición en baño maría durante 20 minutos. Después de enfriar los tubos se les adicionaron 6 mL de tolueno y se agitaron durante 1 minuto. Finalmente, de la fase orgánica se tomaron alícuotas de 1 mL por duplicado, se les agregaron 4 mL del reactivo de Ehrlich, se agitaron fuertemente y se dejó desarrollar la reacción a temperatura ambiente por 30 minutos. Las absorbancias se leyeron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm.

Para conocer la cantidad de HP se realizó la curva de calibración correspondiente (apéndice 8.5), en la cual se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras problema.

La concentración de HP calculada en el paso anterior se empleó para determinar la cantidad de colágena por gramo de hígado (mg colágena/g hígado), considerando además los siguientes aspectos:

1. Masa molar de HP = 131.3 g/mol.
2. La molécula de colágena está constituida por 3 cadenas α , cada una con un peso de 96 kDa.
3. Cada cadena α posee en promedio 100 residuos de HP.

5.4. Estudios histológicos

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

Fundamento: las técnicas de estudio histopatológico son utilizadas frecuentemente para evaluar la eficacia de moléculas en el tratamiento del proceso de daño – reparación tisular (cicatrización). La profundidad y longitud del daño, la estratificación epitelial, la infiltración de macrófagos y leucocitos, así como la excesiva deposición de elastina y colágena son algunos de los criterios que emplean las técnicas histológicas para definir el nivel de daño tisular posterior a la exposición a un agente etiológico [98].

La técnica de H&E se emplea comúnmente en el estudio histopatológico del proceso de cicatrización porque permite evaluar los cambios anatómicos y morfológicos básicos tras el daño tisular [98]. La tinción de H&E se basa en la reacción entre los ácidos nucleicos y el colorante alcalino hematoxilina, formando un complejo colorido azul - púrpura; mientras que el colorante aniónico eosina interacciona con estructuras alcalinas, tiñiendo en distintos grados de rosa el citoplasma y la MEC [99].

Procedimiento: los cortes de hígado conservados en formol se desparafinaron y rehidataron con xileno, alcohol etílico absoluto y alcohol etílico al 96%, después se lavaron con agua corriente, se aplicó la hematoxilina de Harris durante 5 minutos y se enjuagaron con agua corriente por dos minutos. Se diferenciaron en alcohol ácido con tres a diez inmersiones y la diferenciación fue

verificada con el microscopio. Posteriormente, se lavaron con agua corriente y se sumergieron en carbonato de litio hasta que las secciones adquirieron la coloración azul brillante; una vez más se lavaron en agua corriente y alcohol etílico al 80%, por 1 minuto en cada sustancia. Después del lavado, los cortes se tiñeron con eosina y se realizaron lavados sucesivos con alcohol etílico al 96%, alcohol etílico absoluto y xileno. Finalmente, se montaron en la resina y se observaron en el microscopio Nikon H 550L.

Las imágenes fueron capturadas por el software incluido en el equipo de microscopia a los aumentos 10, 20 y 40x.

5.4.2. Tinción tricrómica de Masson

Fundamento: a diferencia de las técnicas histológicas comúnmente utilizadas, por ejemplo la tinción de H&E, la tinción tricrómica de Masson permite evaluar los cambios en el grado de deposición de colágena y la evolución del proceso de cicatrización. La ventaja principal que ofrece la tinción tricrómica de Masson es que permite identificar, mediante una tinción diferencial, estructuras celulares y moléculas clave en el proceso de cicatrización, pues mientras la queratina, la hemoglobina y las fibras musculares se tiñen de rojo, el núcleo lo hace de café oscuro a negro, el citoplasma y los adipocitos de rosa o rojo pálido y las fibras de colágena de azul [98].

La tinción diferencial se basa en la retención del colorante ácido escarlata de Biebrich por estructuras poco permeables como el citoplasma, después del tratamiento con la disolución de ácido fosfomolibdico/ácido fosfotúngstico. Por otra parte, el tinte ácido difunde de las fibras de colágena, permitiendo que éstas se tiñan con el azul de anilina [98].

Procedimiento: los cortes de hígado conservados en formol al 10% se desparafinaron y rehidrataron con xileno, alcohol etílico absoluto y alcohol etílico al 96%, se enjuagaron con agua destilada y se sumergieron en el fijador de Bouin por 1 h 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 disolución de hematoxilina de hierro de Weigert por 10 minutos. Nuevamente, las muestras se enjuagaron con agua corriente y agua destilada.

Los cortes se sumergieron en la disolución de fucsina y el colorante ácido escarlata de Biebrich por 15 minutos, se enjuagaron con agua destilada, se colocaron en la disolución de ácido fosfomolibdico/ácido fosfotúngstico por 10 a 15 minutos y posteriormente, se les puso en contacto con la disolución de azul de anilina por un periodo de 5 a 10 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se enjuagaron con agua destilada y después se lavaron con agua acética al 1% por 5 minutos. Finalmente, al igual que en la tinción de H&E, se lavaron con alcohol etílico al 96%, alcohol etílico absoluto y xileno, se montaron en la resina y se observaron al microscopio.

Utilizando el software del microscopio Nikon H 550L, las imágenes se capturaron a 10, 20 y 40x.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Enzimas hepáticas

La ALP y γ -GTP son enzimas que bajo condiciones fisiológicas se localizan en la membrana canalicular formada por los pliegues de la membrana plasmática de los hepatocitos adyacentes [67]. Después de que el CCl_4 es metabolizado por las enzimas del citocromo P450, particularmente la isoforma CYP2E1, se convierte en $\text{CCl}_3\cdot$, radical altamente inestable que reacciona con oxígeno molecular para formar el $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$; ambos compuestos son altamente reactivos y alteran la integridad de los hepatocitos al favorecer la generación de ROS. Estas especies atacan los lípidos de la membrana citoplásmica de las células hepáticas produciendo ácidos grasos peroxidados, derivados principalmente de los ácidos grasos poliinsaturados; la cadena lateral de éstos sufre un acortamiento, liberándose MDA como producto de dicha reacción [75, 100].

Como consecuencia de la afectación membranal, la ALP y la γ -GTP son liberadas al espacio extracelular, incrementando consecuentemente su actividad en plasma (figuras 26 - 29). El aumento en la actividad enzimática causado por la administración aguda o crónica del xenobiótico permite además, aseverar que el CCl_4 es un buen modelo para inducir colestasis hepática.

La Q mostró capacidad tanto de prevenir como de revertir el incremento en los niveles plasmáticos de la ALP y de la γ -GTP, causado por el CCl_4 (figuras 26 - 29).

Fosfatasa Alcalina

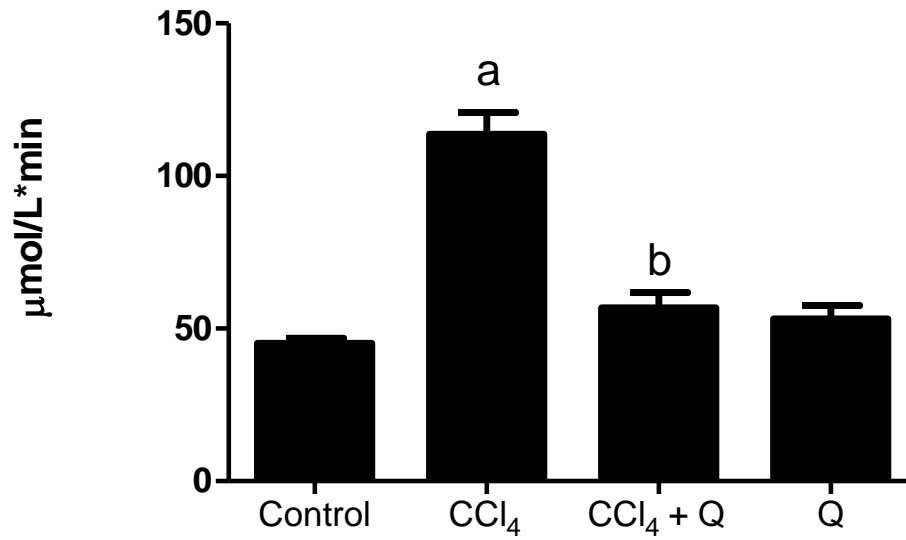


Figura 26. Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) en el modelo de daño agudo de CCl_4 .

Resultados expresados como el promedio \pm el error estándar (SEM) para $n = 6$. Diferencia significativa $p < 0.05$: a respecto al grupo control y b respecto al grupo de daño con CCl_4 . Q: quercetina.

Gamma Glutamil Transpeptidasa

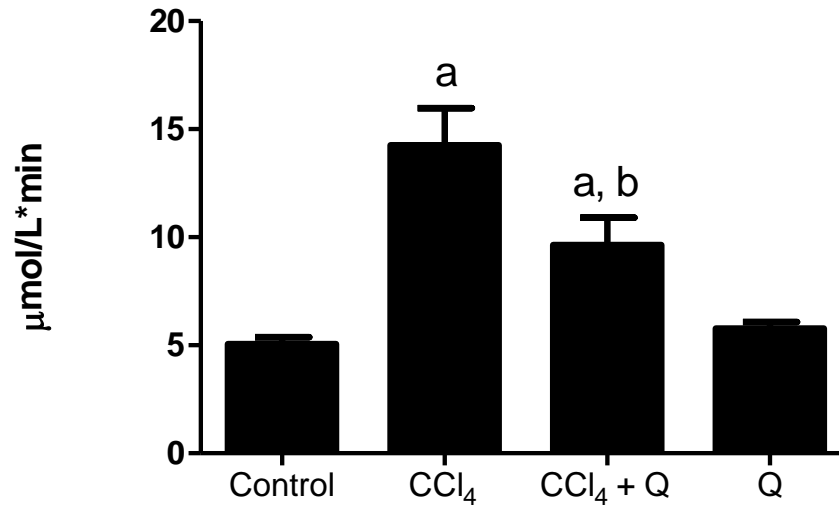


Figura 27. Actividad de la gamma-glutamil transpeptidasa (γ -GTP) en el modelo de daño agudo de CCl_4 .

Resultados expresados como el promedio \pm el error estándar (SEM) para $n = 6$. Diferencia significativa $p < 0.05$: a respecto al grupo control y b respecto al grupo de daño con CCl_4 . Q: quercetina

Fosfatasa Alcalina

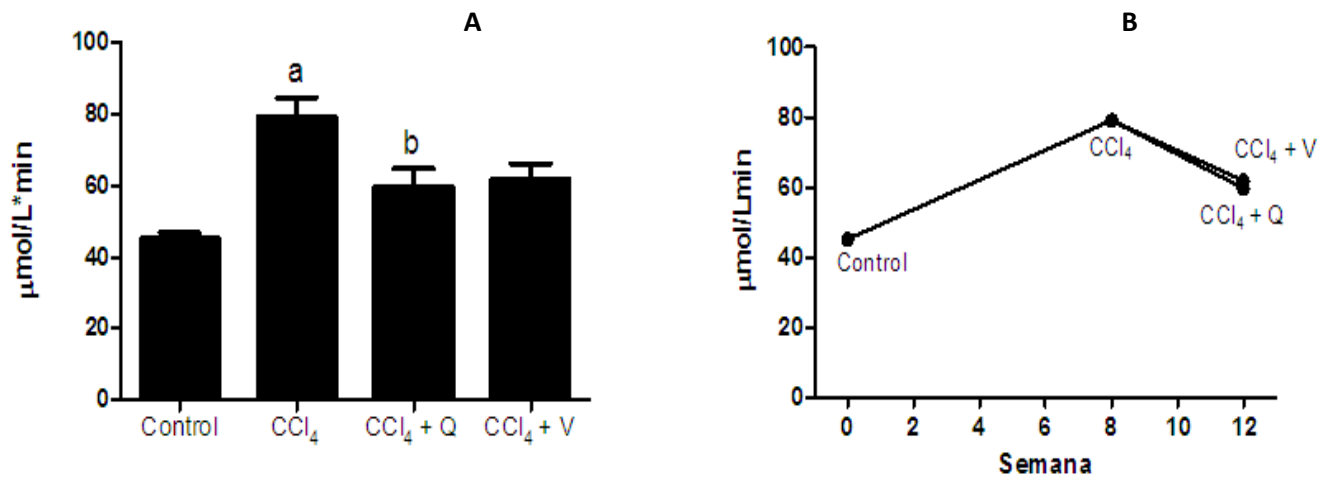


Figura 28. Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) en el modelo de daño crónico de CCl₄.

A) Actividad plasmática de la ALP. B) Curso temporal de la actividad de la ALP. Resultados expresados como el promedio \pm el error estándar (SEM) para n = 6. Diferencia significativa p < 0.05: **a** respecto al grupo control y **b** respecto al grupo de daño con CCl₄.

Q: quercetina, V: vehículo (petrolato).

Gamma Glutamil Transpeptidasa

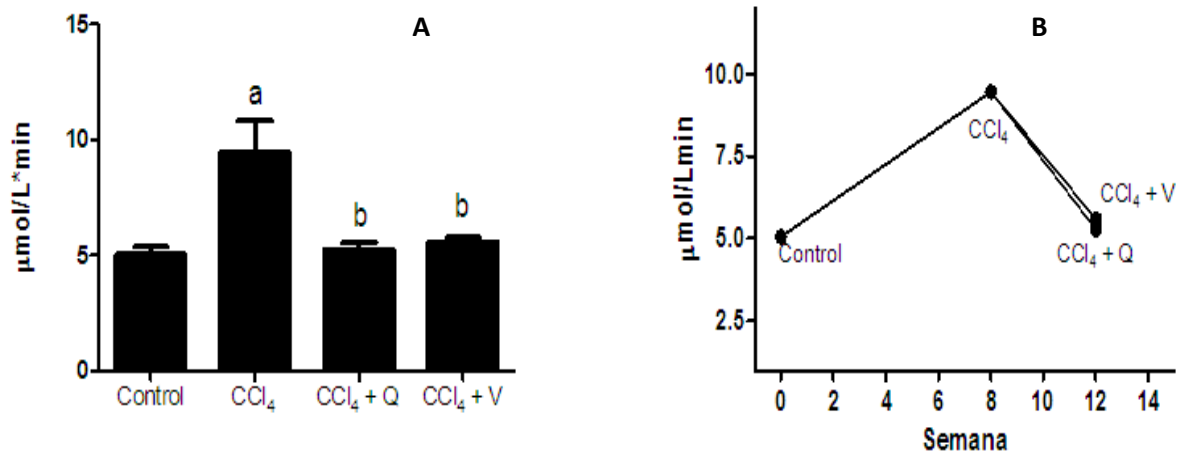


Figura 29. Actividad de la gamma-glutamil transpeptidasa (γ-GTP) en el modelo de daño crónico de CCl₄.

A) Efecto de la quercetina (Q) en la actividad plasmática de la γ-GTP. B) Curso temporal del efecto de la Q en la actividad plasmática de la γ-GTP. Resultados expresados como el promedio \pm el error estándar (SEM) para n = 6. Diferencia significativa p < 0.05: **a** respecto al grupo control y **b** respecto al grupo de daño con CCl₄. V: vehículo (petrolato).

Por otra parte, la actividad de la ALT es empleada en los estudios de perfil hepático como un marcador de necrosis, tomando en cuenta que esta enzima, responsable de catalizar la transferencia del grupo amino de la alanina al α -cetoglutarato, es de localización citoplásmica [81, 85].

Considerando lo anterior y como se observa en las figuras 30 - 32, el CCl_4 no sólo es capaz de provocar colestasis hepática sino que también promueve la muerte masiva del parénquima hepático, modificando la arquitectura normal de la unidad funcional del hígado (lobulillo hepático). La necrosis de los hepatocitos causada por el CCl_4 , es prevenida y revertida por la administración diaria del antioxidante (Q) (figuras 30, 31, 32C y 32D).

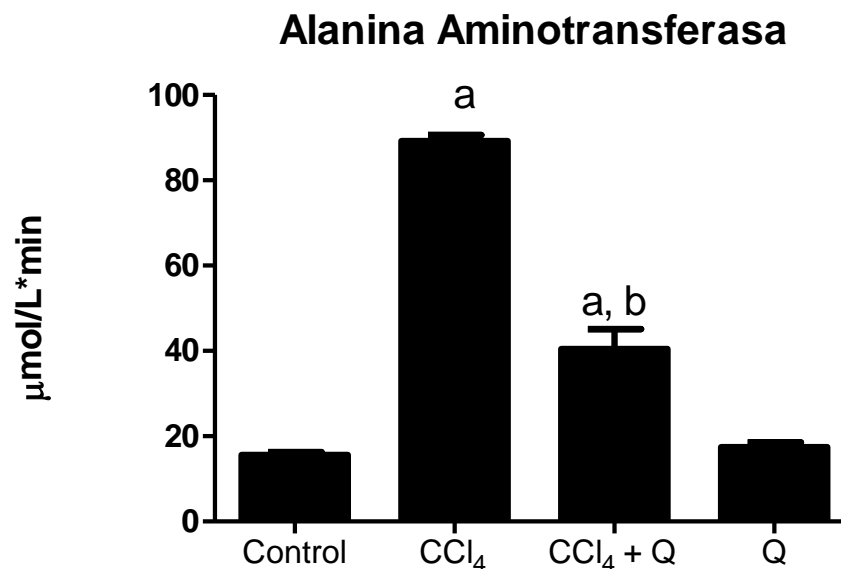


Figura 30. Actividad de la alanina aminotransferasa (ALT) en el modelo de daño agudo con CCl_4 .

Resultados expresados como el promedio \pm el error estándar (SEM) para $n = 6$. Diferencia significativa $p < 0.05$: **a** respecto al grupo control y **b** respecto al grupo de daño con CCl_4 .

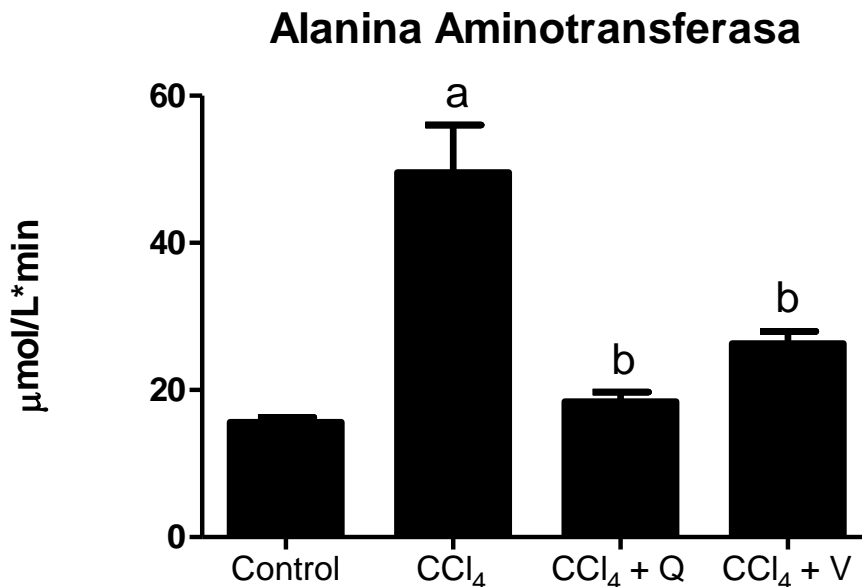


Figura 31. Actividad de la alanina aminotransferasa (ALT) en el modelo de daño crónico con CCl₄.

Resultados expresados como el promedio \pm el error estándar (SEM) para n = 6. Diferencia significativa p < 0.05: **a** respecto al grupo control y **b** respecto al grupo de daño con CCl₄. Q: quercetina, V: vehículo (petrolato).

Con base en los resultados obtenidos en la presente investigación es válido afirmar que la Q tiene la capacidad de prevenir y revertir parcialmente, tanto la colestasis (medida como ALP y γ -GTP plasmáticas) como la necrosis (medida como ALT plasmática) causadas por el CCl₄, al mantener los niveles plasmáticos de las enzimas citadas (figuras 26 - 31) y restablecer la arquitectura normal de los hepatocitos (figura 32). El efecto positivo de la Q en la prevención y reversión del daño hepático se puede asociar a su capacidad como agente antioxidante, pues la presencia de grupos hidroxilo fenólicos en su estructura molecular le permite estabilizar los radicales libres generados tras la bioactivación del hepatotóxico. El beneficio causado por la administración del flavonoide, evidenciado en este proyecto, coincide con lo reportado previamente por otros autores en modelos de daño hepático causado por la administración de TAA, CCl₄ o la LCBC [48, 77, 78].

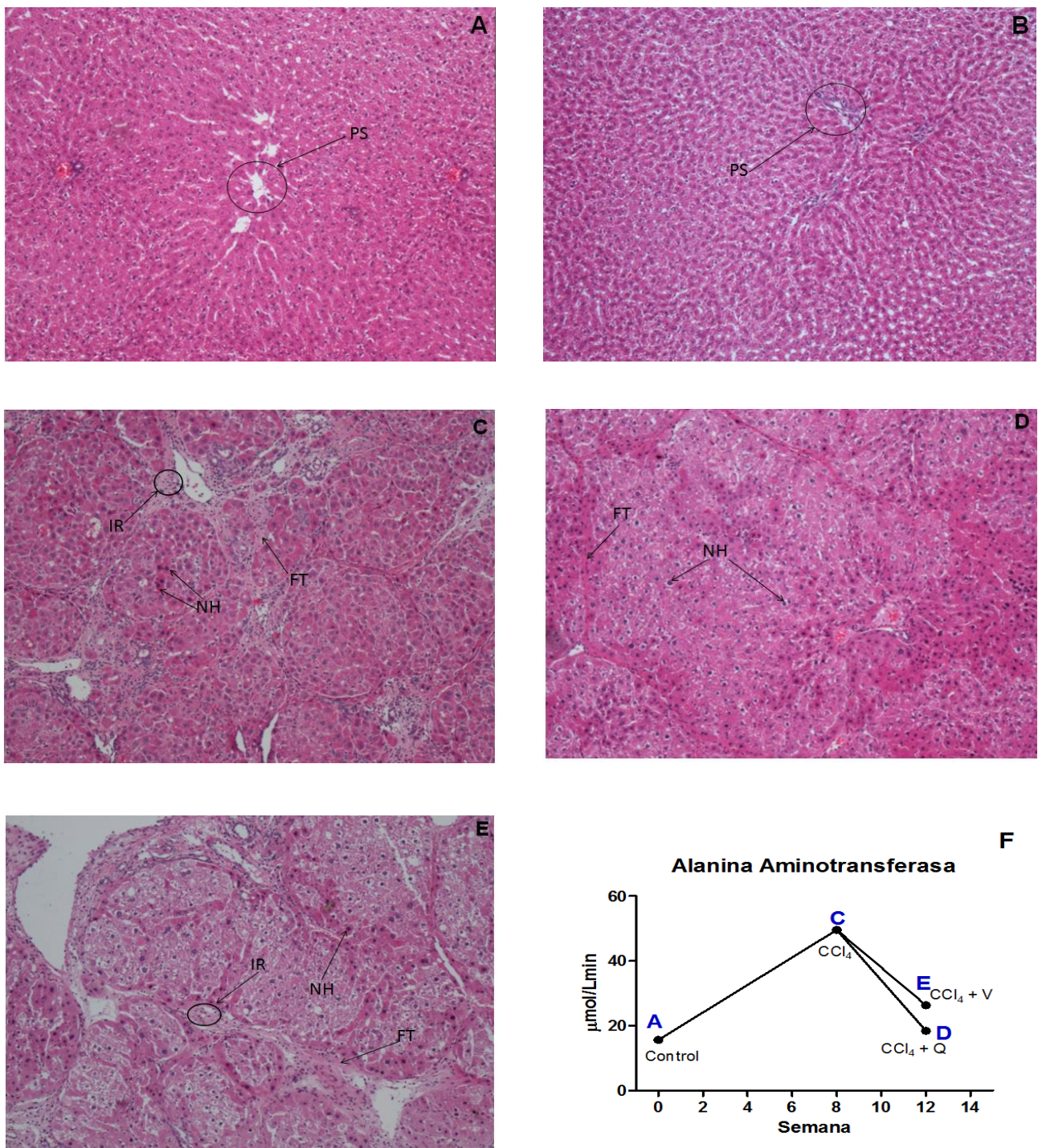


Figura 32. Tinción de hematoxilina y eosina (H&E), modelo de daño crónico.

Cortes histológicos de: **A)** grupo control, **B)** grupo Q, **C)** grupo CCl₄, **D)** grupo CCl₄ + Q, **E)** grupo CCl₄ + V. **F)** Curso temporal del efecto de la Q en los niveles plasmáticos de la alanina aminotransferasa. PS: espacio portal, NH: hepatocitos en neoformación, IR: reacción inflamatoria, FT: tejido fibrótico. Q: quercetina, V: vehículo (petrolato).

6.2. Glutación reducido

En el panel B de la figura 33 se demuestra que la administración crónica de CCl_4 durante 8 semanas es tiempo suficiente para disminuir la cantidad de GSH en hígado, asimismo, la dosis única y elevada del xenobiótico, que caracteriza el modelo de daño agudo, provoca un decremento significativo en los niveles de esta molécula (figura 34). En ambos modelos, el CCl_4 es capaz de establecer un cuadro de estrés oxidativo en el cual la velocidad de producción de radicales libres supera la tasa de síntesis y/o regeneración del GSH, afectando el estado de óxido-reducción de la célula [47]. Paralelo a lo anterior y de modo particular en el modelo de daño crónico, los niveles de GSH no son sólo afectados por los radicales libres, estudios recientes señalan que el $\text{TGF-}\beta$, principal citocina profibrogénica, disminuye la biosíntesis del tripéptido al inhibir la expresión de la subunidad catalítica de la glutamato cisteína ligasa (GCLC) [101].

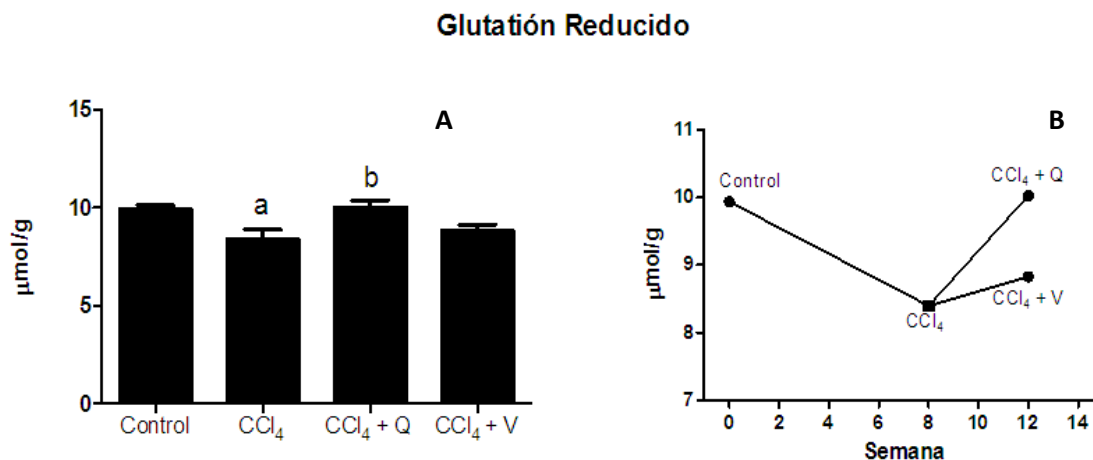


Figura 33. Niveles hepáticos de glutación reducido (GSH) en el modelo de daño crónico.

- A)** Cantidad de GSH en hígado de rata. **B)** Curso temporal de la cantidad de GSH en hígado. Resultados expresados como el promedio \pm el error estándar (SEM) para $n = 6$. Diferencia significativa $p < 0.05$: **a** respecto al grupo control y **b** respecto al grupo de daño con CCl_4 . Q: quercetina, V: vehículo (petrolato).

De acuerdo a la definición clásica de antioxidantes y tomando en cuenta sus características químicas (presencia de grupos hidroxilo fenólicos, insaturación 2-3 en el anillo pirano y conjugación entre los anillos fenólicos), la Q es un sustrato con mayor susceptibilidad a ser oxidado con respecto al GSH, en las células hepáticas sometidas a estrés oxidativo, razón por la cual los niveles

del GSH se recuperan en los grupos tratados con el flavonoide (figuras 33 y 34). Además, Moskaug y colaboradores reportaron que los flavonoides como la Q tienen la capacidad de incrementar la expresión de la GCLC, enzima que limita la velocidad de reacción de síntesis del GSH, contrarrestando con ello los efectos del TGF- β [102].

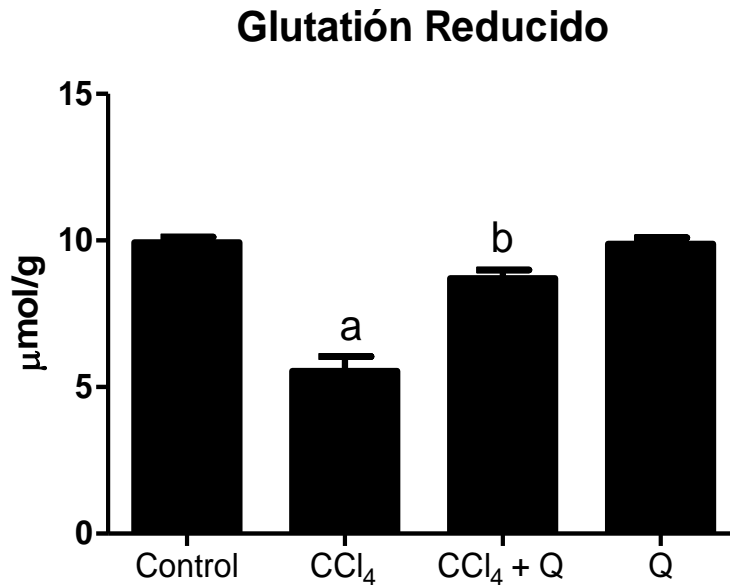


Figura 34. Niveles hepáticos de glutación reducido (GSH) en el modelo de daño agudo.

Resultados expresados como el promedio \pm el error estándar (SEM) para $n = 6$. Diferencia significativa $p < 0.05$: **a** respecto al grupo control y **b** respecto al grupo de daño con CCl₄. Q: quercetina.

Por otra parte, existen estudios que demuestran el potencial del resveratrol y la Q para actuar como moduladores alostéricos de la actividad de un grupo de desacetilasas de histonas denominadas sirtuinas. Estas enzimas regulan la expresión de ciertos genes, en particular la sirtuina Sir2 es un modulador positivo de genes que contribuyen con la resistencia al estrés oxidativo, por ejemplo, regula a la alza la expresión de la superóxido dismutasa [103, 104]. Bajo esta premisa, es válido suponer que la Q contribuye a preservar los niveles de GSH posiblemente mediante la modulación de la expresión de otras proteínas, tales como las enzimas del sistema antioxidante capaces de hacer frente a la elevada producción de radicales libres, y no solo interactuando y estabilizando a los radicales libres.

6.3. Glucógeno

El organismo emplea la glucosa como fuente principal de energía, de hecho para el cerebro este monosacárido es la única molécula que aporta energía. El metabolismo de la glucosa no sólo está involucrado en este proceso, además genera compuestos de carbono que constituyen el esqueleto de otras moléculas con importante función biológica tales como aminoácidos, ácidos nucleicos y triglicéridos. Dado el impacto de la glucosa en las funciones metabólicas de los diversos tejidos, su homeostasis es un proceso finamente regulado, en el cual el hígado juega un papel de primer orden [105].

El hígado, sensible a señales hormonales y niveles citosólicos de iones como Ca^{2+} y Mg^{2+} y de moléculas como el adenosín monofosfato cíclico (cAMP, por sus siglas en inglés), almacena los excedentes de glucosa en forma de glucógeno; mientras que al descender los niveles sanguíneos del azúcar se favorece la degradación de la macromolécula insoluble. De acuerdo a los estudios histológicos realizados por Cardell y colaboradores, tanto la síntesis como la ruptura de glucógeno ocurren en la vecindad del SER y la relación entre esta subestructura celular y los procesos referidos es altamente dinámica y se presenta de manera diferencial entre los hepatocitos de la zona centrolobulillar respecto a los de la región periportal [105].

Debido a la estrecha relación que existe entre la función hepática y el metabolismo del glucógeno, cualquier condición que tienda a afectar la integridad del órgano se manifiesta como un desbalance en los almacenes de esta molécula; razón por la cual los niveles de glucógeno decaen considerablemente en los grupos tratados de manera crónica o aguda con CCl_4 (figuras 35 y 36). El efecto del hepatotóxico pudo revertirse con el tratamiento de Q (figura 35); sin embargo, en el modelo de daño agudo, la dosis de CCl_4 a la que fueron expuestas las ratas superó el potencial del flavonoide para prevenir la afectación en la capacidad biosintética del hígado, medida como cantidad de glucógeno (figura 36).

Glucógeno

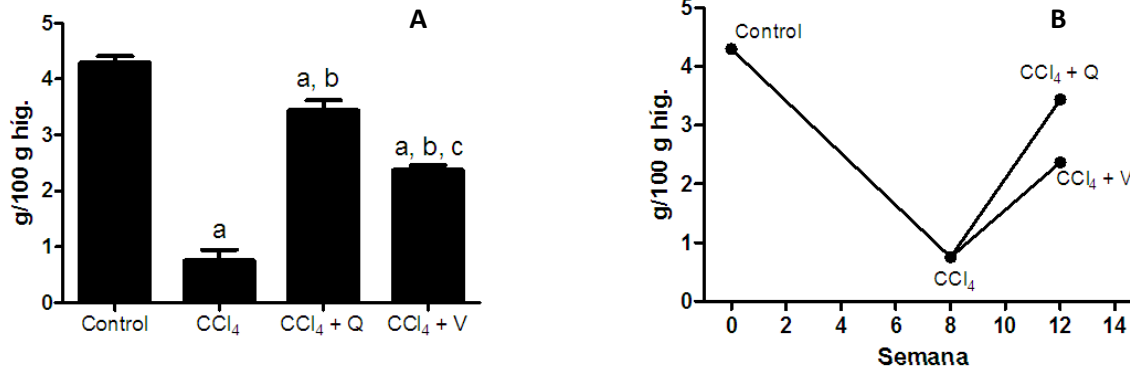


Figura 35. Contenido hepático de glucógeno en el modelo de daño crónico.

A) Efecto del CCl₄ y la quercetina (Q) en la cantidad de glucógeno. **B)** Curso temporal del efecto del CCl₄ y la quercetina (Q) en la cantidad de glucógeno en hígado. Resultados expresados como el promedio \pm el error estándar (SEM) para $n = 6$. Diferencia significativa $p < 0.05$: **a** respecto al grupo control, **b** respecto al grupo de daño con CCl₄ y **c** respecto al grupo de CCl₄ + Q. Q: quercetina, V: vehículo (petrolato).

Las diferencias en el efecto protector de la Q entre ambos modelos de daño hepático, puede deberse al hecho de que la elevada dosis del CCl₄ (modelo de daño agudo) afectó significativamente el SER y las enzimas involucradas en el proceso de glucogénesis, de manera que el breve periodo de administración del flavonoide (una semana) resultó insignificante para prevenir del daño causado por el hepatotóxico (figura 36). La hipótesis anterior se sustenta en el hecho de que las enzimas involucradas en el metabolismo del CCl₄ se localizan principalmente en la membrana del SER, por lo que los radicales libres producidos a partir de este compuesto alteran primeramente a este organelo, dada la proximidad anatómica entre el sitio en que son generados y las moléculas susceptibles (lípidos de membrana) a su acción; mientras que las afectaciones en la mitocondria y el aparato de Golgi, organelos no involucrados directamente en el metabolismo del glucógeno, pueden manifestarse inclusive hasta 12 horas posteriores a la administración del xenobiótico [106 – 108]. La cuantificación de la actividad de las enzimas de función microsomal, por ejemplo la glucosa-6-fosfatasa o monooxigenasas del sistema de citocromos P450, así como técnicas histológicas que permitan identificar gránulos de glucógeno en los hepatocitos, como la tinción de ácido periódico de Schiff (PAS, por sus siglas en inglés), resultarían altamente útiles para comprobar el impacto de la administración del xenobiótico en la integridad del SER y con ello

establecer si las alteraciones en dicho organelo son la causa principal que obstaculiza la acción de la Q para prevenir el balance en el metabolismo del glucógeno [105, 107].

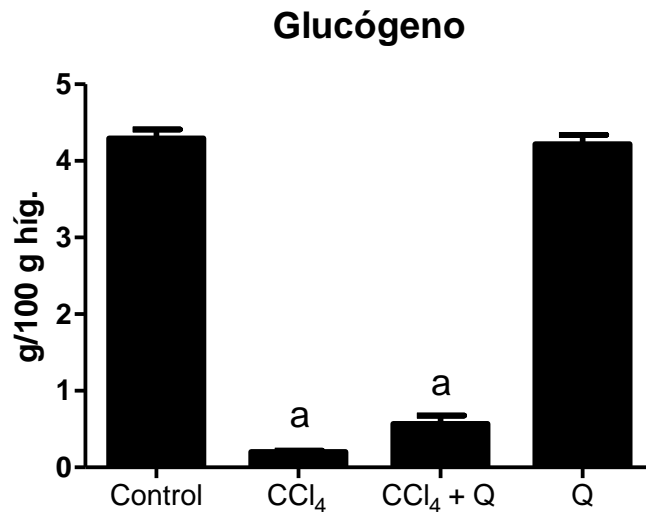


Figura 36. Contenido hepático de glucógeno en el modelo de daño agudo.

Resultados expresados como el promedio \pm el error estándar (SEM) para $n = 6$. Diferencia significativa $p < 0.05$: **a** respecto al grupo control y **b** respecto al grupo de daño con CCl₄.

Adicional al efecto referido, es factible suponer que el transporte de glucosa hacia el hígado pudo alterarse con la dosis del xenobiótico, lo que invariablemente condujo a una disminución en los niveles de almacenamiento del glucógeno. La deficiencia en el transporte de glucosa se puede asociar a un estado de resistencia a la insulina, la cual es definida como la incapacidad del organismo de responder a la acción de la insulina bajo las concentraciones a las que normalmente actúa esta hormona. Si bien, en los primeros años el desarrollo de esta patología se había asociado principalmente al metabolismo de los carbohidratos, actualmente su estudio se ha centrado en el metabolismo de los ácidos grasos, estableciendo una estrecha relación entre la acumulación de lípidos en tejidos periféricos, principalmente en el hígado y el músculo, y la aparición de la resistencia a la insulina [109].

Varman y colaboradores demostraron que los animales que recibieron una dieta rica en grasas durante tres días, además de desarrollar NAFLD, sin acumulación de grasa en otros tejidos, presentaron resistencia hepática a la insulina. Los autores señalan que el hígado graso o esteatosis

redujo los niveles de fosforilación en los residuos de tirosina de los sustratos 1 y 2 del receptor de insulina (IRS 1/2, por sus siglas en inglés), e incrementó la actividad tanto de la JNK como de la isoforma ϵ de la proteína cinasa C (PKC- ϵ , por sus siglas en inglés), eventos moleculares que finalmente abatieron la señalización mediada por la insulina [110].

Existe evidencia científica suficiente que respalda la capacidad del CCl_4 para desarrollar esteatosis [111, 112], así que es probable que los bajos niveles de glucógeno obtenidos aún después del tratamiento preventivo de la Q (figura 36) se asocien, al menos en parte, a un estado de resistencia hepática a la insulina causado por la acumulación de grasa en el tejido hepático. Para confirmar la hipótesis propuesta, en principio, debe validarse que el esquema de daño seguido en el presente estudio haya provocado hígado graso, empleando para tal propósito técnicas histológicas que tiñen de manera específica los depósitos de lípidos (tinción con colorante Rojo o Negro Sudan, por ejemplo).

Por otra parte, Chuang y su equipo de investigación utilizaron cultivos de adipocitos humanos y determinaron que el proceso inflamatorio desencadenado por el $\text{TNF-}\alpha$ aumenta la actividad de JNK y de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B, por sus siglas en inglés), cinasa en residuos de serina y fosfatasa en residuos de tirosina, respectivamente. El proceso de fosforilación y desfosforilación de los residuos del receptor a insulina, mediado por las enzimas referidas, en conjunto con una disminución en la expresión del receptor γ activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR γ , en inglés) se traduce como un modulador negativo de la cascada de señalización de la insulina (figura 37) [113].

Al margen de los resultados publicados por Chuang y colaboradores, se sabe que una dosis elevada de CCl_4 es capaz de incrementar la actividad de citocinas proinflamatorias como el $\text{TNF-}\alpha$, desencadenando un cuadro inflamatorio característico de las hepatopatías [114, 115], el cual pudiera favorecer el desarrollo de resistencia a la insulina, disminuyendo la entrada de glucosa hacia los hepatocitos y por lo tanto la tasa de síntesis de glucógeno. Estrategias celulares y moleculares encaminadas a detectar la incorporación de glucosa a través de la membrana de los

hepatocitos, así como a cuantificar los niveles de activación del TNF- α , de la JNK y de la PKC- ϵ , la translocación del NF- κ B hacia el núcleo, la expresión de PPAR γ , la actividad de PTP-1B y los niveles de fosforilación en residuos de serina y tirosina del IRS-1/2 permitirán elucidar si las alteraciones en el transporte del monosacárido son la causa de la disminución en la reserva de glucógeno y si dicha afectación es causada por la resistencia hepática a la insulina.

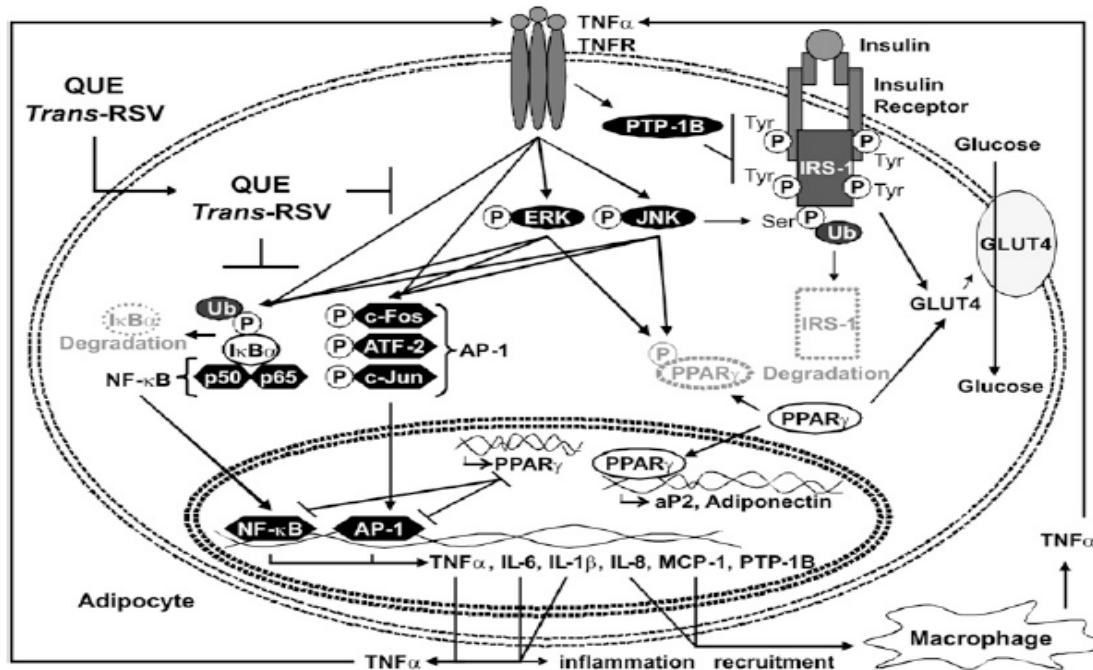


Figura 37. Modelo de acción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) como agente causal de la resistencia hepática a la insulina.

El TNF- α causa resistencia a la insulina por vía indirecta a través de la cascada de señalización de cinasas activadas por mitógeno (MAPK), la transcripción de genes inflamatorios y antagonizando la acción del receptor γ activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR γ), o bien directamente al disminuir la señalización mediada por los sustratos 1 y 2 del receptor de insulina (IRS-1/2).

Tomado de Chuang y colaboradores, 2010 [113].

6.4. Colágena y posible papel fibrolítico de la Q

Cuando el hígado es expuesto crónicamente a un agente etiológico se desencadena el estado patológico denominado fibrosis, condición que precede al cuadro cirrótico. La fibrosis hepática se caracteriza por un desbalance entre la síntesis y la degradación de la MEC, desequilibrio promovido

por la intensa actividad de las células HSC transdiferenciadas, las cuales se convierten en la principal fuente de proteínas constituyentes de MEC, particularmente colágena tipo I y III; asimismo, existe una regulación a la baja en la expresión de enzimas remodeladoras de MEC (primordialmente MMP-1 en humanos y MMP-13 en ratas) y un aumento en la expresión de los inhibidores de las MMP's (TIMP's 1 y 2) [30, 116].

En el presente proyecto, se evaluó el efecto de la Q para revertir la cirrosis hepática utilizando los métodos tradicionales de cuantificación del nivel de colágena y la tinción tricrómica de Masson; ambas estrategias experimentales permitieron demostrar que la administración crónica de CCl₄ promovió la formación de los nódulos fibróticos, también llamados de regeneración, que caracterizan el cuadro cirrótico tanto en roedores como en humanos (figura 38C), y favoreció el desbalance entre la síntesis y degradación de colágena incrementando los niveles de ésta casi 3 veces con respecto al grupo control (figura 39). Como se muestra en la figura 39, la Q fue capaz de revertir de manera significativa el aumento en la deposición de colágena, favoreciendo el proceso de remodelación del tejido (figura 38D), con una contribución mínima del proceso de regeneración hepática (grupo de reversión espontánea); pues al comparar el grado de deposición de tejido fibrótico entre el grupo tratado con Q y el de reversión espontánea (figuras 38D y 38E), y analizar el curso temporal expuesto en el panel F de la figura 38, puede destacarse que el grupo tratado con el flavonoide alcanzó niveles de colágena cercanos a las condiciones basales, y que la arquitectura del lobulillo hepático presenta mayor similitud entre el grupo de tratamiento con Q y el de sujetos sanos, que el de este último con respecto al de reversión espontánea.

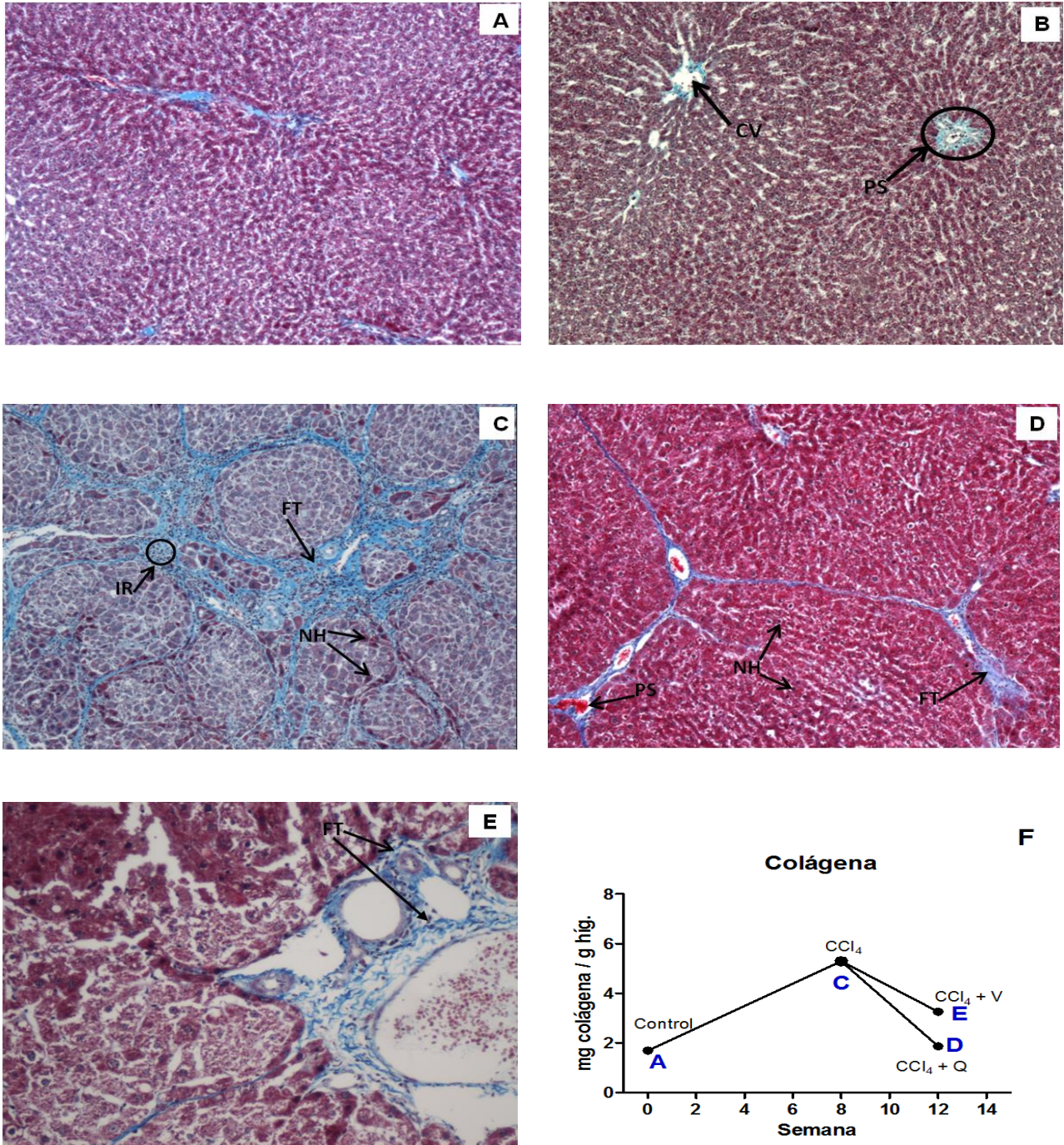


Figura 38. Tinción tricrómica de Masson, modelo de daño crónico. Deposición de fibras de colágena en: **A)** grupo control, **B)** grupo Q, **C)** grupo CCl₄, **D)** grupo CCl₄ + Q, **E)** grupo CCl₄ + V. **F)** Curso temporal del efecto de Q en la deposición de colágena. CV: vena central, PS: espacio portal, FT: tejido fibrótico, NH: hepatocitos en neoformación; IR: reacción inflamatoria.

Q: quercetina, V: vehículo (petrolato).

Los resultados obtenidos señalan el posible papel de la Q como agente fibrolítico, actuando una vez establecido el cuadro cirrótico, más allá de prevenir el desbalance en la síntesis de proteínas de MEC y ejercer una acción antioxidante previniendo las cascadas moleculares que ocurren río arriba al proceso de fibrogénesis. En dicho contexto y retomando la capacidad del flavonoide para actuar como modulador alostérico de sirtuinas [104], es probable que también module alguno(s) de los eventos moleculares implicados en la regulación de la expresión de MMP's y/o TIMP's.

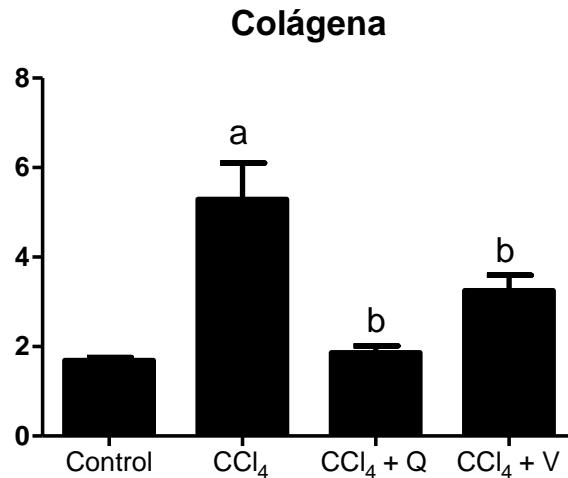


Figura 39. Contenido hepático de colágena en el modelo de daño crónico.

Efecto de la administración de CCl₄ y quercetina (Q) en la cantidad de colágena. Resultados expresados como el promedio ± el error estándar (SEM) para n = 6. Diferencia significativa $p < 0.05$: **a** respecto al grupo control y **b** respecto al grupo de daño con CCl₄.

V: vehículo (petrolato).

Respaldando el probable efecto de la Q en la expresión de MMP's, se encuentra el trabajo publicado por Bona y colaboradores en 2011, quienes demostraron que la administración del flavonoide durante 6 semanas es capaz de disminuir el aumento en los niveles de expresión de MMP-2, causado por la administración crónica de CCl₄. En el mismo sentido, pero con resultados opuestos, Hernández Ortega y su equipo de investigación revelaron que la Q incrementa los niveles de expresión tanto de la MMP-2 como de la MMP-9, favoreciendo el proceso de reparación del daño tisular. La diferencia en cuanto a la regulación en la expresión de las MMP's quizá esté asociada al esquema de tratamiento seguido por ambos equipos de trabajo, pues mientras Bona y colaboradores se centraron en la capacidad de la Q para revertir la fibrosis hepática, la

investigación de Hernández Ortega tuvo como propósito evaluar su potencial como agente preventivo [117, 118].

Ante la contradicción referida y las disimilitudes en cuanto al esquema de tratamiento entre los trabajos publicados, resultaría altamente útil evaluar los niveles de expresión de las MMP's 2, 9, y 13, tomando en cuenta que esta última participa activamente en la degradación de la colágena tipo I y colágena tipo III, proteínas resistentes a la acción de la mayoría de las proteasas y particularmente abundantes en los estadios avanzados de la fibrosis hepática [119]. Los resultados derivados de la cuantificación de los niveles de expresión de MMP's darían un mejor acercamiento respecto al papel de la Q en la modulación de la expresión génica, y además permitirían identificar que dicha acción está fuertemente condicionada por el estadio de la cirrosis o grado de daño hepático.

7. CONCLUSIONES

7.1. Conclusiones particulares

La Q mostró capacidad para:

- Prevenir y revertir la colestasis y la necrosis de hepatocitos inducidas por la administración de CCl₄.
- Mantener los niveles de GSH cercanos a las condiciones basales, aún frente al estrés oxidativo causado por el hepatotóxico.
- Restablecer la función hepática al recuperar el equilibrio en la reserva de glucógeno; sin embargo, no fue capaz de prevenir la afectación que causó una dosis elevada de CCl₄ sobre los niveles de esta macromolécula.
- Recuperar la arquitectura del lobulillo hepático y contribuir en el proceso de reparación tisular después de la exposición crónica al xenobiótico.
- Actuar como posible agente fibrolítico contrarrestando el aumento en los niveles de colágena provocado por el CCl₄.

7.2. Conclusión general

La Q mostró capacidad para prevenir y revertir parcialmente los cambios bioquímicos e histológicos causados por la exposición a CCl₄.

Al aumentar la dosis y/o el periodo de tratamiento con el flavonoide pudiera mejorar los efectos benéficos evidenciados en el presente estudio, haciendo posible el uso de este compuesto para el tratamiento de las hepatopatías en el humano.

8. APÉNDICE. Curvas de calibración

8.1. Fosfatasa alcalina

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

- a) **Disolución estándar de p-nitrofenol (10 μ moles/mL).** Se pesaron 34.78 mg de p-nitrofenol y se aforaron con agua destilada en un matraz volumétrico de 25 mL.
- b) **Disolución 2.** Se tomaron 0.5 mL de la disolución anterior y se aforaron a 100 mL con NaOH 0.02 N.
- c) **Disolución de hidróxido de sodio 0.02 N,** en adelante referida como disolución 3 (tabla 4).

En la tabla 4 se muestran las cantidades añadidas de cada una de las disoluciones a fin de obtener distintas concentraciones del producto de la reacción (p-nitrofenol).

Tabla 4. Curva de calibración de la ALP.

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

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

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

8.2. Gamma-glutamil transpeptidasa

Se pesaron 13.81 mg de p-nitroanilina y se aforaron a 250 mL con ácido acético 1.5 M para preparar la disolución 1. En la tabla 5 se especifican la cantidad de agua destilada y disolución 1 añadidas a cada tubo de reacción.

Tabla 5. Curva de calibración de la γ -GTP.

TUBO No.	Disolución 1 (μ L)	H ₂ O (μ L)	Producto nmoles/mL	Producto μ moles/mL
1	50	1950	10	0.01
2	100	1900	20	0.02
3	150	1850	30	0.03
4	250	1750	50	0.05
5	375	1625	75	0.75
6	500	1500	100	0.10
7	750	1250	150	0.15
8	1000	1000	200	0.20

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

De manera análoga a la curva de calibración de la ALP, se obtuvo una ecuación de la forma $y = mx + b$ para conocer la concentración de producto obtenido y dicho valor se empleó para reportar la actividad enzimática como $\mu\text{mol/Lmin}$.

8.3. Alanina aminotransferasa

A continuación se describe la preparación de los reactivos utilizados en la presente técnica y que son referidos en la tabla 6.

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

En la tabla 6 se indican los reactivos y cantidades empleadas para preparar los distintos puntos de la curva de calibración. Cada punto (concentración conocida de producto) se realizó por duplicado.

Tabla 6. Curva de calibración de la ALT.

Reactivos	No. de tubo						
	1	2	3	4	5	6	7
Disolución sustrato (μL)	250	225	200	175	150	125	100
Disolución 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

Después de adicionar los reactivos referidos en la tabla 6, los tubos se mezclaron vigorosamente en un agitador tipo vórtex y las absorbancias se leyeron a 515 nm en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1201. A partir de los valores de concentración y absorbancia se construyó la curva de calibración y se obtuvo la ecuación de la recta del tipo $y = mx + b$. Con base en los datos de la ecuación, se calcularon las concentraciones (valor de x en la ecuación) a partir de las absorbancias obtenidas para las muestras de plasma.

8.4. Glutación reducido

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

- a) **Disolución patrón de GSH (1 nmol/mL):** se disolvieron 30.733 mg de GSH con disolución de fosfatos 0.3 M hasta completar un volumen de 100 mL.
- b) **Disolución de fosfatos:** 42.6 g de Na_2HPO_4 se disolvieron con agua destilada. La disolución se aforó a 1 L, para obtener una concentración final de 0.3 M.

- c) **Reactivo de Ellman:** se pesaron 40 mg de DTNB y se disolvieron con 100 mL de una disolución de citrato de sodio al 1%

Tabla 7. Curva de calibración del GSH.

Tubo	Disolución patrón de GSH (μL)	Disolución de fosfatos (mL)	Reactivo de Ellman (mL)	GSH (nmol)
1	0	2.2	0.25	0
2	10	2.19	0.25	10
3	50	2.15	0.25	50
4	100	2.10	0.25	100
5	250	1.95	0.25	250
6	450	1.75	0.25	450
7	650	1.55	0.25	650
8	850	1.35	0.25	850

Los tubos se agitaron por inversión y a partir de las absorbancias obtenidas a 412 nm y la concentración conocida de GSH (tabla 7) se calculó la ecuación de la recta. De manera análoga a las determinaciones de la actividad enzimática, con los valores de la pendiente, la ordenada al origen y las absorbancias para cada muestra (**m**, **b** e **y**, respectivamente), se calculó el valor de la concentración de GSH en los homogeneizados de hígado.

8.5. Colágena

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

Utilizando la disolución estándar se preparó una serie de 10 tubos con distintas concentraciones de HP (tabla 8).

Tabla 8. Curva de calibración de la HP

Tubo	Disolución HP (µL)	H₂O (mL)	HP (nmoles)
1	----	2.00	0
2	10	1.99	10
3	20	1.98	20
4	50	1.95	50
5	70	1.93	70
6	100	1.90	100
7	150	1.85	150
8	200	1.80	200
9	300	1.70	300
10	400	1.60	400
11	500	1.50	500

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

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

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Demetris, A. Functional Anatomy of the Normal Liver. <http://zone.medschool.pitt.edu/sites/2011/Shared%20Documents/08F%20GI/GI2008.p2-SolidOrgans.v1.pdf>. 2008.
2. Marieb, E. Anatomía y Fisiología Humana. Pp 480, 500 – 502. España: Pearson, Addison Wesley. 2011.
3. <http://www.bing.com/images/search>
4. Grisham, J. Organizational principles of the liver. In: The liver. Biology and pathobiology. (Eds. Arias, I.; Alter, H.; Boyer, J.; Cohen, D.; Fausto, N.; Shafritz, D. y Wolkoff, A), pp. 3 – 15. Singapore: 5th edition, Willey-Blackwell. 2009.
5. <http://handresen.perulactea.com/2009/02/24/capitulo-8-disfuncion-hepatica>
6. Stryer, L.; Berg, J. y Tymoczko, J. Metabolismo del glucógeno. Bioquímica. Pp. 577 – 600. España: 5ª edición, Editorial Reverté, S.A. 2003
7. McCuskey, R. Endothelial cells and kupffer cells. In: Molecular and cell biology of the liver. (Ed. LeBouton, A.), pp 407 – 427. USA: CRC, Press Inc. 1993
8. Castell, J. El metabolismo de fármacos, generación de metabolitos reactivos y su papel en el origen de las reacciones inmunológicas a fármacos. http://www.uv.es/jcastell/Metabolismo_de_farmacos.pdf
9. Schilsky, M. y Thiele, D. Copper metabolism and the liver. In: The liver. Biology and pathobiology. (Eds. Arias, I.; Alter, H.; Boyer, J.; Cohen, D.; Fausto, N.; Shafritz, D. y Wolkoff, A), pp. 223 – 233. Singapore: 5th edition, Willey-Blackwell. 2009.
10. Rouault, T.; Gordeuk, V. y Anderson, G. The central role of the liver in iron storage and regulation systemic iron homeostasis. In: The liver. Biology and pathobiology. (Eds. Arias, I.; Alter, H.; Boyer, J.; Cohen, D.; Fausto, N.; Shafritz, D. y Wolkoff, A), pp. 235 – 250. Singapore: 5th edition, Willey-Blackwell. 2009.
11. Braiterman, L. y Hubbard, A. Hepatocyte surface polarity: its dynamic maintenance and establishment. In: The liver. Biology and pathobiology. (Eds. Arias, I.; Alter, H.; Boyer, J.;

- Cohen, D.; Fausto, N.; Shafritz, D. y Wolkoff, A), pp. 73 - 82. Singapore: 5th edition, Willey-Blackwell. 2009
12. Cohen, D. Lipoprotein metabolism and cholesterol balance. In: The liver. Biology and pathobiology. (Eds. Arias, I.; Alter, H.; Boyer, J.; Cohen, D.; Fausto, N.; Shafritz, D. y Wolkoff, A), pp 271 – 281. Singapore: 5th edition, Willey-Blackwell. 2009
 13. Cardell, R.; Michaels, J.; Hung, J. y Cardell, E. SERGE, the subcellular site of initial hepatic glycogen deposition in the rat: a radioautographic and cytochemical study. *JCB*. 101: 201 – 206, 1985.
 14. Van Eyken, P. y Desmet, V. Bile duct cells. In: Molecular and cell biology of the liver. (Ed. LeBouton, A.), pp 475 – 505. USA: CRC, Press Inc. 1993
 15. Perri, R. y Shah, V. Hepatic sinusoidal endotelial cells. In: Signaling pathways in liver diseases (Eds. Dufour, J. y Clavien, P), 53 – 62. Germany: 2nd edition, Springer. 2004.
 16. Cogger, V. y Le Couteur. Fenestrations in the liver sinusoidal endothelial cell. In: The liver. Biology and pathobiology. (Eds. Arias, I.; Alter, H.; Boyer, J.; Cohen, D.; Fausto, N.; Shafritz, D. y Wolkoff, A), pp 389 - 406. Singapore: 5th edition, Willey-Blackwell. 2009.
 17. Hernández, Z.; Martínez, E. y Domínguez, J. Mecanismos moleculares de la regulación transcripcional de colágena $\alpha 1(I)$ por células estelares hepáticas. *Redalyc*. 7: 33 – 39, 2005.
 18. Hendriks, H.; Brouwer, A. y Knook, D. Fat-storing cells. In: Molecular and cell biology of the liver. (Ed. LeBouton, A.), pp 429 – 444. USA: CRC, Press Inc. 1993
 19. Wu, J. y Zern, M. Hepatic stellate cells: a target for the treatment of the liver fibrosis. *J Gastroenterol*. 35: 665 – 672, 2000.
 20. Muriel P. Cytokines in liver diseases. In: Hepatotoxicity. From genomics to in vitro and in vivo models (Ed. Sahu S.), pp 371-389. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, UK, 2007.
 21. Muriel P. y Arauz J. Coffe and liver health. In: Emerging health effects and disease prevention. (Ed. Fang, Y.), pp 123 – 135. Malasya: IFT Press Willey-Blackwell. 2012.
 22. Bouwens, L. Pit cells. In: Molecular and cell biology of the liver. (Ed. LeBouton, A.), pp 445 – 473. USA: CRC, Press Inc. 1993

23. Muriel, P. y Aldaba, L. Farmacología hepática experimental. http://avanceperspectiva.cinvestav.mx/wp-content/uploads/2012/11/IMPRIMIBLE_HEPATICA.pdf
24. Beier, J. Arteel, G. y McClain, C. Advances in alcoholic liver disease. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 13: 56 – 64, 2011.
25. Chen, L.; Pan, D.; Zhou, J. y Jiang, Y. Protective effect of selenium-enriched lactobacillus on CCl₄-induced liver injury in mice and its possible mechanisms. *World J. Gastroenterol.* 11: 5795 – 5800, 2005.
26. Muriel, P.; Garcíapiña, T.; Perez, V. y Mourelle, M. Silymarin protects against paracetamol-induced lipid peroxidation and liver damage. *J. Appl. Toxicol.* 12: 439 – 442, 1992.
27. Canbay, A.; Tacke, F.; Hadem, J.; Trautwein, C.; Gerken, G. y Manns, M. Acute liver failure. *Dtsch Arztebl Int.* 108: 714 – 720, 2011.
28. Zhou, W.; Zhang, Q. y Qiao, L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J. Gastroenterol.* 20: 7312 – 7324, 2014.
29. Schuppan, D. y Porov, Y. Hepatic fibrosis: from bench to bedside. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 17: 300 – 305, 2002.
30. Pellicoro, A.; Ramachandran, P. e Iredale, J. Reversibility of liver fibrosis. *FTR.* 5(Suppl 1): 26 – 29, 2012.
31. Hamed, G.; Bahgat, N.; Abdel, F. y Emara, M. Effect of flavonoid quercetin supplement on the progress of liver cirrhosis in rats. *Life Sci. J.* 8: 641 - 649, 2011.
32. Méndez, N.; Chávez, N. y Uribe, M. Obesidad y esteatohepatitis no alcohólica. *Gac. Méd. Méx.* 140: 67 – 72, 2004.
33. Sánchez, W. y Talwalkar, J. Liver Cirrhosis. *Gastroenterology Consultants of San Antonio.* LIVCIR-10/09.
34. Kisseleva, T. y Brenner, D. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal fibrosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 22: 73 – 78, 2007.
35. Braet, F. y Wisse, E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: review. *Comp. Hepatol.* 1: 1 – 17, 2002.

36. Atzori, L.; Poli, G. y Perra, A. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41: 1639 – 1642, 2009.
37. Tahashi, Y.; Matsuzaki, K.; Date, M.; Yoshida, K.; Furukawa, F.; Sugano, Y.; Matsushita, M.; Himeno, Y.; Inagaki, Y. e Inoue, K. Differential regulation of TGF- β signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. *Hepatology.* 35: 49 – 61, 2002.
38. Muriel, P. y Arauz, J. Coffee and liver diseases. *Fitoterapia.* 81: 297 – 305, 2010.
39. Ghosh, A. y Vaughan, D. PAI-1 in tissue fibrosis. *J. Cell Physiol.* 227: 493 – 507, 2011.
40. Beier, J. y Arteel, G. Alcoholic liver disease and the potential role of plasminogen activator inhibitor-1 and fibrin metabolism. *Exp. Biol. Med.* 237: 1 – 9, 2012.
41. Arauz, J.; Galicia-Moreno, M.; Cortés-Reynosa, P.; Pérez-Salazar, E. y Muriel, P. Coffee attenuates fibrosis by decreasing expression of TGF- β and CTGF in a murine model of liver damage. *J. Appl. Toxicol.* 33: 970 – 979, 2013.
42. Pollard, T.; Earnshaw, W. y Lippincott, J. *Cell Biol.* Pp 433 – 435. China: 2nd edition, Saunders Elsevier. 2008.
43. Hajovsky, H.; Hu, G.; Koen, Y.; Sarma, D.; Cui, W.; Moore, D.; Staudinger, J. y Hanzlik, R. Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide S-oxide in rat hepatocytes. *Chem. Res. Toxicol.* 25: 1955 – 1963, 2012.
44. Muriel P. Some experimental models of liver damage. In: *Hepatotoxicity. From genomics to in vitro and in vivo models* (Ed. Sahu S.), pp 119-137. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, UK, 2007.
45. Cheng, N.; Ren, N.; Gao, H.; Lei, X.; Zheng, J. y Cao, W. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Schisandra chinensis* pollen extract on CCl₄-induced acute liver damage in mice. *Food Chem. Toxicol.* 55: 234 – 240, 2013.
46. Sarma, D.; Hajovsky, H.; Koen, Y.; Galeva, N.; Williams, T.; Staudinger, J. y Hanzlik, R. Covalent modification of lipids and proteins in rat hepatocytes and in vitro by thioacetamide metabolites. *Chem. Res. Toxicol.* 25: 1868 – 1877, 2012.
47. Muriel P. Role of free radicals in liver diseases. *Hepatol. Int.* 3:526 – 536, 2009.

48. De David, C.; Rodrigues, G.; Bona, S.; Meurer, L.; González-Gallego, J.; Tuñón, M. y Possa, N. Role of quercetin in preventing thioacetamide-induced liver injury in rats. *Tox. Path.* 39: 949 - 957, 2011.
49. Chen, X. Protective effects of quercetin on liver injury induced by ethanol. *Pharmacogn. Mag.* 6: 135 – 141, 2010.
50. Keppler, D. y Decker, K. Studies on the mechanism of galactosamine hepatitis: accumulation of galactosamine-1-phosphate and its inhibition of UDP-glucose pyrophosphorylase. *European J. Biochem.* 10: 219 – 225, 1969.
51. Stachlewitz, R.; Seabra, V.; Bradford, B.; Bradham, C.; Rusyn, I.; Germolec, D. y Thurman, R. Glycine and uridine prevent D-galactosamine hepatotoxicity in the rat: role of kupffer cells. *Hepatol.* 29: 737 – 745, 1999.
52. Leist, M.; Gantner, F.; Bohlinger, I.; Tiegs, G.; Germann, P. y Wendel, A. Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models. *Am. J. Pathol.* 146: 1220 – 1234, 1995.
53. Keppler, D.; Lesch, R.; Reutter, W. y Decker, K. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp. Mol. Pathol.* 9: 270 – 290, 1968.
54. Rietschel, E.; Kirikae, T.; Schade, U.; Mamat, U.; Schmidt, G.; Loppnow, H.; Ulmer, A.; Zähringer, U.; Seydel, U.; Padova, F.; Schreier, M y Brade, H. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure activity and function. *FASEB J.* 8: 217 – 225, 1994.
55. Fernández, E.; Morales, M.; Pérez, V. y Muriel, P. Immunomodulatory effects of thalidomide analogs on LPS-induced plasma and hepatic cytokines in the rat. *Biochem. Pharm.* 68: 1321 – 1329, 2004.
56. Kasravi, B.; Wang, L.; Wang, X.; Molin, G.; Bengmark, S. y Jeppsson, B. Bacterial translocation in acute liver injury induced by D-galactosamine. *Hepatol.* 23: 97 – 103, 1996.
57. Ewaschuk, J.; Endersby, R.; Thiel, D.; Diaz, H.; Backer, J.; Ma, M.; Churchill, T. y Madsen, K. Probiotic bacteria prevent hepatic damage and maintain colonic barrier function in a mouse model sepsis. *Hepatol.* 46: 841 – 850, 2007.
58. Hirschfield, G.; Heathcote, J. y Gershwin, E. Pathogenesis of cholestatic liver disease and therapeutic approaches. *Gastroenterology.* 139: 1481 – 1496, 2010.

59. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J. Hepatol.* 51: 237 – 267, 2009.
60. Kountouras, J.; Billing, B. y Scheuer, P. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model form cirrhosis in the rat. *Br. J. Exp. Path.* 65: 305 – 311, 1984.
61. Muriel, P. y Suarez, O. Role of lipid peroxidation in biliary obstruction in the rat. *J. Appl. Toxicol.* 14: 423 – 426, 1994.
62. Carocho, M. y Ferreira, I. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* 51: 15 – 25, 2013.
63. <http://www.federacioncafe.com/Documentos/CafeYSalud/CafeYAntioxidantes/Radicales%20libres.pdf>
64. <http://genteconciencia.es/blog/wp-content/uploads/2012/01/antioxidantes-radicales-libres1.jpg>
65. Heim, K.; Tagliaferro, A. y Bobilya, D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13: 572 – 584, 2002.
66. Martínez, S.; González, J.; Culebras, J. y Tuñón, M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 6: 271 – 278, 2002.
67. Hernández, E. Evaluación de los posibles efectos hepatoprotectores de la naringenina en un daño hepático experimental. Tesis CINVESTAV-I.P.N., 2013
68. Pérez-Vargas, E.; Zarco, N.; Shibayama, M.; Segovia, J.; Tsutsumi, J. y Muriel, P. Hesperidin prevents liver fibrosis in rats by decreasing the expression of nuclear factor- κ B, transforming growth factor- β and connective tissue growth factor. *Pharmacology.* 94: 80 – 89, 2014.
69. García-Mediavilla, V.; Crespo, I.; Collado, P.; Esteller, A.; Sánchez-Campos, S.; Tuñón, M. y González-Gallego, J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur. J. Pharmacol.* 557: 221 – 229, 2007.

70. Harwood, M.; Nikiel, D.; Borzelleca, J.; Flamm, G.; Williams, G. y Lines, T. A critical review of the data related to the safety of quercetina and lack of evidence in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem. Toxicol.* 45: 2179 – 2205, 2007.
71. Del Prete, A.; Scalera, A.; Iadevaia, M.; Miranda, A.; Zulli, C.; Gaeta, L.; Tuccillo, C.; Federico, A. y Louguercio, C. Herbal products: benefits, limits, and applications in chronic liver disease. Hindawi Pub. Corporation. 1 – 19, 2012.
72. Fiorucci, S.; Golebiowski, J.; Cabrol, D. y Antonczak, S. DFT study of quercetin activated forms involved in antiradical, and prooxidant biological processes. *J. Agric. Food Chem.* 55: 903 – 911, 2007.
73. <http://spanish.alibaba.com/product-free/taxifolin-antioxidant-104980791.html>
74. Maiti, K.; Mukherjee, K.; Gantait, A.; Nazeer, H.; Pada, B. y Kumar, P. Enhanced therapeutic benefit of quercetin-phospholipid complex in carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats: a comparative study. *Iranian J. Pharmacol. Ther.* 4: 84-90, 2005.
75. Pavanato, A.; Marroni, N.; Marroni, C. y Llesuy, S. Quercetin prevents oxidative stress in cirrhotic rats. *Dig. Dis. Sci.* 52: 2616 – 2621, 2007.
76. Pavanato, A.; Tuñón, M.; Sánchez-Campos, S.; Marroni, C.; Llesuy, S.; González-Gallego, J. y Marroni, N. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Dig. Dis. Sci.* 48: 824 – 829, 2003.
77. Domitrovic, R.; Jakovac, H.; Vasiljev Marchesi, V.; Vladimir-Knezevic, S.; Cvijanovic, O.; Tadic, Z.; Romic, Z. y Rahelic, D. Differential hepatoprotective mechanisms of rutin and quercetin in CCl₄-intoxicated BALB/cN mice. *Acta Pharmacol. Sin.* 33: 1260 – 1270, 2012.
78. Kerber, E.; Bona, S.; Cangeri, F.; Porawski, M.; Tieppo, J. y Marroni, N. Quercetin treatment ameliorates systemic oxidative stress in cirrhotic rats. *ISRN Gastroenterol.* 1 – 6, 2011.
79. http://www.milenio.com/cultura/casos-cirrosis-hepatica-exceso-alcohol_0_203979670.html
80. http://www.salud.gob.mx/ssa_app/noticias/datos/2004-08-02_951.html
81. Poley, R. Practical approaches to assessing liver function. *Pediatr. Ann.* 14: 423 – 430, 1985.

82. Bárcena, J.; García, C.; Padilla, C.; Martínez, E. y Díez, J. Caracterización cinética de la fosfatasa alcalina. <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/30%20FOSFATASA%20ALCALINA.pdf>
83. Magnusson, P.; Larsson, L.; Magnusson, M.; Davie, M. y Sharp, C. Isoforms of bone alkaline phosphatase: characterization and origin in human trabecular and cortical bone. *J. Bone Miner. Res.* 14: 1926 - 1933, 1999.
84. Glossmann, H. y Neville, D. γ -glutamyltransferase in kidney brush border membranes. *FEBS Lett.* 19: 340 – 344, 1972.
85. Huang, X.; Choi, Y.; Im, H.; Yarimaga, O. Yoon, E. y Kim, H. Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and alanine aminotransferase (ALT/GPT) detection techniques. *Sensors.* 6: 756 – 782, 2006.
86. <http://www.biolabo.fr/biolabo/pdfs/noticesSP/biochimieSP/92025%2092027%20ES%20%20TGO%20TGP%20Color.pdf>
87. <http://www2.uca.es/grup-invest/corrosion/integrado/P15.pdf>
88. Martínez, M.; Andrés, D.; Zubillaga, M.; Hager, A.; De Paoli, T. y Boccio J. Conceptos actuales del metabolismo del glutatión. Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 40: 45 - 54, 2006.
89. Tecles, F.; Gutiérrez, C.; Martínez, S.; Bolio, M. y Parra, M. Comparación de la 2,2' - ditiopiridina y el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico en la determinación de colinesterasa en sangre entera de perro. *An. Vet.* 16: 41 – 54, 2000.
90. <http://themedicalbiochemistrypage.org/glycogen.php>
91. Seifter, S.; Dayton, S.; Novic, B. y Muntwyler. The estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Arch. Biochem.* 25: 191 – 200, 1950.
92. http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/internal/pharma_2/lectures_stud/en/pharm/prev_pharm/ptn/pharmaceutical%20chemistry/4%20course/29.General_characteristic_and_classification_of_glycosides..htm
93. Lodish, H.; Berk, A. y Zipursky, S. Collagen: The fibrous proteins of the matrix. In: *Molecular cell biology*. New York: 4th edition, W.H. Freeman. 2000.
94. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21582/figure/A6551/?report=objectonly>

95. Peterkofsky, B. The effect of acid ascorbic on collagen polypeptide synthesis and proline hydroxylation during the growth of cultures fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 152: 318 – 328, 1972.
96. Rojkind, M. y González, E. An improved method for determining specific radioactivities of proline-¹⁴C and hydroxyproline-¹⁴C in collagen and noncollagenous proteins. *Anal. Biochem.* 57: 1 – 7, 1974.
97. Prockop, D. y Udenfriend, S. A specific method for the analysis of hydroxyproline in tissues and urine. *Anal. Biochem.* 1: 228 – 239, 1960.
98. Suvik, A. y Effendy, A. The use of modified Masson's trichrome staining in collagen evaluation in wound healing study. *MJVR.* 3: 39 – 47, 2012.
99. Fischer, A.; Jacobson, K.; Rose, J. y Zeller, R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. Adapted protocol from preparation of cells and tissues for fluorescence microscopy. In: *Basic methods in microscopy* (Eds. Spector y Goldman). Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY, USA. 2006.
100. <http://www.biologiaosea.com.ar/files/seminarios/sem%20estres%20oxidativo.pdf>
101. Liu, R. y Gaston K. Oxidative stress and glutathione in TGF- β mediated fibrogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 48: 1 – 15, 2010.
102. Moskaug, J.; Carlsen, H.; Myhrstad, M. y Blomhoff, R. Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. *Mech. Ageing Dev.* 125: 315 – 324, 2004.
103. Dice, F. Aging and the uncertain roles of sirtuins. In: *The liver. Biology and pathobiology.* (Eds. Arias, I.; Alter, H.; Boyer, J.; Cohen, D.; Fausto, N.; Shafritz, D.; y Wolkoff, A), pp. 955 - 960. Singapore: 5th edition, Willey-Blackwell. 2009.
104. Farghali, H.; Kutinová Canová, N. y Lekic, N. Resveratrol and related compounds as antioxidants with an allosteric mechanism of action in epigenetic drug targets. *Physiol. Res.* 62: 1 – 13, 2013.
105. Cardell, R. y Cardell, E. Carbohydrates and glycogen metabolism. In: *Molecular and cell biology of the liver.* (Ed. LeBouton, A.), pp 65 - 84. USA: CRC, Press Inc. 1993
106. Orellana M. y Guajardo V. Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Rev. Méd. Chile.* 132: 85 – 94, 2004.

107. Recknagel, R.; Glende, E.; Dolak, J. y Waller, R. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmac. Ther.* 43: 139 – 154, 1989.
108. Reynolds, E. Liver parenchymal cell injury. Initial alterations of the cell following poisoning with carbon tetrachloride. *J. Cell Biol.* 19: 139 – 157, 1963.
109. Muñoz D. Resistencia a la insulina inducida por ácidos grasos en células de músculo esquelético L6E9: papel de la carnitina palmitoiltransferasa I (CPT I). Tesis Universidad de Barcelona, 2006.
110. Varman, S.; Zhen-Xiang L.; Xianqin, Q.; Elder, B.; Bilz, S.; Befroy D.; Romanelli, A. y Shulman, G. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Biol. Chem.* 279: 32345 – 32353, 2004.
111. Rasha I.; El-Megeid, A. y Abdel, A. Carbon tetrachloride-induced liver disease in rats: the potential effect of supplement oils with vitamins E and C on the nutritional status. *GMS.* 7: 1 – 10, 2009.
112. Weber, L.; Boll, M. y Stampfl, A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit. Rev. Toxicol.* 33: 105 – 136, 2003.
113. Chuang, C.; Martinez, K.; Xie, G.; Kennedy, A.; Bumrungpert, A.; Overman, A.; Jia, W. y McIntosh, M. Quercetin is equally or more effective than resveratrol in attenuating tumor necrosis factor- α -mediated inflammation and insulin resistance in primary human adipocytes. *Am. J. Clin. Nutr.* 92: 1511 – 1521, 2010.
114. Luster, M.; Simeonova, P.; Gallucci, R.; Bruccoleri, A.; Blazka, M. y Yucesoy, B. Role of inflammation in chemical-induced hepatotoxicity. *Toxicol. Lett.* 120: 317 – 321, 2001.
115. Simeonova, P.; Gallucci, R.; Hulderman, T.; Wilson, R.; Kommineni, C.; Rao, M. y Luster, M. The role of tumor necrosis factor- α in liver toxicity, inflammation and fibrosis induced by carbon tetrachloride. *Toxicol. Appl. Pharm.* 177: 112 – 120, 2001.
116. Reyes-Gordillo, K.; Segovia, J.; Shibayama, M.; Tsutsumi, V.; Vergara, P.; Moreno, M. y Muriel P. Curcumin prevents and reverses cirrhosis induced by bile duct obstruction or CCl₄ in rats: role of TGF- β modulation and oxidative stress. *Fund. Clin. Pharmacol.* 22: 417 – 427, 2008.

117. Bona, S.; Filippin, L.; Cangeri, F.; De David, C.; Valiatti, B.; Isoppo, M.; Machado, R. y Possa, N. Effect of antioxidant treatment on fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *ISRN Gastroenterol.* 1 – 7, 2012.
118. Hernández-Ortega, L.; Alcántar-Díaz, B.; Ruiz-Corro, L.; Sandoval-Rodríguez, A.; Bueno-Topete, M.; Armendariz-Borunda, J. y Salazar-Montes, A. Quercetin improves hepatic fibrosis reducing hepatic stellate cells and regulating pro-fibrogenic/anti-fibrogenic molecules balance. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 27: 1865 – 1872, 2012.
119. Arthur, M. Fibrogenesis. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279: 245 – 249, 2000.