



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE ESTILBENOS SUSTITUIDOS EN EL
DAÑO HEPÁTICO EXPERIMENTAL”.**

TESIS QUE PRESENTA

M. EN C. HORACIO ISAÁC RIVERA GONZÁLEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

DIRECTORES DE TESIS: DR. PABLO MURIEL DE LA TORRE
DR. VÍCTOR MANUEL PÉREZ ÁLVAREZ

MÉXICO, D. F.

OCTUBRE DE 2011.

Este trabajo se llevó a cabo en la Sección Externa de Farmacología, perteneciente al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría de los Doctores Pablo Muriel de la Torre y Víctor Manuel Pérez Álvarez.

Se contó además con una beca del CONACYT para estudios de postgrado con clave de registro: 207031.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
1 GENERALIDADES DEL HÍGADO	3
1.1 ANATOMÍA	3
1.2 ANATOMÍA MICROSCÓPICA.....	5
1.2.1 UNIDADES SECRETORAS HEPÁTICAS.....	5
1.2.2 EL HEPATOCITO.....	7
1.2.3 EL SINUSOIDE HEPÁTICO.....	7
1.2.4 EL SISTEMA BILIAR	8
1.2.5 EL SISTEMA CIRCULATORIO	8
1.3 TIPOS CELULARES SINUSOIDALES HEPÁTICOS.....	8
1.3.1 CÉLULAS DE KUPFFER	9
1.3.2 CÉLULAS ESTELARES.....	10
1.3.3 CÉLULAS DE PIT	10
1.3.4 CÉLULAS ENDOTELIALES	10
1.4 FUNCIONES DEL HÍGADO	11
2 MODELO DE DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR CCl₄	12
2.1 MECANISMO DE ACCIÓN TÓXICA DEL CCl₄.....	13
2.2 EVENTOS MOLECULARES: TNF-ALFA E IL-6.....	14
3 ESTILBENOS SUSTITUIDOS COMO AGENTES ANTIINFLAMATORIOS Y HEPATOPROTECTORES.....	15

3.1 RESVERATROL	15
3.2 ESTILBENOS SUSTITUIDOS Y ESTUDIOS ESTRUCTURA-ACTIVIDAD.....	17
4 INDICADORES BIOQUÍMICOS DEL DAÑO HEPÁTICO.....	20
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVOS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
5 SÍNTESIS QUÍMICA	25
6 EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA.....	26
6.1 GRUPOS EXPERIMENTALES Y TRATAMIENTO	26
6.2 DETERMINACIONES EN PLASMA E HÍGADO.....	27
6.2.1 DETERMINACIÓN DE GSH Y GSSG EN HÍGADO Y SANGRE DE RATA.....	28
6.2.2 CURVA ESTÁNDAR DE GSH Y GSSG	29
6.2.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GGTP	31
6.2.4 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA GGTP	32
6.2.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ALT	33
6.2.6 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA ALT	34
6.2.7 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	35
6.2.8 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS	36
6.2.9 HISTOLOGÍA	37
6.2.10 WESTERN BLOT DE TNF-ALFA E IL-6.....	38
6.2.11 ESTADÍSTICA	40
RESULTADOS	41
7 RESULTADOS DE LA SÍNTESIS QUÍMICA	41
7.1 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LOS ESTILBENOS.....	41

8 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA	54
8.1 RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE GSH Y GSSG EN SANGRE E HÍGADO	54
8.2 RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DEL GRADO DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.....	54
8.3 RESULTADOS DE LOS MARCADORES ENZIMÁTICOS	54
8.4 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN HISTOLÓGICA	55
8.5 RESULTADOS DEL ANÁLISIS POR WESTERN BLOT.....	55
DISCUSIÓN.....	65
CONCLUSIONES	70
PERSPECTIVAS.....	71
BIBLIOGRAFÍA	72

RESUMEN

Recientemente, el desarrollo de nuevos compuestos basados en el esqueleto estilbénico con propiedades antiinflamatorias *in vitro* en neuronas, miocitos y hepatocitos ha aumentando. En el presente trabajo, sintetizamos 10 estilbenos substituidos por medio de un nuevo método asistido por microondas y determinamos su posible actividad hepatoprotectora. Para lograr esto, las ratas fueron administradas con CCl_4 (4g/kg, p.o.) y el compuesto (10 mg/kg, p.o.). Encontramos que, aunque varios compuestos pudieron prevenir el daño por colestasis (actividad de la transpeptidasa del γ -glutamilo), sólo el 2-fluoro-4'-metoxiestilbeno (FME) y el 2,3-difluoro-4'-metoxiestilbeno (2DFME) mostraron resultados parciales pero consistentes. Para corroborar esto, analizamos más profundamente el efecto de tales compuestos. Puesto que las respuestas inflamatorias son mediadas por citocinas, principalmente, por el factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), determinamos la acción del FME y del 2DFME en el nivel de la expresión de esta citocina por Western blot. El incremento en el nivel de $\text{TNF-}\alpha$ por la administración CCl_4 fue suprimido solamente por el 2DFME, lo que concuerda con nuestros resultados bioquímicos para la actividad enzimática de la alanina aminotransferasa (ALT). Este resultado fue confirmado midiendo los niveles de interleucina 6 (IL-6), puesto que su expresión depende de la presencia del $\text{TNF-}\alpha$. En este caso, el 2DFME bloqueó totalmente el aumento de tal proteína inducido por el CCl_4 . Nuestros resultados sugieren que el 2DFME posee más actividad antiinflamatoria *in vivo* que el FME. El 2DFME constituye un posible agente terapéutico para las enfermedades del hígado o un compuesto base para la optimización de su estructura.

ABSTRACT

Recently, the development of novel stilbene-based compounds with *in vitro* anti-inflammatory properties on neurons, myocytes, hepatocytes have been increasing. In the present work, we synthesized by a microwave assisted novel method ten substituted stilbenes and we assessed their hepatoprotectant activities. To achieve this, rats were administered with CCl₄ (4g/kg, p.o.) and compound (10 mg/kg, p.o.). We found that although several compounds were able to prevent cholestatic damage (γ -glutamyl transpeptidase activity), only 2-fluoro-4'-methoxystilbene (FME) and 2,3-difluoro-4'-methoxystilbene (2DFME) showed partial but consistent results. In order to corroborate this, we analyzed more deeply the effect of such compounds. Since inflammatory responses are mediated by cytokines, mainly, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), we determined the action of FME and 2DFME on expression level of this cytokine by Western blotting. The observed increased TNF- α level by CCl₄ administration was abolished only by 2DFME, in agreement with our biochemical findings for alanine aminotransferase (ALT) enzyme activity. This result was confirmed by measuring interleukin-6 (IL-6) levels, since its expression depends on the TNF- α level. In this case, 2DFME completely blocked the CCl₄-induced increase of such protein. Our results suggest that 2DFME possesses more *in vivo* anti-inflammatory properties than FME. 2DFME constitutes a possible therapeutic agent for liver diseases or a template for structure optimization.

INTRODUCCIÓN

1 GENERALIDADES DEL HÍGADO

1.1 Anatomía

El hígado, el órgano mayor del cuerpo, pesa de 1,400 a 1,600 g en el varón adulto y de 1,200 a 1,400 g en la mujer. El hígado está situado en la parte superior del abdomen donde ocupa el hipocondrio derecho y la mayor parte de la región epigástrica, se sitúa íntimamente adosado al diafragma y el polo superior del lóbulo derecho se proyecta a nivel del IV espacio intercostal o de la quinta costilla; el punto más alto se sitúa a 1 cm, por debajo del pezón, cerca de la línea lateral del cuerpo. El límite superior del lóbulo izquierdo se proyecta sobre el borde superior de la sexta costilla. Aquí la parte superior del hígado está junto al diafragma. Las costillas cubren la mayor parte del lóbulo derecho del hígado, mientras que una pequeña parte de su superficie anterior está en contacto con la pared abdominal anterior. El hígado está recubierto por el peritoneo, excepto en el lecho de la vesícula biliar, hilio hepático, partes adyacentes que rodean la vena cava inferior y un espacio situado a la derecha de la vena cava inferior, llamada zona desnuda, que está en contacto con la glándula suprarrenal derecha (impresión suprarrenal) y el riñón derecho (impresión renal). En los humanos, el hígado consiste en una masa continua de células dividida en forma incompleta por separaciones de tejido conectivo. Dentro de esta masa continua de células, las subdivisiones de los conductos biliares y de los vasos hepáticos tienen numerosas conexiones.

A pesar de la estructura monolítica del hígado arbitrariamente se lo considera compuesto por lóbulos, la duplicación peritoneal diafragmática constituye el ligamento coronario, que da origen en su parte media al ligamento falciforme, cuya inserción en el hígado divide a éste en un lóbulo derecho e izquierdo comprendiendo el lóbulo derecho cinco sextos y el lóbulo izquierdo un sexto de la masa hepática (Fig. 1) (Netter, 1981).

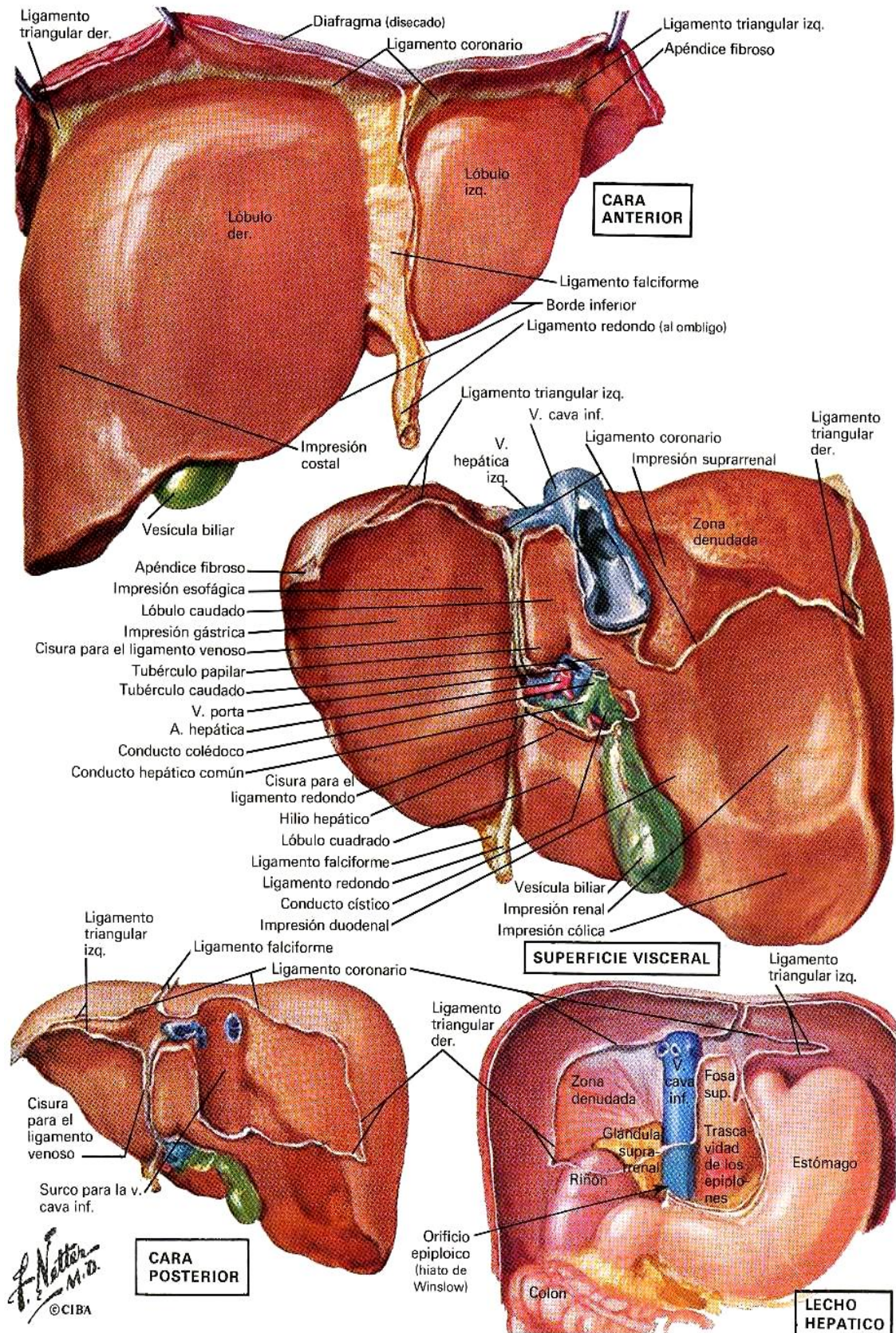


Figura 1. Esquemas anatómicos del hígado.

1.2 Anatomía microscópica

El hígado es una glándula mixta exocrina y endocrina cuyas funciones son efectuadas por varios tipos celulares. Al igual que otras glándulas, presenta en su constitución un parénquima y un estroma. El parénquima (tejido) está compuesto por células epiteliales y hepatocitos, mientras que el estroma está compuesto de tejido conjuntivo, originado a partir del mesodermo. Los vasos que penetran por el hilio son la vena porta, que suministra el mayor porcentaje de sangre proveniente del bazo y del tubo digestivo y la arteria hepática, que participa con menor cantidad de flujo, pero con sangre altamente oxigenada. La sangre de estos dos vasos se mezcla y recorre el hígado a través de los sinusoides hepáticos (González et al., 1996).

1.2.1 Unidades secretoras hepáticas

Aunque el término “lobulillo”, como unidad estructural del hígado, apareció en el siglo XVII en los trabajos de Wepfer y Malpighi, posteriormente se han señalado otras formas de concebir la unidad funcional o estructural del hígado; así surgió a mediados del siglo XIX el concepto de “el lobulillo portal” de Theile y, en el siglo XX, el “acino hepático” de Rappaport (Fig. 2) (González et al., 1996).

a) El lobulillo clásico

Se considera una estructura en forma de prisma con sección transversal hexagonal delimitada por tejido conectivo que se condensa en los ángulos para formar los espacios portas, el centro del lobulillo contiene una vena central, las placas de hepatocitos se sitúan a modo de radios desde las venas centrales hacia la periferia y entre ellas se sitúan los sinusoides sanguíneos. La circulación sanguínea va desde la periferia (espacio porta) al centro (vena central), mientras que la circulación biliar va del centro a la periferia (González et al., 1996).

b) El lobulillo portal

Presenta forma triangular y se halla centrado por un espacio porta (especialmente por un conducto biliar interlobulillar) y delimitado en cada vértice por tres o más venas centrales. Esta estructura se corresponde con la unidad histofisiológica de las glándulas exocrinas; en la cual, segmentos de células secretoras liberan sus productos en un conducto común, localizado en el centro del lobulillo (espacio porta) (González et al., 1996).

c) El acino hepático

Su forma es oval o romboidal y se encuentra centrado por un eje terminal portal que contiene ramas de los diferentes componentes del espacio porta. Dentro de cada acino las células se colocan concéntricamente alrededor de su eje conectivo, de forma que las más próximas a éste (zona I) recibirán la sangre con mayor concentración de oxígeno y de nutrimentos y, por el contrario, las más lejanas (próximas a las venas terminales) (zona III) recibirán sangre de menor calidad. Entre estas dos zonas se encuentra una formación aproximadamente circular en corte transversal (zona II), por la que circula sangre de calidad intermedia (González et al., 1996).

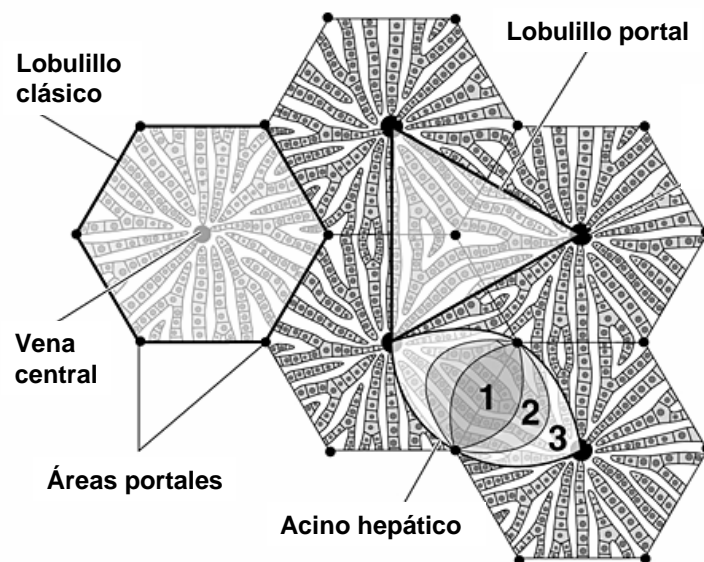


Figura 2. Representación gráfica de las tres concepciones de la unidad funcional del hígado.

1.2.2 El hepatocito

El 60% de las células que constituyen el hígado humano son hepatocitos, que aparecen como células poliédricas de 20 a 30 μm de diámetro aproximadamente, con núcleos prominentes con posición central y citoplasma eosinófilo. Los núcleos son grandes y redondos con discretas variaciones de tamaño. El citoplasma de los hepatocitos es granular y eosinófilo debido fundamentalmente a la abundancia en mitocondrias y retículo endoplásmico liso. Próxima a los canalículos biliares, se observa una zona clara correspondiente a la porción apical de la célula hepática donde están situados el aparato de Golgi y lisosomas secundarios (González et al., 1996).

Existen diferencias tanto estructurales como histoquímicas y bioquímicas entre los hepatocitos portales, los de zonas medias y centrolobulillares. Entre las variaciones topográficas más representativas está la mayor concentración de actividad de fosfatasa alcalinas y de glucosa-6-fosfatasa en las áreas periportales. En las áreas próximas a la vena central, las mitocondrias presentan mayor tumefacción y redondeamiento. Esto refleja su diversidad funcional, que abarca las principales funciones del hígado, como la síntesis de proteínas, triglicéridos, fosfolípidos y colesterol; así como la formación de los ácidos biliares y la bilis; además de la acción detoxificante de este órgano. Por lo tanto los hepatocitos en la zona uno difieren de aquellos en la zona tres (Hevia et al., 1996).

1.2.3 El sinusoides hepático

Los sinusoides son canales vasculares entre las trabéculas hepáticas por donde circula la sangre. Están revestidos principalmente por dos tipos celulares. Unas células de tipo endotelial y otras células mucho mayores interpuestas entre las anteriores, denominadas células de Kupffer, y con actividad fagocítica. Entre las células del revestimiento vascular y los hepatocitos existe un espacio conocido como “espacio de Disse” que contiene plasma sanguíneo y que, en la periferia del lobulillo, contacta con los capilares linfáticos del espacio porta (González et al., 1996).

1.2.4 El sistema biliar

La bilis formada por los hepatocitos es vertida hacia un sistema de conductos que comienza en los canalículos biliares, los cuales empiezan en las trabéculas hepáticas de las áreas centrolobulillares y se dirigen hacia la periferia anastomosándose para acabar formando los conductillos biliares terminales que desembocan en los conductos biliares interlobulillares existentes en los espacios porta, constituyendo una red cuya luz va aumentando según se aproxima al hilio hepático y confluyen para constituir el conducto hepático común (González et al., 1996).

1.2.5 El sistema circulatorio

La sangre que llega al hígado tiene dos orígenes: uno procedente del tubo digestivo y del bazo a través de la vena porta, y otro que llega de la aorta abdominal a través de la arteria hepática. Una vez en el hígado, se distribuye a través de los sinusoides para alcanzar las venas centrolobulillares, las cuales drenan hacia venas sublobulillares que, por medio de las venas hepáticas o suprahepáticas, se vacían en la vena cava inferior (Hevia et al., 1996).

1.3 Tipos celulares sinusoidales hepáticos

El sinusoide hepático (Fig. 3) es un elemento cuya finalidad funcional es múltiple y junto con la sangre en él contenida han de realizar tres funciones fundamentales: 1.- Nutrir adecuadamente las células hepáticas (función nutrimental); 2.- Transferir a través del espacio de Disse y de las microvellosidades del hepatocito los elementos absorbidos en el intestino y transportados por la porta para su transformación intracelular, recibiendo así mismo las sustancias ya transformadas en el hígado para su ulterior reparto por los territorios del organismo (función metabólica) y 3.- Adecuar la hemodinámica hepática para la mejor realización de las funciones nutrimental y metabólica (función hemodinámica) (Barrao, 1996).

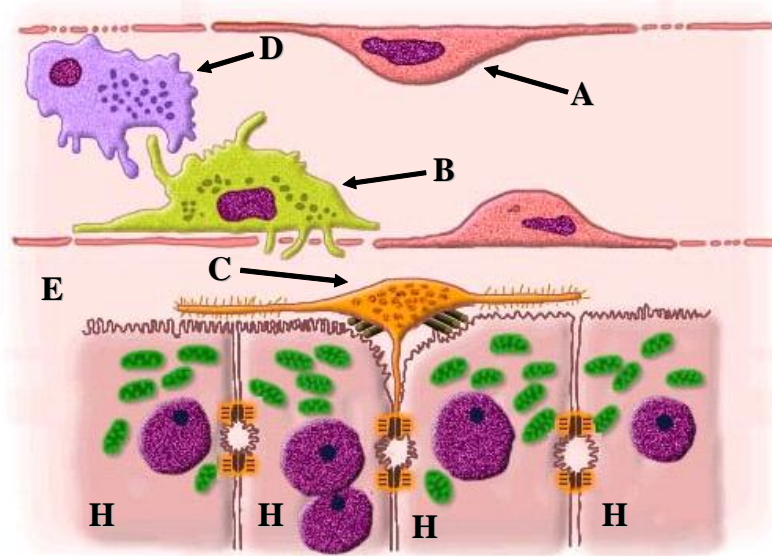


Figura 3. Estructura del senoide hepático: (A) Célula endotelial, (B) Célula de Kupffer, (C) Célula estelar, (D) Célula de Pit, (H) Hepatocito y (E) Espacio de Disse.

1.3.1 Células de Kupffer

Su estructura citoplasmática es característica y contiene gran variedad de vesículas, cuerpos densos y vacuolas, constituyendo un aparato sinusoidal muy desarrollado (Hevia et al., 1996).

Funcionalmente, las células de Kupffer cumplen una misión fundamentalmente macrofágica, fagocitando todo aquello, inútil o nocivo, que es transportado por la sangre sinusoidal. Por otra parte, su membrana presenta receptores Fc- γ del complemento que son activados por sustancias con poder inmunogénico, siendo además capaces de responder a la estimulación con endotoxinas o sustancias inmunomoduladoras, con la producción y liberación de productos con potente efecto biológico, de mediadores de la inmunidad y de agentes tóxicos (Barrao, 1996).

1.3.2 Células estelares

Denominadas igualmente células almacenadoras de grasa, se sitúan en el espacio de Disse, entre la célula endotelial y el hepatocito, sus caracteres más llamativos, los constituye la presencia en el citoplasma de fibras reticulares consideradas como precursoras de colágena y de grandes gotas de grasa con gran cantidad de retinoides y vitamina A (Barrao, 1996).

Las células estelares se consideran el reservorio fundamental de vitamina A del organismo. Además constituyen el lugar de síntesis preferencial del tejido conectivo que constituye el esqueleto del sinusoides en condiciones fisiológicas y en la fibrosis que aparece en la enfermedad crónica del hígado. Son capaces de proliferar y sufrir modificaciones anatómicas en relación con la lesión hepática, transformándose en células de transición llamadas miofibroblastos con una mayor capacidad de síntesis de colágena (Barrao, 1996).

1.3.3 Células de Pit

Se sitúan en el interior de la luz sinusoidal en contacto con el endotelio. Su estructura presenta una evidente polaridad estando emplazado el núcleo en un lado y los organelos citoplasmáticos en el opuesto. Como estos linfocitos tienen actividad natural asesina, se ha propuesto que las células de Pit, constituirían una defensa natural frente al desarrollo de tumores o a la colonización intracelular de virus (Hevia et al., 1996).

1.3.4 Células endoteliales

Su aspecto es plano con un núcleo denso y pequeño, es el único elemento prominente en la luz vascular. En su citoplasma se aprecian numerosas vesículas de micropinocitosis, mitocondrias de pequeño tamaño y escaso retículo endoplásmico rugoso. Su característica más llamativa sin la ausencia de membrana basal, es su aspecto de “lámina

perforada” por la existencia de múltiples orificios completos, de morfología circular o elíptica, denominados foramen (Barrao, 1996).

La función de los foramen, parece ser la de permitir el intercambio de moléculas de la luz del sinusoides y viceversa, actuando como una criba que selecciona con su calibre variable el tamaño de las partículas que han de pasar en un momento determinado, por lo que estas células constituyen el sustrato vascular que regula y soporta el comportamiento circulatorio del complejo sinusoidal (Barrao, 1996).

1.4 Funciones del hígado

Mucho antes que los médicos comprendieran la compleja naturaleza de la función hepática, sabían que el hígado produce bilis y la excreta a través de un sistema de canalículos localizados centralmente, por lo tanto se ha hecho costumbre describir al hígado como una glándula. Aunque también se puede concebir al hígado como un filtro, metabólicamente hablando, que se interpone entre la circulación esplénica y la sistémica.

El hígado actúa como glándula endocrina y exocrina. Desarrolla un papel predominante en:

- 1) El metabolismo intermedio de los nutrientes absorbidos.
- 2) Sintetizar factores esenciales de la sangre.
- 3) Proteger al organismo en su exposición a antígenos externos.
- 4) Neutralizar compuestos tóxicos y formar y excretar la bilis (Netter, 1981).

Además, los sinusoides hepáticos no son meramente conductos pasivos, ya que las células sinusoidales realizan un número de importantes funciones fisiológicas. Secretan lípidos bioactivos y citocinas. Tienen actividad citotóxica, producen colágeno y son los guardianes de la filtración intrahepática de sangre portal (Barrao, 1996).

Los hepatocitos tienen un papel fundamental en el metabolismo de los nutrientes y por lo tanto en el balance del nitrógeno y de la energía, factores determinantes para la función e integridad estructural del organismo. Otra función importante de los hepatocitos es la síntesis y degradación de las proteínas plasmáticas, incluyendo aquellas que mantienen la presión oncótica del plasma, ser utilizadas como transporte para los compuestos hidrofóbicos o insolubles, como factores coagulantes, realizar las funciones enzimáticas, etc. Los hepatocitos también son responsables de la desintoxicación de compuestos externos, especialmente fármacos. Contienen un grupo heterogéneo de proteínas conocidas como citocromo P-450 que catalizan la oxidación y reducción en la primera etapa de la transformación de fármacos (fase I del metabolismo). Luego de completar esta fase, los metabolitos (productos de degradación), son conjugados por el hepatocito (fase II del metabolismo) haciéndolos solubles en agua para que puedan ser excretados en la bilis o en la orina (Gonzalez y Tukey, 2006).

2 MODELO DE DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR CCl₄

El daño hepático agudo (hepatitis), se caracteriza por un gran número de células destruidas, con estimulación de la regeneración y la síntesis y degradación de colágena. Los agentes etiológicos capaces de inducir un daño hepático agudo son diversos e incluyen a las infecciones virales, la exposición a algunos fármacos o sustancias tóxicas, síndromes metabólicos o genéticos, neoplasias y problemas vasculares, entre otros.

Con el fin de estudiar diversos aspectos del daño hepático y de caracterizar los efectos de sustancias con posible actividad contra las enfermedades hepáticas, se han desarrollado varios modelos animales, de los cuales, el más usado, ha sido el que utiliza tetracloruro de carbono (CCl₄) para inducir el daño. A pesar de que la intoxicación por CCl₄ es difícil de encontrar en el marco clínico, este compuesto provee un modelo útil de hepatotoxicidad ya que comparte características bioquímicas e histológicas con la hepatitis humana (Pérez-Tamayo, 1983).

2.1 Mecanismo de acción tóxica del CCl_4

Posterior a la administración oral de CCl_4 , éste se concentra en el hígado y alcanza un nivel máximo de 1 mg/g de hígado de una a dos horas después de su ingestión (Reynolds, 1963). La evidencia histológica más temprana de daño tisular ocurre de 5 a 6 horas después de la administración, cuando la necrosis comienza. Alrededor de las 12 horas post-administración, la necrosis en la zona central es evidente y para las 24 horas una necrosis masiva es manifiesta (Lockard et al., 1983; Zimmermann, 1976).

Se piensa que el mecanismo de acción involucra a la enzima 2E1 del citocromo P450 que rompe de forma homolítica el enlace C—Cl, con la producción de un metabolito activo, el radical triclorometilo (CCl_3^{\bullet}) (Raucy et al., 1993). Este radical puede unirse a macromoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos), alterando procesos celulares cruciales tales como el metabolismo de lípidos, que potencialmente resulta en la degeneración grasa (esteatosis) (Castro, 1984). Se piensa que la formación de aductos entre el CCl_3^{\bullet} y el ADN funciona como evento iniciador del cáncer hepático. Este radical puede también reaccionar con el oxígeno para formar al radical triclorometilperoxilo ($\text{Cl}_3\text{COO}^{\bullet}$), una especie altamente reactiva (DiRenzo et al., 1982). El $\text{CCl}_3\text{OO}^{\bullet}$ tiene una vida media en el rango de los milisegundos y desaparece del tejido reaccionando con sustratos disponibles, con el fin de reestablecer su par de electrones. Este radical tiene una mayor capacidad que el CCl_3^{\bullet} para sustraer un hidrógeno de los ácidos grasos poliinsaturados y así iniciar la reacción en cadena de la peroxidación lipídica, la cual ataca y destruye a los ácidos grasos poliinsaturados, en particular aquellos asociados con fosfolípidos. Esto afecta la permeabilidad de las membranas plasmática, mitocondrial y del retículo endoplásmico, resultando en la pérdida de la homeostasis del calcio intracelular (Comporti, 1985).

El incremento en la concentración intracelular de calcio activa a la proteína cinasa C, que va a iniciar una serie de reacciones que entre otras cosas va a suprimir la secreción de lípidos. Además, estos altos niveles de calcio intracelular destruyen estructuras del citoesqueleto y activan una serie de enzimas tales como proteasas, endonucleasas y

fosfolipasas, cuya función continua resulta en la muerte celular ya sea por necrosis o por apoptosis (Bjornsson et al., 1998).

Dentro de los productos de degradación de los ácidos grasos, están los aldehídos reactivos, especialmente el 4-hidroxinonenal, que se une fácilmente a los grupos funcionales de las proteínas e inhibe la actividad de varias enzimas (Omura et al., 1999).

La intoxicación por CCl_4 también lleva a la hipometilación de componentes celulares; en el caso del ARN, se cree que el resultado final es la inhibición de la síntesis de proteínas, en el caso de los fosfolípidos tiene un papel importante en la secreción de lipoproteínas (Clawson et al., 1987; Nihimaki-Mogami et al., 1996).

2.2 Eventos moleculares: TNF- α e IL-6

Contrario a lo que se puede suponer, la mayoría de los eventos moleculares inflamatorios que suceden después de la administración de CCl_4 , no son mediados por los hepatocitos, sino por las células de Kupffer, las cuales liberan una serie de mediadores de la inflamación dentro de los que sobresale el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Weber, 2003).

El TNF- α tiene una función ambigua en este modelo de daño, ya que puede provocar una respuesta inflamatoria, necrótica y apoptótica en los hepatocitos sensibilizados debido al cese de la síntesis de proteínas y ARN propias del modelo de CCl_4 . Por otro lado, también se ha reportado que esta citocina es capaz de activar señales de regeneración, principalmente mediadas por el receptor de tipo I y la activación subsecuente de varios factores de transcripción y la expresión de interleucina 6 (IL-6) (Weber, 2003). La IL-6 es un factor de respuesta de fase aguda que antagoniza el daño tisular inducido por el TNF- α , a pesar de que su expresión es mediada por la unión de este con su receptor de tipo I, lo que puede ayudar a explicar el rol ambiguo del TNF- α (Weber, 2003).

En la figura 4 se resumen los mecanismos de acción del CCl_4 . Dado que ninguno de estos mecanismos potenciales han probado ser capaces de ejecutar *per se* el espectro completo del daño hepático inducido por CCl_4 , se ha acordado que la toxicidad por dicho compuesto, es un proceso multifactorial, para el cual contribuyen dichos mecanismos.

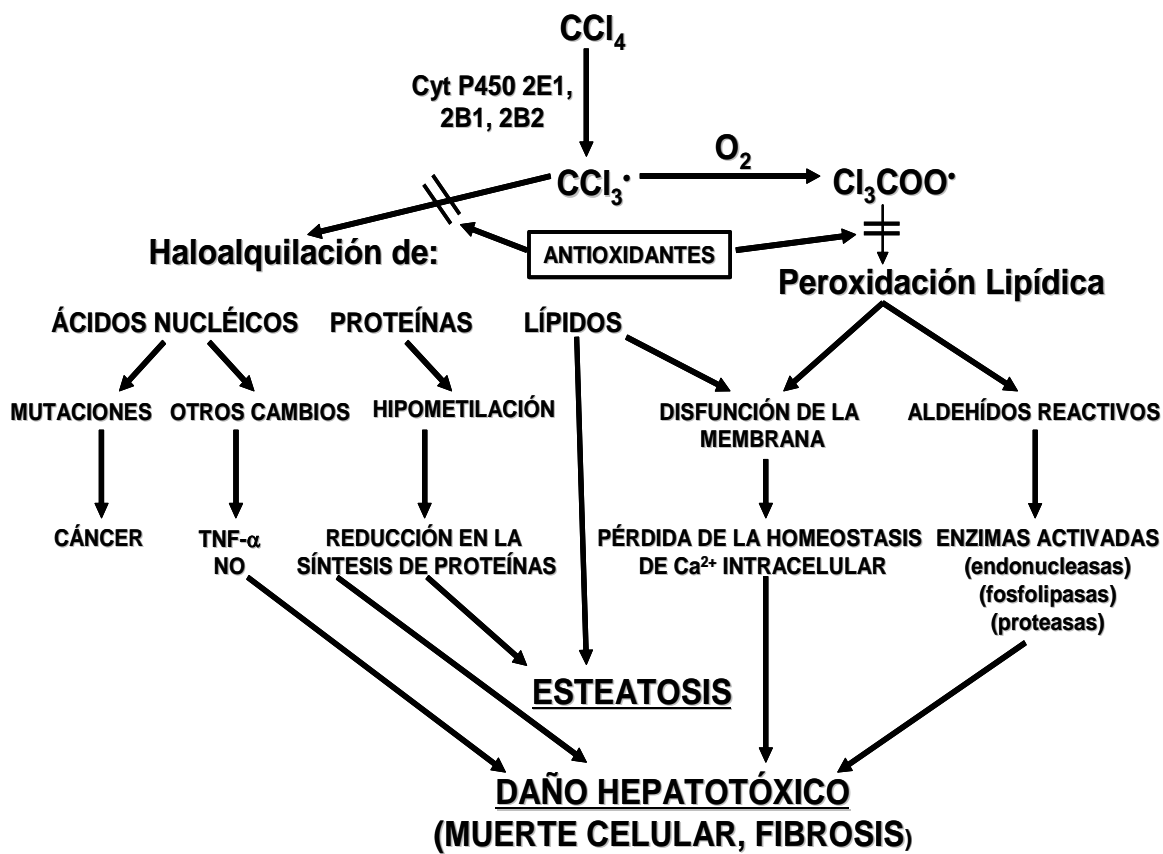


Figura 4. Mecanismos del daño hepático inducido por CCl_4 .

3 ESTILBENOS COMO AGENTES ANTIINFLAMATORIOS Y HEPATOPROTECTORES

3.1 Resveratrol

Como ya se mencionó anteriormente, los radicales libres, especialmente las especies reactivas de oxígeno (ROS), tienen un papel crucial en la iniciación y la progresión del daño hepático inducido por CCl_4 . Por ello, compuestos con capacidad antioxidante han sido

usados tanto para estudiar, como para prevenir el daño por CCl_4 , tales como la vitamina E, el trolox, la N-acetilcisteína y algunos extractos de plantas (Muriel, 1997).

En los últimos años, ha incrementado el interés por estudiar a una molécula que no sólo tiene un efecto antioxidante, sino que también presenta una variedad de efectos que pueden ser relevantes para evitar el desarrollo del daño hepático.

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno; RSV; figura 5) es una fitoalexina presente en una amplia variedad de especies de plantas, como las uvas, cacahuates o moras, lo que lo convierte en un constituyente habitual de la dieta humana (Langcake y Pryce, 1976). Este compuesto, como otros miembros de la familia de los estilbenos, es producido por las plantas en respuesta a un ataque por patógenos, la irradiación UV o la exposición a ozono (Bavaresco et al., 1999; Fremont, 2000; Schubert et al., 1997).

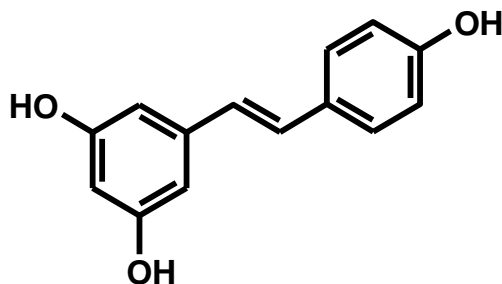


Figura 5. Estructura química del resveratrol.

En las uvas el RSV es sintetizado en respuesta a las infecciones por hongos, por lo que se pueden encontrar concentraciones relativamente altas en el vino, especialmente en el tinto (Goldberg et al., 1996). De hecho, exceptuando a los cacahuates, las uvas y los productos derivados como los vinos tintos, son probablemente los alimentos con mayor contenido de RSV. Este hecho, aunado a su efecto cardioprotector, forman la base del fenómeno conocido como la “paradoja francesa”, que consiste en una relación inversa entre el consumo de vino y la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Koop, 1998). Debido a lo anterior, la mayoría del trabajo inicial sobre el RSV estuvo centrado en sus efectos sobre las rutas metabólicas que regulan la función cardiovascular, pero desde que se

reportó su actividad quimiopreventiva del cáncer, las investigaciones recientes se han dirigido a entender los mecanismos moleculares de sus diversos efectos biológicos.

Una de las características más importantes de la molécula de RSV, es su gran potencial antiinflamatorio y su capacidad de regular la expresión genética. Se ha demostrado que el RSV es capaz de prevenir la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) evitando la degradación de la proteína inhibidora I κ B α (Holmes-McNary y Baldwin, 2000). Además también es capaz de inhibir la activación de AP-1 (Manna et al., 2000). Estos factores de transcripción regulan la expresión de mediadores de la inflamación como el TNF- α , la interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), la sintasa inducible del NO (iNOS) y la enzima ciclooxigenasa (COX), entre otras (Wadsworth y Koop, 1999). Estas moléculas, como ya se explicó con anterioridad son mediadores importantes del daño hepático.

El RSV también ha mostrado tener efectos benéficos directamente sobre el hígado. Se ha observado que es capaz de inhibir y revertir la activación de las células estelares hepáticas, un evento crucial en el desarrollo de fibrosis (Kawada et al., 1998; Godichaud et al., 2000). Un estudio *in vivo* indica que el RSV protege al hígado del daño por colestasis (Ara et al., 2005). En nuestro laboratorio se ha evaluado tanto en modelos de daño agudo como crónico mostrando efectos parciales para prevenir la necrosis y la fibrosis, respectivamente (Rivera et al., 2008; Chávez et al., 2008). Debido a lo anterior esta molécula constituye una interesante opción para explorar compuestos con una mayor actividad antiinflamatoria basados en su estructura, a pesar de que el blanco terapéutico preciso no es conocido todavía (Holmes-McNary y Baldwin, 2000).

3.2 Estilbenos sustituidos y estudios estructura-actividad

Los determinantes estructurales de cada uno de los efectos del resveratrol, no son claros. Durante años los estudios estructura-actividad se enfocaron solo en análogos hidroxilados y los éteres correspondientes (Murias et al., 2004; Murias et al., 2005; Mazué

et al., 2010). Recientemente la sustitución del esqueleto estilbénico con grupos funcionales diversos, así como el uso de diferentes patrones de sustitución se han usado como intentos para mejorar algunas de las diversas actividades biológicas que presenta la molécula (Kang et al., 2009; Moran e al., 2009; Hansen et al., 2010).

Recientemente se han reportado una serie de estilbenos sustituidos, entre los que se encuentran varios análogos del RSV, que presentan una mayor capacidad de inhibir la actividad del NF- κ B (Heynekamp et al., 2006). Resulta interesante que a pesar de la creencia de que las propiedades del RSV dependen de su capacidad antioxidante, algunos de los compuestos propuestos no presentan ni efectos antioxidantes ni grupos hidroxilo en la molécula, solo comparten el grupo metoxilo en la posición 4' y son capaces de inhibir al NF- κ B, siendo el (E)-2-fluoro-4'-metoxiestilbeno (FME) hasta 100 veces más potentes que el RSV (Ver tabla 1).

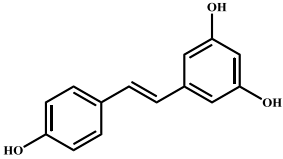
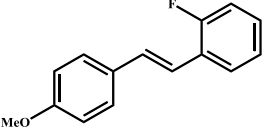
COMPUESTO	IC ₅₀ (μM)	ANTIOXIDANTE
 RESVERATROL	20 ± 3	+
 FME	0.15 ± 0.1	-

Tabla 1. Valores de IC₅₀ para la inhibición de la activación del NF- κ B.

Con base en lo anterior, proponemos dos series de 5 estilbenos sustituidos (figuras 1 y 2) como buenos candidatos a ser evaluados en el daño hepático experimental con el fin de analizar los posibles efectos benéficos de los compuestos en las enfermedades hepáticas. La primera serie comprende compuestos halogenados, incluido el FME y la segunda incluye algunos compuestos con grupos éter, cabe señalar que el grupo metoxilo en la posición 4', se mantiene en todos los compuestos propuestos.

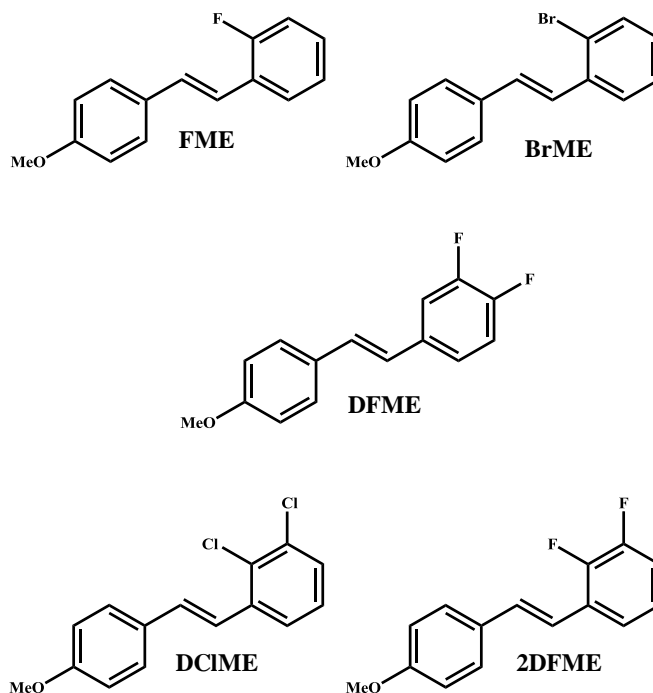


Figura 6. Estructuras de los estilbenos halogenados propuestos como agentes hepatoprotectores.

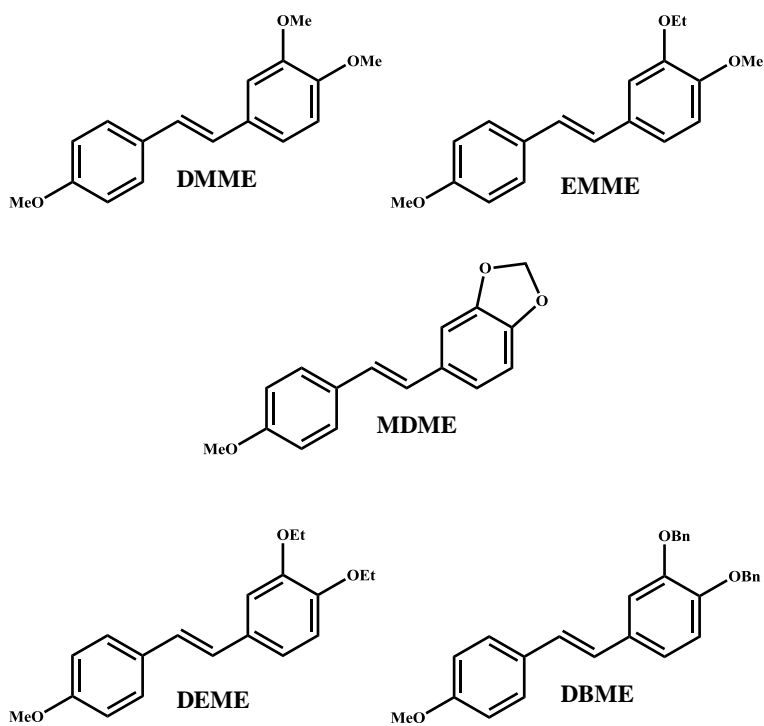


Figura 7. Estructuras de los estilbenos halogenados propuestos como agentes hepatoprotectores.

Dentro del amplio número de estudios que se han llevado a cabo para establecer los mecanismos de todos los efectos que presenta este grupo de compuestos, la gran mayoría se han realizado *in vitro*, de ahí que sea necesario realizar estudios *in vivo* para corroborar dichos efectos y esclarecer su modo o modos de acción.

4 INDICADORES BIOQUÍMICOS DEL DAÑO HEPÁTICO

La naturaleza diversa de la actividad funcional del hígado y su variedad de respuestas al daño, hace de la selección de los marcadores de daño hepático, una labor difícil. Ninguna de las pruebas de funcionamiento hepático es contundente para el análisis clínico de la mayoría de los problemas hepáticos. Las pruebas de funcionamiento hepático, y especialmente las alteraciones de las actividades enzimáticas en suero, proporcionan en gran número de casos la primera sospecha de algún trastorno del hígado (Woodman et al., 1988).

Cuando se evalúa a pacientes con desórdenes hepáticos, es útil agrupar estas pruebas en categorías generales; una clasificación muy útil es la siguiente:

- Pruebas de la capacidad del hígado para transportar aniones orgánicos y metabolizar drogas: en estas se incluyen a las bilirrubinas séricas, bromosulfaleína, verde de indocianina, ácidos biliares séricos, cafeína sérica y pruebas respiratorias.
- Pruebas que detectan lesión a los hepatocitos: este grupo incluye todas las pruebas enzimáticas, de las cuales las aminotransferasas y la fosfatasa alcalina son las más útiles.
- Pruebas de la capacidad biosintética: incluyen a la albúmina sérica, la ceruloplasmina, la ferritina, la α_1 -antitripsina, las lipoproteínas y los factores de coagulación de la sangre.

- Pruebas que detectan inflamación crónica en el hígado, inmunorregulación alterada o hepatitis viral: estas incluyen a las inmunoglobulinas, serologías hepáticas y anticuerpos específicos (Kaplan, 1993).

El hígado contiene miles de enzimas, algunas de las cuales están también presentes en suero aunque normalmente, en muy baja concentración. Estas enzimas no tienen una función conocida en suero y se comportan como las demás proteínas séricas. La elevación de la actividad de una enzima dada en suero refleja un aumento en su tasa de entrada a circulación proveniente de células hepáticas dañadas. Las pruebas de enzimas séricas pueden ser agrupadas en dos categorías:

En la primera categoría se encuentran las enzimas cuya elevación en suero refleja un daño generalizado a los hepatocitos. En este grupo, las más importantes son las aminotransferasas (anteriormente llamadas transaminasas). La actividad de la alanina aminotransferasa (ALT) y de la aspartato amino transferasa (AST) son los indicadores más frecuentes de enfermedad hepática. Estas enzimas catalizan la transferencia de grupos amino- α de la alanina y el ácido aspártico, respectivamente, al grupo ceto- α del ácido oxoglútarico. Esto resulta en la formación de piruvato y oxaloacetato. El incremento en las concentraciones de estas enzimas se relaciona con el daño o la destrucción de un tejido rico en aminotransferasas o a cambios en la permeabilidad de la membrana lo que permite su salida del citoplasma hacia el suero. La ALT parece ser una prueba más sensible y más específica que la AST (Kaplan, 1993).

La segunda categoría abarca a las pruebas que con su elevación en suero reflejan colestasis. El ensayo más utilizado en este grupo es el de la actividad de la fosfatasa alcalina (FA). Se le llama así a un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres fosfato inorgánicos a un pH alcalino óptimo. Como resultado se obtiene fosfato inorgánico y un radical orgánico (Kaplan, 1993). El mecanismo por el cual la enfermedad biliar conduce a una elevación de la enzima, ocurre primariamente por la acción de los ácidos biliares sobre las membranas de los hepatocitos ya que su acción detergente provoca la

solubilización de la unión de la enzima con tales membranas y debido al bloqueo de las vías biliares se regurgita a la circulación sanguínea (Kaplan, 1993).

Otra prueba muy utilizada es la determinación de la actividad de la γ -glutamyl transpeptidasa (γ -GTP), esta enzima cataliza la transferencia de péptidos γ -glutamyl a otros péptidos y L-aminoácidos. Esta enzima se encuentra en la membrana celular de muchos tejidos. Su actividad sérica elevada se presenta principalmente en enfermedades hepáticas, del conducto biliar y páncreas, por lo que su mayor utilidad clínica es conferir especificidad hepática a un valor elevado de fosfatasa alcalina, ya que la γ -GTP no aumenta su actividad en enfermedades óseas (Kaplan, 1993).

Por otra parte, sabemos que la glucosa es una molécula importante para los procesos metabólicos del organismo. La glucosa se almacena en forma de glucógeno en el hígado, de modo que cuando la concentración sérica disminuye, se libera por un proceso conocido como glucogenólisis regulando de esta manera la glicemia y la cantidad de glucógeno en el hígado (Netter, 1981). Cuando el almacenamiento de glucógeno se ve afectado, se pueden presentar diversas alteraciones metabólicas, por lo que su determinación en hígado también se puede considerar como una medida de su capacidad biosintética (Netter, 1981).

La peroxidación lipídica refleja la interacción entre el oxígeno molecular y los ácidos grasos poliinsaturados hasta un deterioro oxidativo de estos últimos que resulta en la formación de malondialdehído (MDA) y otros segundos mensajeros toxigénicos. El lugar donde se realizan dichas reacciones son las membranas biológicas, por lo que se piensa que un daño a este nivel afectaría una serie de funciones celulares y subcelulares (Muriel, 1997).

El tripéptido glutatión (GSH), es el mayor antioxidante y regulador redox de las células, lo que lo convierte en una molécula importante en el combate al daño oxidativo de los constituyentes celulares. El grupo tiol del residuo de cisteína del GSH puede ser oxidado, y éste a su vez formará un enlace disulfuro con otra molécula de GSH, debido a ello, la forma oxidada del GSH que se encuentra en la célula es un dímero de dos moléculas de GSH

oxidadas (GSSG). La determinación del cociente GSH/GSSG provee un parámetro confiable del estado redox celular y es usado frecuentemente como un parámetro de estrés oxidativo a nivel de citoplasma (Han et al., 2006).

HIPÓTESIS

Los compuestos sintetizados mostrarán efectos hepatoprotectores en el daño hepático experimental inducido con CCl_4 en la rata. Esto debido a su gran capacidad de inhibir la expresión del $\text{TNF-}\alpha$, la citocina involucrada en el daño hepático.

OBJETIVOS

General:

- Sintetizar una serie de estilbenos sustituidos y evaluar sus propiedades hepatoprotectoras en el daño hepático experimental inducido con CCl₄ en la rata.

Particulares:

- Sintetizar, purificar y caracterizar física y espectroscópicamente una serie de estilbenos sustituidos.
- Evaluar y comparar las propiedades hepatoprotectoras de los compuestos en el daño hepático inducido con CCl₄ en la rata.
- Determinar si la inhibición en la expresión de la citocina proinflamatoria TNF- α , correlaciona con una prevención del daño.

MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología requerida para el desarrollo experimental se divide en dos secciones generales, la primera es la metodología química para la síntesis orgánica de los estilbenos sustituidos. La segunda es la parte de evaluación farmacológica de los compuestos en un modelo de daño hepático agudo inducido por CCl_4 en la rata.

5 SÍNTESIS QUÍMICA

El trietilfosfito, el cloruro de 4-metoxibencilo, el *tert*-butóxido de potasio y los aldehídos correspondientes, fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Chemical Company, Inc.; el sulfato de sodio y la acetona se obtuvieron de J.T. Baker, México; los disolventes fueron obtenidos de otros proveedores como Alyt y Merck de México, se usaron sin mayor purificación.

La síntesis de ambos estilbenos se realizó utilizando la reacción de Wittig-Horner, de acuerdo al método propuesto por Karthulyari y colaboradores (2006). Este procedimiento involucra en su primera parte la formación del dietil (4-metoxibencil) fosfonato mediante una reacción de Arbuzov entre el bromuro de *p*-metoxibencilo y trietilfosfito (Figura 3).

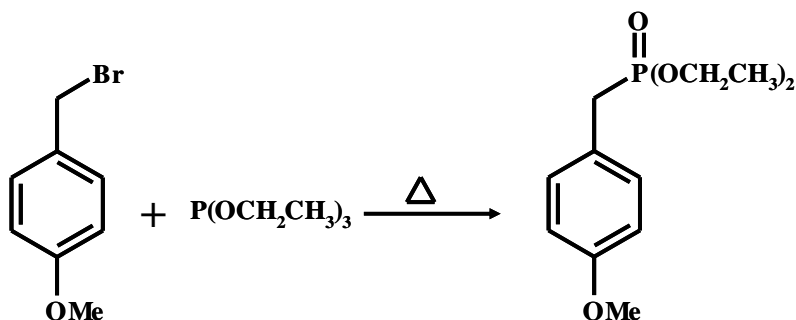


Figura 8. Reacción de Arbuzov para obtener el dietil (4-metoxibencil) fosfonato.

En su segunda parte, esta vía sintética comprende la reacción de Wittig-Horner como tal, en la que se hizo reaccionar el dietil (4-metoxibencil) fosfonato con el aldehído correspondiente para cada estilbeno deseado, cabe mencionar que fue implementado un nuevo método de síntesis que utiliza la irradiación con microondas para reducir el tiempo de reacción a 2 minutos (Figura 4).

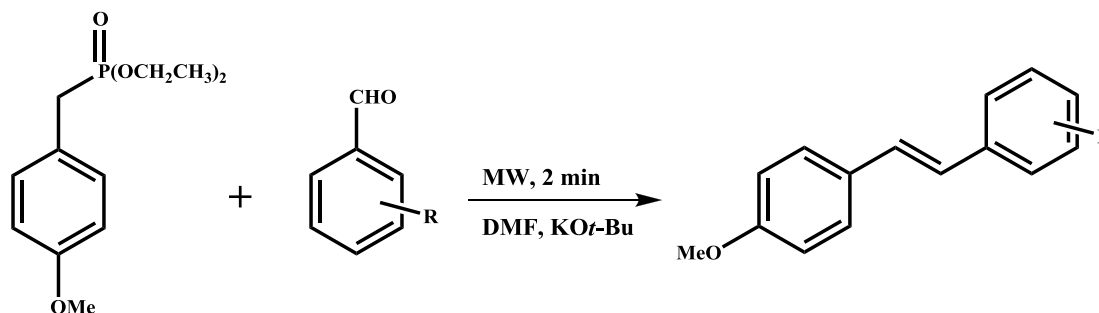


Figura 9. Reacción de Wittig-Horner para obtener los estilbenos deseados.

La estructura de los compuestos sintetizados se determinó con base en sus datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ^1H) y de carbono (RMN ^{13}C). La asignación de los espectros se llevó a cabo por medio del análisis de los desplazamientos químicos y la multiplicidad. Además, se realizó la toma del punto de fusión como parte de la caracterización física del compuesto. Los espectros de RMN- ^1H y ^{13}C se obtuvieron en un espectrómetro Varian XL300GS operando a 300 y 75.4 MHz, respectivamente.

6 EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

6.1 Grupos experimentales y tratamiento

Se usaron ratas Wistar macho, con un peso de 200 a 250 g. Los animales se mantuvieron a temperatura constante y fueron alimentados con una dieta de “Purina Chow” para ratas y agua *ad libitum*. Todos los animales recibieron trato humanitario de acuerdo a los lineamientos institucionales y a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), concerniente a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Así mismo se formaron grupos experimentales (n = 8), cada uno de los cuales recibió por vía oral CCl₄ (disuelto en petrolato líquido 1:1), alguno de los 10 fármacos (suspendido en CMC 0.7 %) y/o el respectivo vehículo de acuerdo a la tabla 2:

GRUPO	CCl₄	FÁRMACO
CONTROL	-	-
CCl₄	✓	-
F+ CCl₄	✓	✓
F + V	-	✓

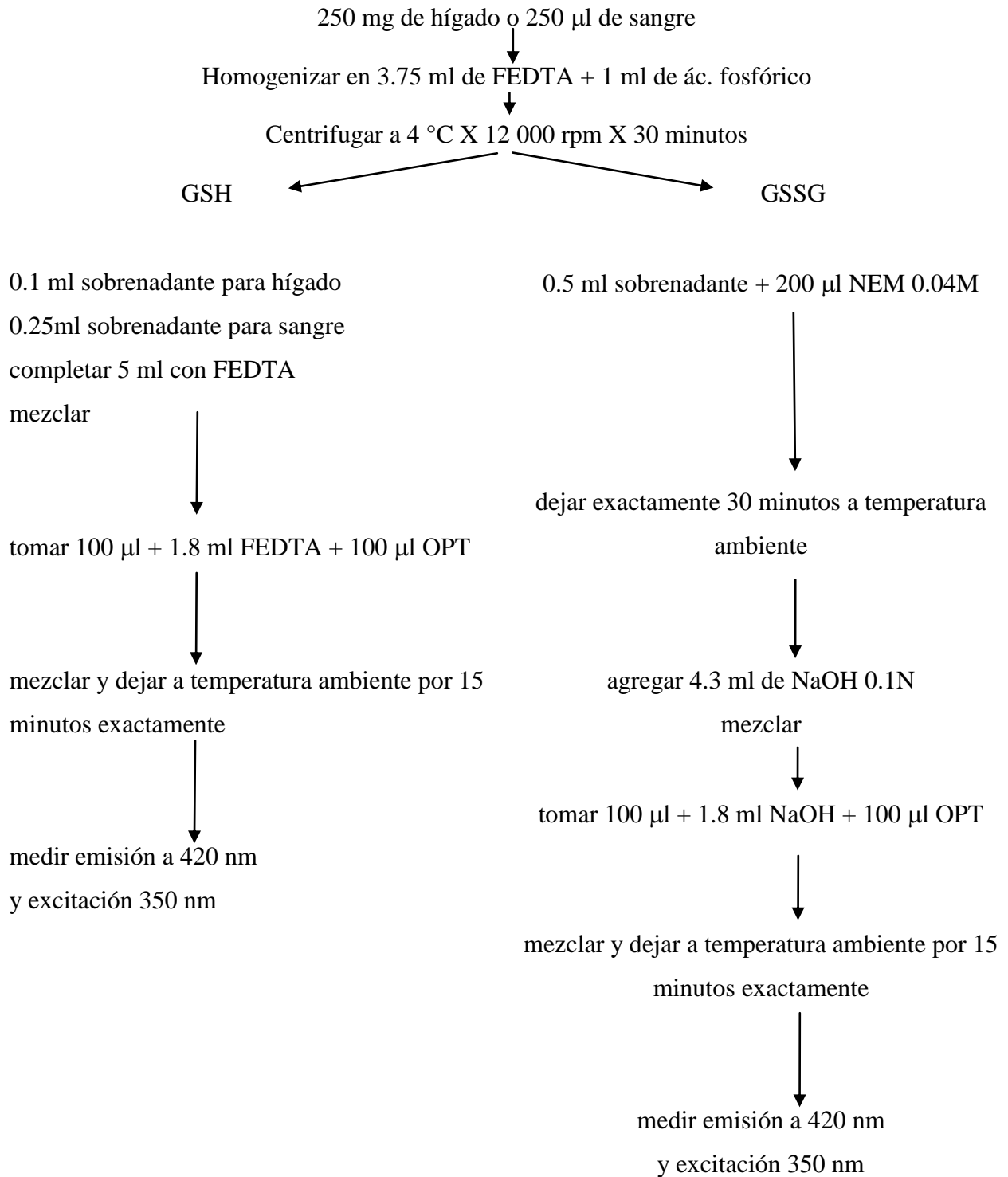
Tabla 2. Tratamiento para los grupos experimentales.

Se administraron 10 mg/kg del fármaco o vehículo y 60 minutos después una dosis de 4 g/kg de peso por vía oral de CCl₄ o vehículo. Los animales se sacrificaron 24 horas después de la administración de CCl₄ o petrolato líquido. Se determinó el grado de daño al hígado mediante el análisis bioquímico que se detallará posteriormente. El sacrificio de las ratas se realizó bajo anestesia con éter etílico y se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca con una jeringa previamente heparinizada. La sangre se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos para obtener el plasma y se extrajeron también muestras de hígado, que fueron lavadas con solución salina isotónica, todas las muestras se mantuvieron en hielo hasta su análisis, excepto las muestras para Western Blot, que se almacenaron a -70 °C.

6.2 Determinaciones en plasma e hígado

Una vez sacrificados los animales se realizaron las determinaciones bioquímicas en sangre, plasma y en hígado de los indicadores de daño y funcionalidad hepáticos, así como la toma de muestras para análisis histológico.

6.2.1 Determinación de GSH y GSSG en hígado y sangre de rata



6.2.2 Curva estándar de GSH y GSSG

Reactivos:

- a) Buffer de fosfatos-EDTA (FEDTA).- fosfato de sodio monobásico 0.1M + EDTA 0.005M. Ajustar el pH=8.
- b) GSH 20 µg/ml en FEDTA
- c) GSSG 20 µg/ml en NaOH 0.1N
- d) o-ftalaldehído (OPT) 1 mg/ml.- pesar solamente la cantidad necesaria y disolver en metanol absoluto. *Se prepara en el momento.*
- e) Ácido fosfórico 25%
- f) N-etilmaleimida 0.04M en agua.
- g) NaOH 0.1N

Técnica **GSH**

Seguir el esquema de adición

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GSH (µg)	0	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.1	1.3	1.4
GSH (µl)	0	20	25	30	35	40	45	55	65	70
FEDTA (ml)	1.900	1.880	1.875	1.870	1.865	1.860	1.855	1.845	1.835	1.830
OPT (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Mezclar bien y dejar a temperatura ambiente por 15 minutos										
Obtener la intensidad de fluorescencia a 350 nm de excitación y 420 nm de emisión										

Técnica **GSSG**

Seguir el esquema de adición

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GSSG (μg)	0	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.1	1.3	1.4
GSSG (μl)	0	20	30	40	50	60	70	80	90	100
NaOH (ml)	1.90	1.88	1.87	1.86	1.85	1.84	1.83	1.82	1.81	1.80
OPT (μl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Mezclar bien y dejar a temperatura ambiente por 15 minutos										
Obtener la intensidad de fluorescencia a 350 nm de excitación y 420 nm de emisión										

6.2.3 Determinación de la actividad de GGTP

En este método se utiliza como sustrato a la γ -glutamil-*p*-nitroanilida que en presencia de la enzima γ -glutamyl transpeptidasa y de un receptor del grupo γ -L-glutamyl (como es la glicil-glicina), produce γ -L-glutamylglicil-glicina y *p*-nitroanilina que puede ser cuantificada espectrofotométricamente (Glossman et al., 1972).

De las dos mezclas de reacción que describen los autores, se utilizó la actividad estimulada con glicil-glicina, con un volumen total de reacción de 1 ml.

En cada tubo poner :

400 μ l de Tris-HCl 200 mM, pH 8.2

100 μ l MgCl₂ 200 mM

100 μ l Glicil-glicina 40 mM, pH 8.2

200 μ l γ -glutamyl-*p*-nitroanilida 10 mM.

- Previa incubación por 10 minutos a 37 °C, se inicia la reacción con 200 μ l de suero.
- Incubar a 37 °C por 30 min y se detiene la reacción con 2 ml de ácido acético 1.5 M.
- Se lee a 410 nm se cuantifica la *p*-nitroanilina producida mediante la curva estándar.
- Hacer un blanco sustituyendo los 200 μ l de suero por agua.

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

6.2.4 Curva de calibración para la enzima γ -GTP

Solución 1. Pesar 13.81 mg de *p*-nitroanilina y llevarlos a 250 ml con ácido acético 1.5 M.

TUBO	μl de sol 1	μl de H₂O	nmoles/ml
1	50	1950	10
2	100	1900	20
3	150	1850	30
4	250	1750	50
5	375	1625	75
6	500	1500	100
7	750	1250	150
8	1000	1000	200

- Calibrar, no requiere blanco.
- Leer absorbancia a 410 nm.

6.2.5 Determinación de la actividad de ALT

La técnica se basa en la cuantificación del complejo formado por el piruvato y la 2,4-dinitrofenilhidrazina. El piruvato se produce a partir de la transferencia del grupo amino de la alanina al ácido α -oxoglutámico. El complejo colorido se absorbe a 515 nm (Reitman-Frankel, 1957).

Se rotulan los tubos blanco y problema para cada muestra.

	BLANCO (ml)	PROBLEMA (ml)
1.- Solución de sustrato	0.25	0.25
2.- Suero Problema	---	0.05
3.- Mezclar y agitar suavemente, incubar a 37 °C durante 60 min.		
4.- Reactivo cromógeno	0.25	0.25
5.- Suero problema.	0.05	---
6.- Incubar a 37 °C durante 15 min.		
7.- NaOH 0.4 N.	2.50	2.50
8.- Leer los tubos a 515 nm.		

6.2.6 Curva de calibración para la enzima ALT

	TUBO No.						
Reactivos	1	2	3	4	5	6	7
Solución sustrato (μl)	250	225	200	175	150	125	100
Solución estándar de piruvato (μl)	---	25	50	75	100	125	150
Buffer de fosfatos (μl)	50	50	50	50	50	50	50
Reactivo cromógeno (μl)	250	250	250	250	250	250	250
NaOH 0.4N (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
μmoles de piruvato	---	0.025	0.05	0.075	0.1	0.125	0.150

Reactivos.

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

Solución de sustrato: Disolver 1.78 g de D/L alanina y 30 mg de ácido α -oxoglutarico en solución buffer; añadir 0.5 ml de hidróxido de sodio 1 N y completar hasta 100 ml con solución buffer. (Conservar a 4°C).

Reactivo cromógeno: Disolver 200 mg de 2,4 dinitrofenilhidrazina en ácido clorhídrico 1 N caliente y completar hasta un litro con HCl 1 N. (La solución que se prepara es 1 mM).

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

6.2.7 Determinación del grado de peroxidación lipídica

El método se fundamenta en que dos moléculas de TBA reaccionan con una molécula de malondialdehído (MDA) formando un pigmento rojo, el cuál tiene un máximo de absorción en solución ácida de 532 nm. El coeficiente de extinción molar del complejo colorido a 535 nm es de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Buedge y Aust, 1978).

Reactivos:

- Tris HCl 150 mM pH=7.4.
- Acido tricloroacético (TCA) al 15%.
- Acido tiobarbitúrico (TBA) 0.375% p/v en TCA al 15% (Se prepara en el momento la cantidad necesaria).

Procedimiento:

- Pesar 0.5 g de hígado.
- Homogenizar en 5 ml de agua.
- Tomar 300 μl del homogenado al 10% y agregar 700 μl de Tris-HCl 150 mM para completar 1 ml
- Incubar a 37 °C por 30 minutos.
- Agregar 2 ml de TBA al 0.375% disuelto en TCA al 15 %.
- Poner a ebullición por 45 minutos.
- Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos y leer el sobrenadante a 532 nm.

Cálculos:

$$C = \frac{A}{\xi l}$$

Donde:

A Es la absorbancia de la muestra

l Es la longitud de la celda (0.75 cm para el Coleman 54)
(1 cm para el Shimadzu UV-1203)

ξ Es el coeficiente de extinción del malondialdehído (MDA)= $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

- Expresar como nmoles de MDA/mg proteína.

6.2.8 Determinación de proteínas

Se determinó la cantidad de proteínas de acuerdo al método descrito por Bradford (1976).

Reactivos:

- Acido fosfórico al 85 % 100 ml
- Alcohol etílico 50 ml
- Azul de coomasie G-250 100 mg
- Aforar a un litro con agua.

Técnica:

- 1). Se toman 100 μ l del homogenado de hígado y se llevan a 1,000 μ l en agua tridestilada.
- 2). Tomar alícuotas para proteínas y llevarlas a 100 μ l con agua (20 μ l de la dilución anterior + 80 μ l de agua tridestilada).
- 3). El blanco se prepara poniendo 100 μ l de agua.
- 4). Añadir 2.4 ml del reactivo.
- 5). Leer absorbancia a 595 nm.
- 6). Se prepara una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (1mg/ml), poniendo 0, 10, 15, 25, 20, 30, 35, 40, 45, 50 μ l.
- 7). Completar con agua a 100 μ l.

6.2.9 Histología

Las técnica utilizada fue la de inclusión en parafina y tinción de rutina con hematoxilina/eosina (HE). Se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Los cortes de hígado se depositaron en un vial conteniendo una solución fijadora de formaldehído (formol) al 10% en PBS, el tiempo mínimo de fijación fue de 24 horas. Los cortes se lavaron con agua corriente, se deshidrataron en alcoholes y embebieron en parafina. Se hicieron cortes de 6-7 micras de grosor y se cubrieron con silano. Se realizó lo siguiente:

- 1) Las rebanadas se desparafinaron y rehidrataron con xileno, alcohol absoluto y alcohol al 95%.
- 2) Se aplicó la hematoxilina de Harris durante 15 min.
- 3) Se enjuagaron en agua corriente por 2 minutos.
- 4) Se diferenciaron en alcohol ácido con 3 a 10 inmersiones. Verificar la diferenciación con microscopio, los núcleos deben distinguirse y el fondo debe ser de color muy tenue o incoloro.
- 5) Se lavaron en agua corriente brevemente.
- 6) Se sumergieron en agua amoniacal o saturada de carbonato de litio hasta que las secciones fueron de color azul brillante.
- 7) Se lavaron en agua corriente de 10 a 20 min.
- 8) Se tiñeron con eosina de 15 s a 20 min dependiendo de la edad de la eosina y el grado de contraste deseado (contrateñido).
- 9) Se lavaron con alcohol al 95%.
- 10) Se lavaron con alcohol absoluto, al menos dos cambios.
- 11) Se lavaron con xileno 2 cambios.
- 12) Se montaron en el polímero Permout o bálsamo.

6.2.10 Western Blot de TNF- α e IL-6.

Para la obtención de proteínas:

- Homogeneizar 0.2 g de hígado en 1 mL de trizol y agregar 200 μ L de cloroformo.
- Centrifugar a 12,000 rpm durante 20 minutos y recuperar la fase que corresponde a las proteínas.
- Agregar 300 μ L de etanol al 96 % y agitar fuertemente.
- Dejar reposar durante 10 minutos para precipitar al DNA.
- Centrifugar a 12,000 rpm por 10 minutos, recuperar el sobrenadante y agregar isopropanol hasta llenar el tubo.
- Dejar reposar por 20 minutos.
- Centrifugar a 12,000 rpm por 15 minutos.
- Tirar el sobrenadante y agregar hidrato de guanidina, agitar y centrifugar durante 10 minutos (repetir 3 veces).
- Homogeneizar el paquete utilizando 500 μ L de hidrato de guanidina.
- Centrifugar a 12,000 rpm por 15 minutos.
- Tirar el sobrenadante y agregar etanol al 96 % hasta llenar el tubo, reposar por 10 minutos.
- Agitar vigorosamente y centrifugar a 12,000 rpm por 15 minutos.
- Tirar el sobrenadante e incubar el paquete a 58 °C por 2 minutos.
- Agregar 2 mL de SDS al 1 % y resuspender las proteínas.
- Centrifugar a 12,000 rpm por 20 minutos, recuperar el sobrenadante.
- Determinar proteínas de acuerdo a la siguiente curva de calibración:

Tabla 9. Curva de calibración de proteínas

AGUA μL	ALBÚMINA DE SUERO BOVINO μL	ÁCIDO BICINCONÍNICO μL
100	0	100
98	2	100
96	4	100
94	6	100
92	8	100

Para el Western Blot:

- Se carga el volumen necesario para tener 50 μg de proteína en un gel de acrilamida al 12% y se procede a separar las proteínas.
- Una vez separadas las proteínas en el gel, transferirlas a una membrana de fluoruro de polivinilo.
- Después de la transferencia, bloquear las uniones inespecíficas con una solución de leche descremada al 7% en PBS tween 0.05%.
- Agregar el anticuerpo primario de ratón $\alpha\text{-TNF-}\alpha$ (AD1837P de Millipore; 1:15,000), ratón $\alpha\text{-IL-6}$ (ARC0962 de Biosource; 1:15,000) ó ratón $\alpha\text{-}\beta\text{-actina}$ (1:10,000) y dejar incubando toda la noche a 4 °C.
- Lavar la membrana y adicionar el anticuerpo secundario (chivo $\alpha\text{-conejo}$ y conjugado con la peroxidasa, en una dilución 1:10,000), dejar actuar durante una hora a temperatura ambiente.
- Realizar 4 lavados de 10 minutos y 3 de 5 minutos con PBS tween 0.05%.
- Detectar las señales de interés mediante un kit de quimioluminiscencia.
- Realizar la densitometría de las bandas de interés utilizando el software ImageJ del NIH.

6.2.12 Estadística

Las pruebas estadísticas aplicadas a los datos de cada grupo experimental fueron un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de una prueba de comparación de Tukey; se ingresan los datos de la media (M), el tamaño de la muestra (n) y la desviación estándar (DE); esta prueba proporciona la diferencia estadísticamente significativa con una $P < 0.05$. La prueba se corrió en un paquete de Sigma-Stat versión 2.0 (Jandel Corporation, U.S.A.).

RESULTADOS

7 RESULTADOS DE LA SÍNTESIS QUÍMICA

Dietil-4-metoxibencilfosfonato: Rendimiento: 94%, aceite amarillo; RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 1.24 (t, $J = 7.14$ Hz, 6H); 3.09 (d, $J = 21.17$ Hz, 2H); 3.78 (s, 3H); 3.95-4.05 (m, 4H); 6.84 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H); 7.47 (dd, $J = 8.8, 2.47$ Hz, 2H). Figura 10.

FME (2-fluoro-4'-metoxiestilbeno): Rendimiento: 53%, p.f. = 103-105 °C; RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 3.83 (s, 3H); 6.9 (A₂, $J = 8.79, 2.79$ Hz, 2H); 7.03-7.24 (m, 5H); 7.71 (X₂, $J = 8.79, 2.79$ Hz, 2H); 7.59 (ddd, $J = 7.62, 1.9, 1.76$ Hz, 1H). Figura 11.

BrME (2-bromo-4'-metoxiestilbeno): Rendimiento: 55%, p.f. = 63-65 °C; RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 3.82 (s, 3H); 6.90 (X₂, $J = 8.79, 2.79$ Hz, 2H); 6.98 y 7.32 (sistema AB, $J = 16.22$ Hz, CH=CH); 7.07 (dt, $J = 6.32, 1.65$ Hz, 1H); 7.25 (M, 1H); 7.48(A₂, $J = 8.79, 2.79$ Hz, 2H); 7.56 (dd, $J = 6.6, 1.38$ Hz, 1H); 7.63 (dd, $J = 6.33, 1.65$ Hz, 1H). Figura 12.

DFME (3,4-difluoro-4'-metoxiestilbeno): Rendimiento: 48%, p.f. = 91-93 °C; RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 3.82 (s, 3H); 6.81-6.97 (sistema AB, $J = 16.5$ Hz, CH=CH); 6.86 (X₂, $J = 8.8, 2.2$ Hz, 2H); 7.05-7.17 (m, 2H); 7.23-7.30 (m, 1H); 7.48 (A₂, $J = 8.78, 2.77$ Hz, 2H). Figura 13.

2DFME (2,3-difluoro-4'-metoxiestilbeno): Rendimiento: 49%, p.f. = 74-76 °C; RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 3.82 (s, 3H); 6.90 (X₂, $J = 8.78, 2.77$ Hz, 2H); 6.98-7.04 (m, 2H); 7.06-7.17 (sistema AB, $J = 16.53$ Hz, CH=CH); 7.29-7.33 (m, 1H); 7.43 (A₂, $J = 8.78, 2.77$ Hz, 2H). Figura 14.

DCIME (2,3-dicloro-4'-metoxiestilbeno): Rendimiento: 61%, p.f. = 94-96 °C; RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 3.82 (s, 3H); 6.90 (X₂, $J = 8.9, 2.79$ Hz, 2H); 7.0 y 7.35 (sistema AB, $J = 16.22$ Hz, CH=CH); 7.18 (dd, $J = 7.91$ Hz, 1H); 7.32 (dd, $J = 6.32, 1.65$ Hz, 1H); 7.47 (A₂, $J = 8.9, 2.79$ Hz, 2H); 7.54 (dd, $J = 6.32, 1.65$ Hz, 1H). Figura 15.

DMME (3,4-dimetoxi-4'-metoxiestilbeno): Rendimiento: 50%, p.f. = 133-135 °C; RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 3.83 (s, 3H); 3.9 (s, 3H); 3.95 (s, 3H); 6.84-6.93 (m, 5H); 7.01-7.06 (m, 2H); 7.47 (d, $J = 8.91$ Hz, 2H). Figura 16.

EMME (3-etoxi-4-metoxi-4'-metoxiestilbeno): Rendimiento: 51%, p.f. = 132-134 °C; RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 1.5 (t, $J = 7.03$ Hz, 3H); 3.86 (d, $J = 18.46$ Hz, 6H); 4.17 (c, $J = 7.04$ Hz, -CH₂-); 6.84-6.91 (m, 5H); 7.00-7.06 (m, 2H); 7.43 (d, $J = 8.94$ Hz, 2H). Figura 17.

DEME (3,4-dietoxi-4'-metoxiestilbeno): Rendimiento: 40%, p.f. = 146-148 °C; RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 1.32 (t, *J* = 7.03 Hz, 6H); 3.82 (s, 3H); 4.09 (c, *J* = 7.04 Hz, -CH₂-); 6.85-7.00 (m, 5H); 7.30-7.34 (m, 2H); 7.74 (d, *J* = 8.94 Hz, 2H). Figura 18.

DBME (3,4-dibenciloxi-4'-metoxiestilbeno): Rendimiento: 73%, p.f. = 129-131 °C; RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 3.82 (s, 3H); 5.17 (d, *J* = 9.5 Hz, 4H); 6.86-6.91 (m, 5H); 6.99 (dd, *J* = 6.32, 1.92 Hz, 1H); 7.11 (d, *J* = 1.92 Hz, 2H); 7.29-7.49 (m, 11H). Figura 19.

MDME (3,4-metiledioxi-4'-metoxiestilbeno): Rendimiento: 45%, p.f. = 143-145 °C; RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 3.80 (s, 3H); 5.95 (s, -CH₂-); 6.79 (d, *J* = 7.96 Hz, 1H); 6.86-6.91 (m, 5H); 7.03 (d, *J* = 1.65 Hz, 1H); 7.40 (d, *J* = 8.78 Hz, 2H). Figura 20.

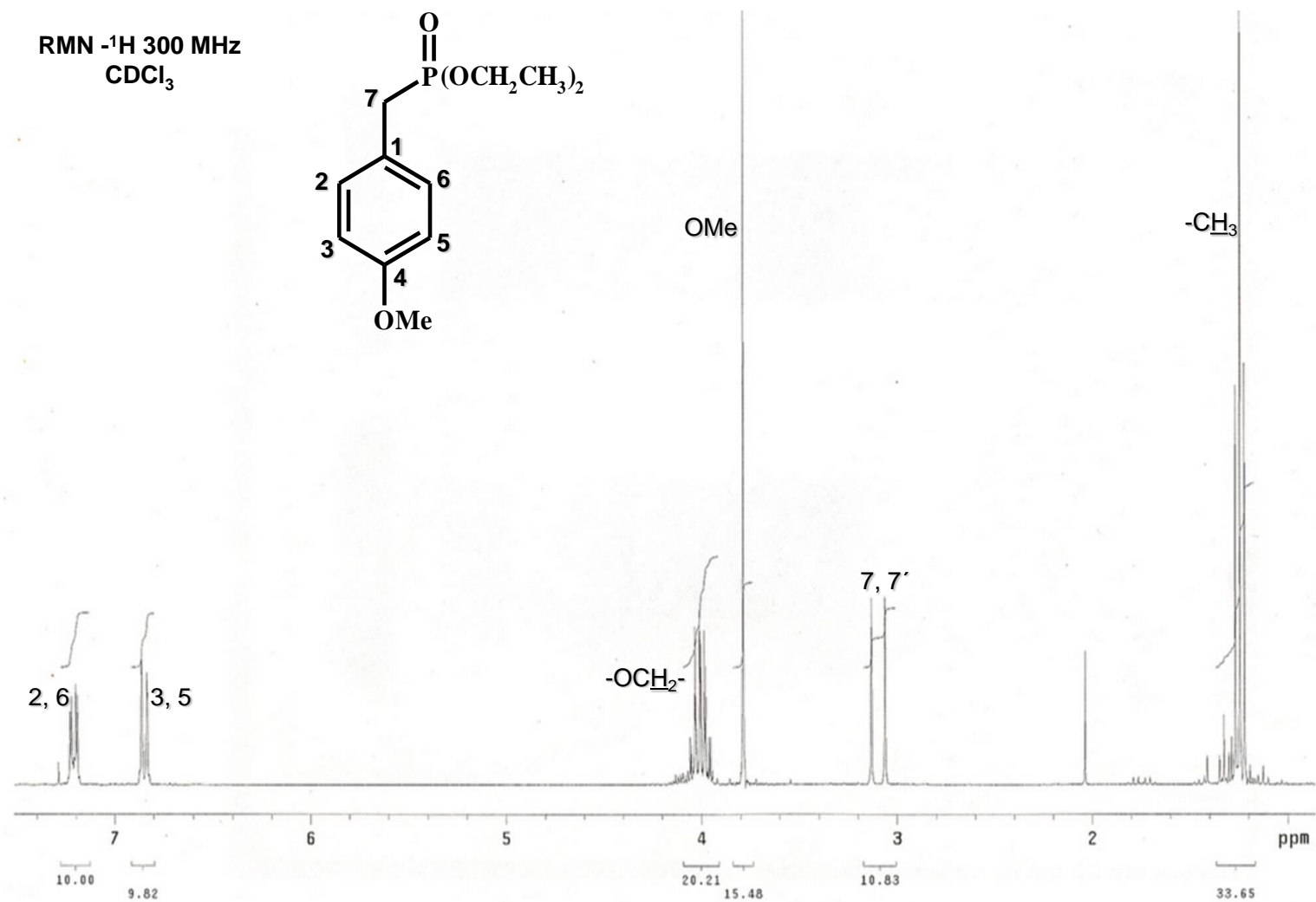
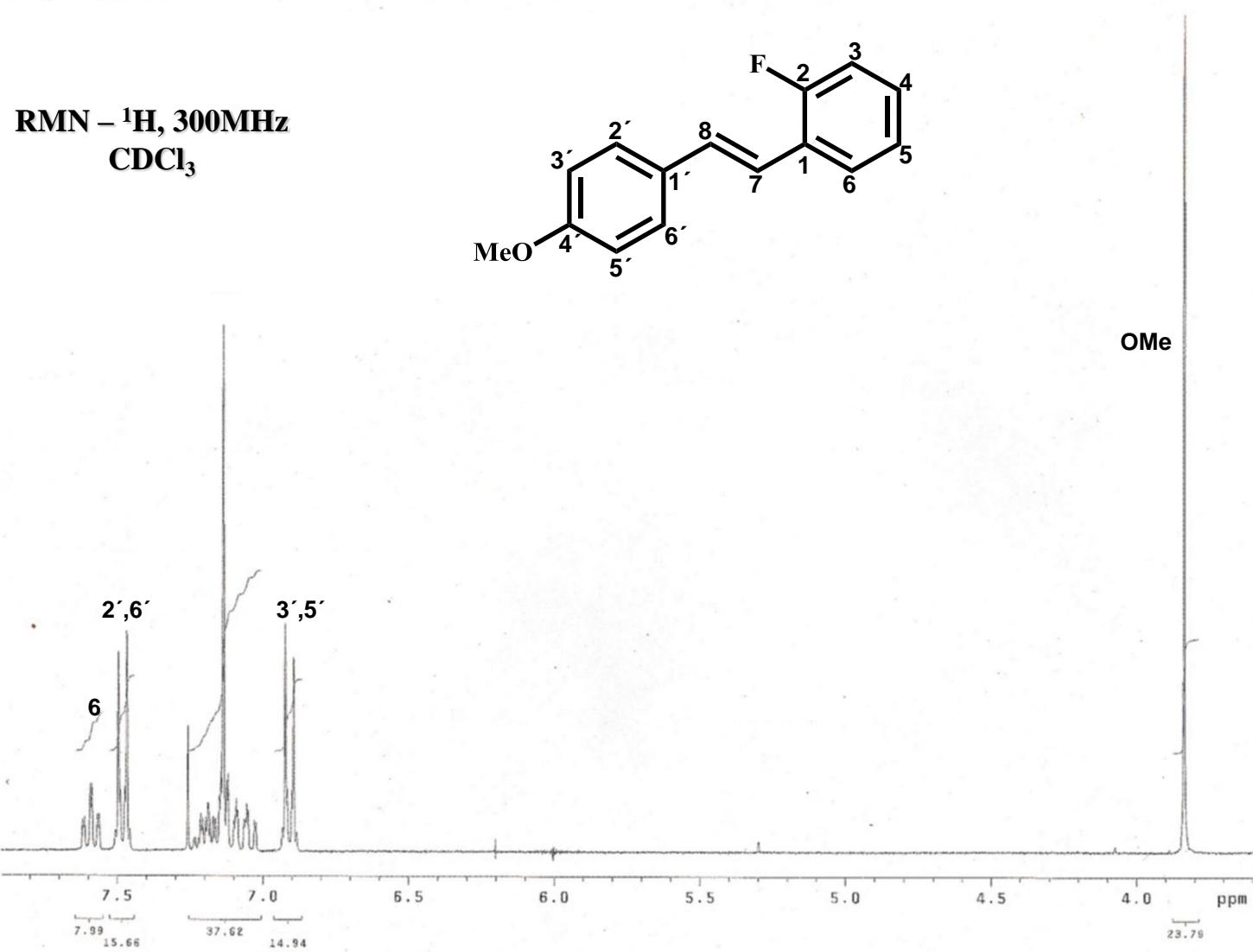
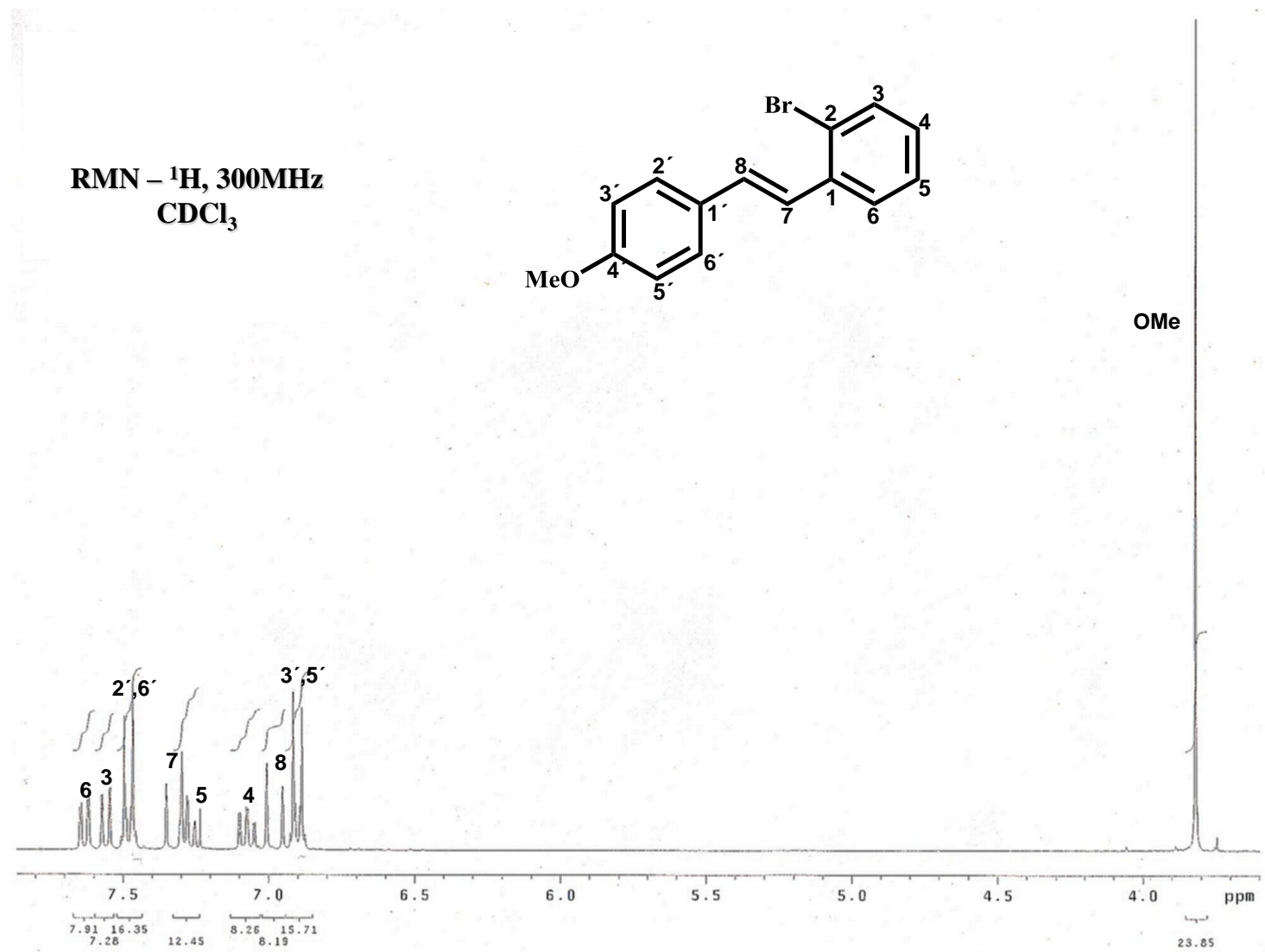


Figura 10. Espectro de RMN- ^1H del Dietil-4-metoxibencilfosfonato.

Figura 11. Espectro de RMN- ^1H del 2-fluoro-4'-metoxiestilbeno.

Figura 12. Espectro de RMN- ^1H del 2-bromo-4'-metoxiestilbeno.

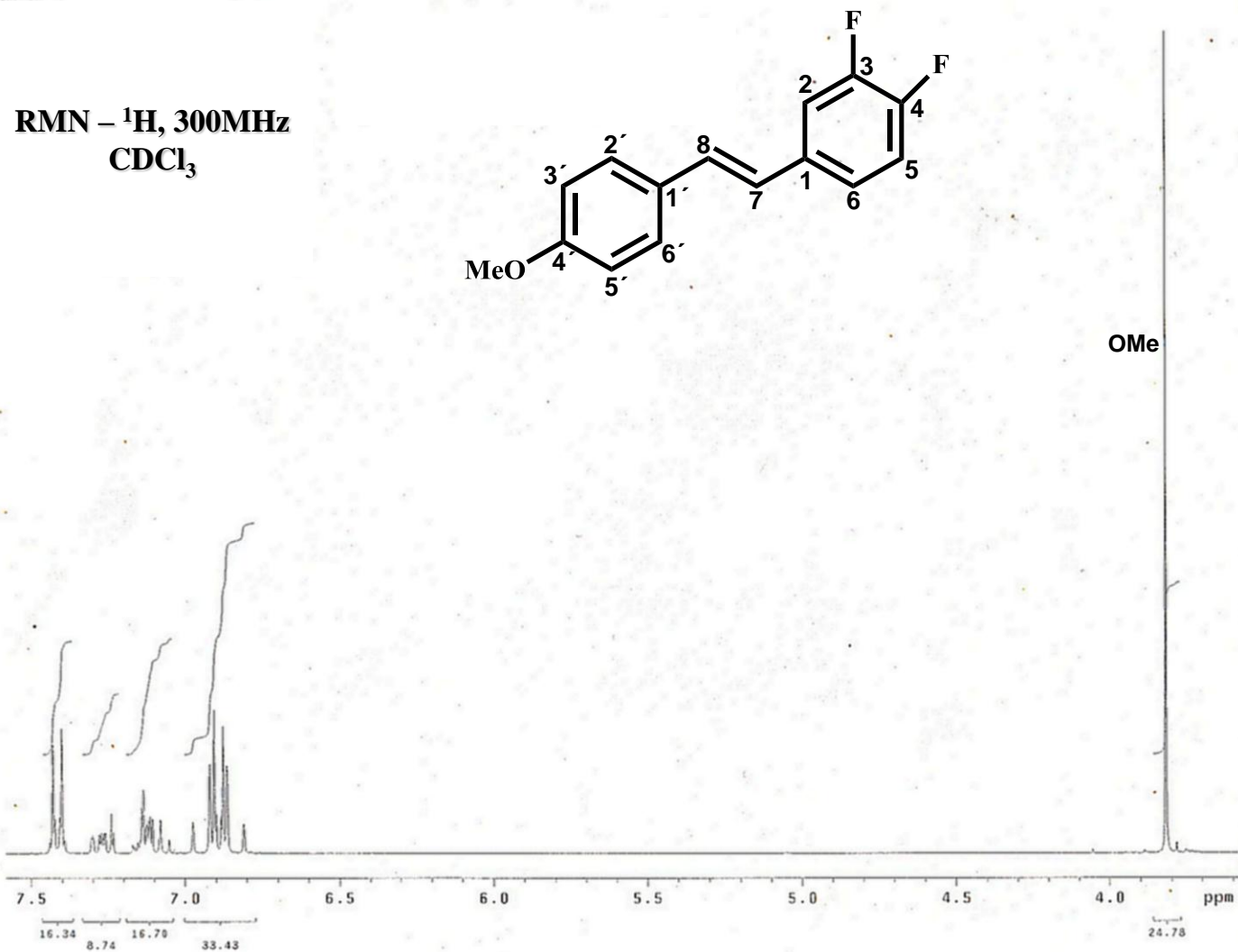


Figura 13. Espectro de RMN- ^1H del 3,4-difluoro-4'-metoxiestilbeno.

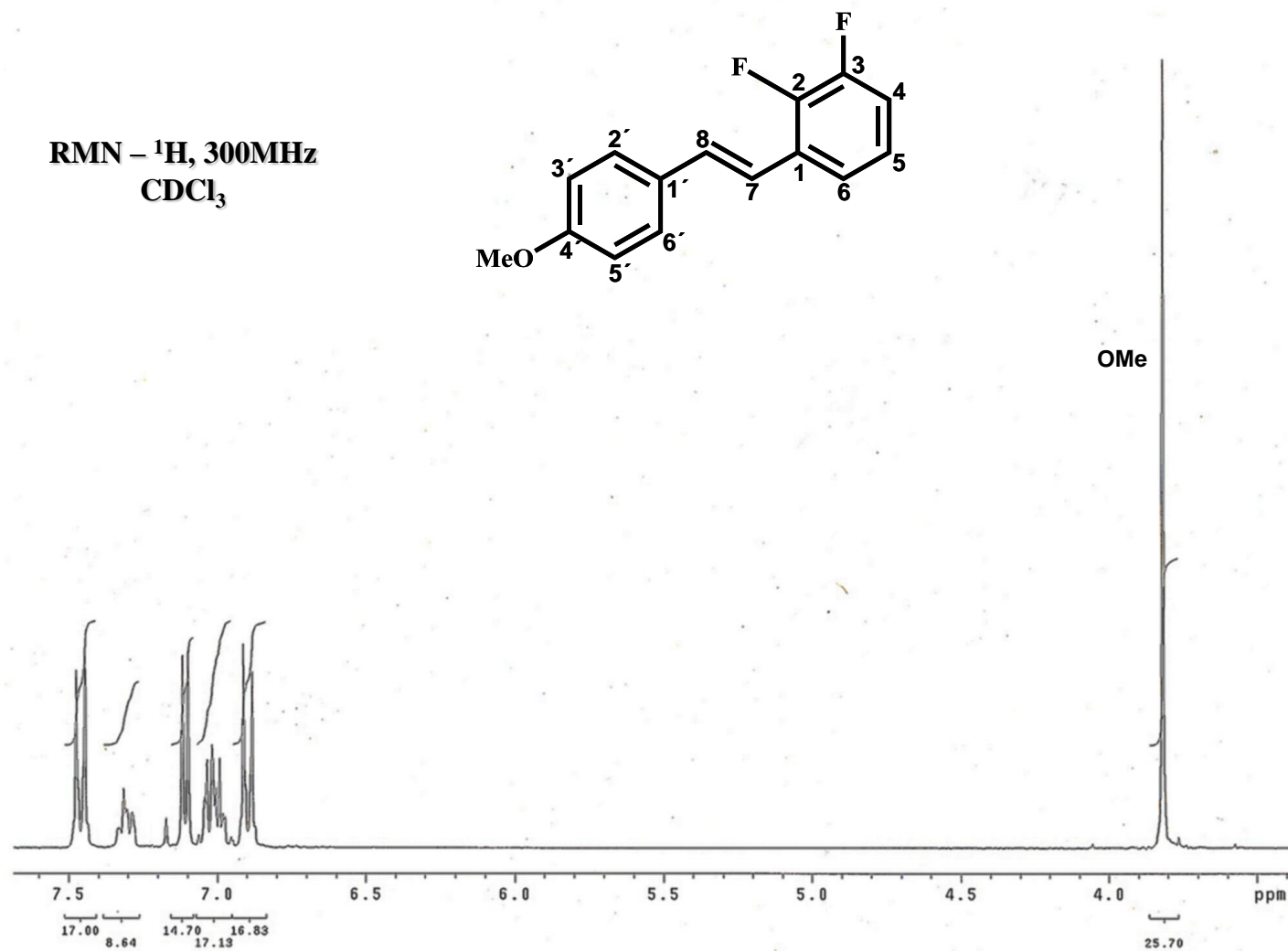
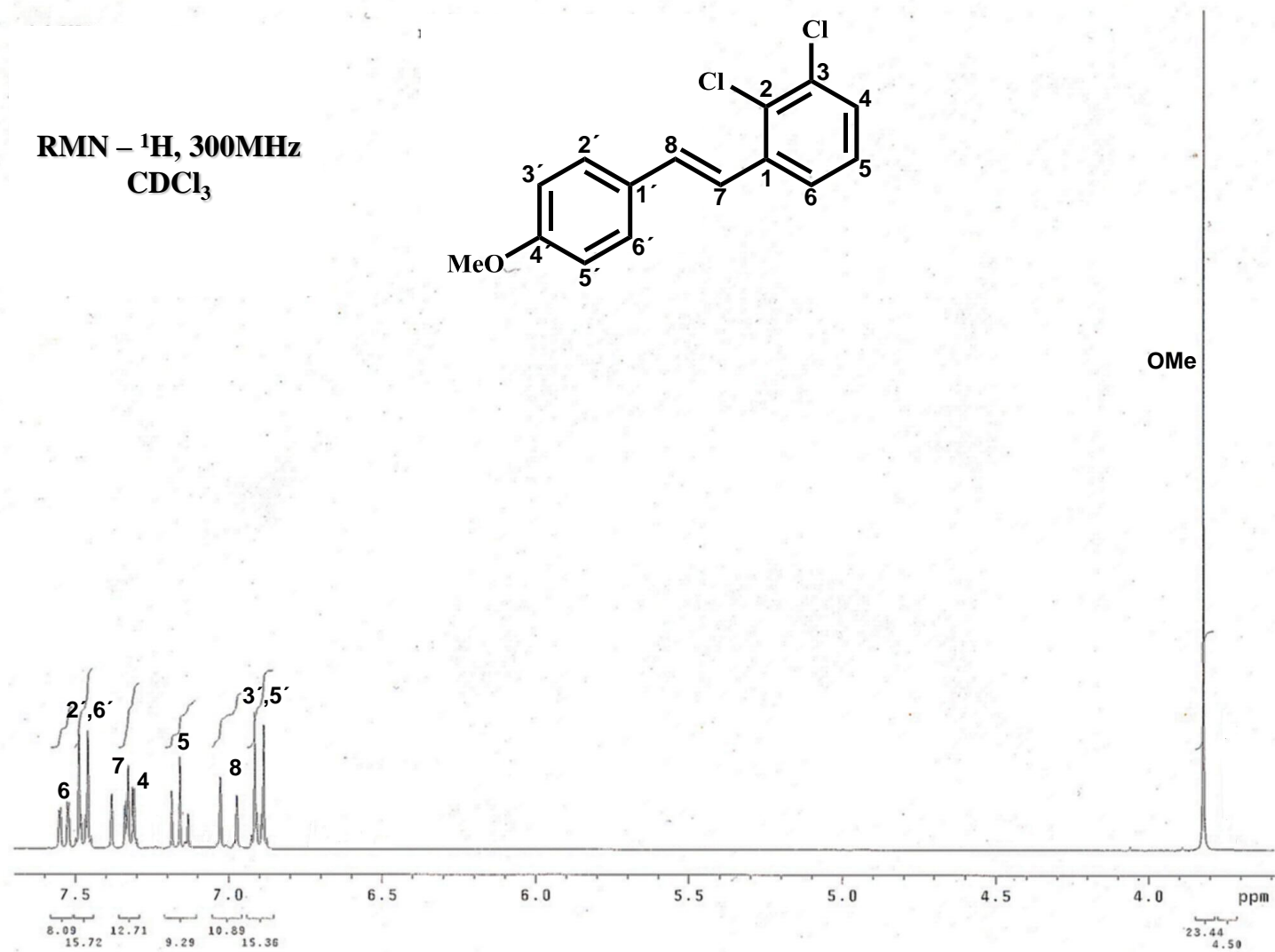


Figura 14. Espectro de RMN- ^1H del 2,3-difluoro-4'-metoxiestilbeno.

Figura 15. Espectro de RMN- ^1H del 2,3-dicloro-4'-metoxiestilbeno.

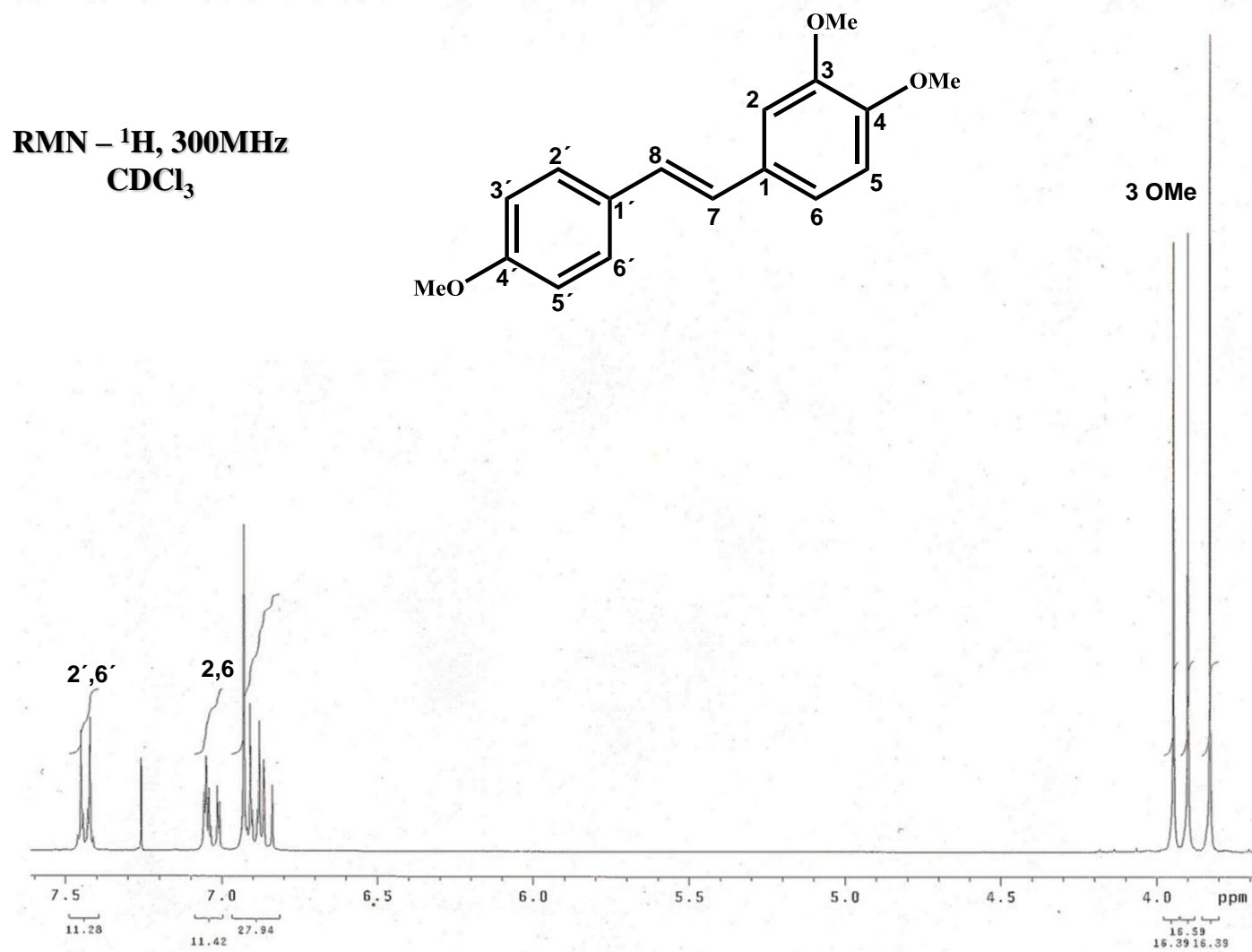
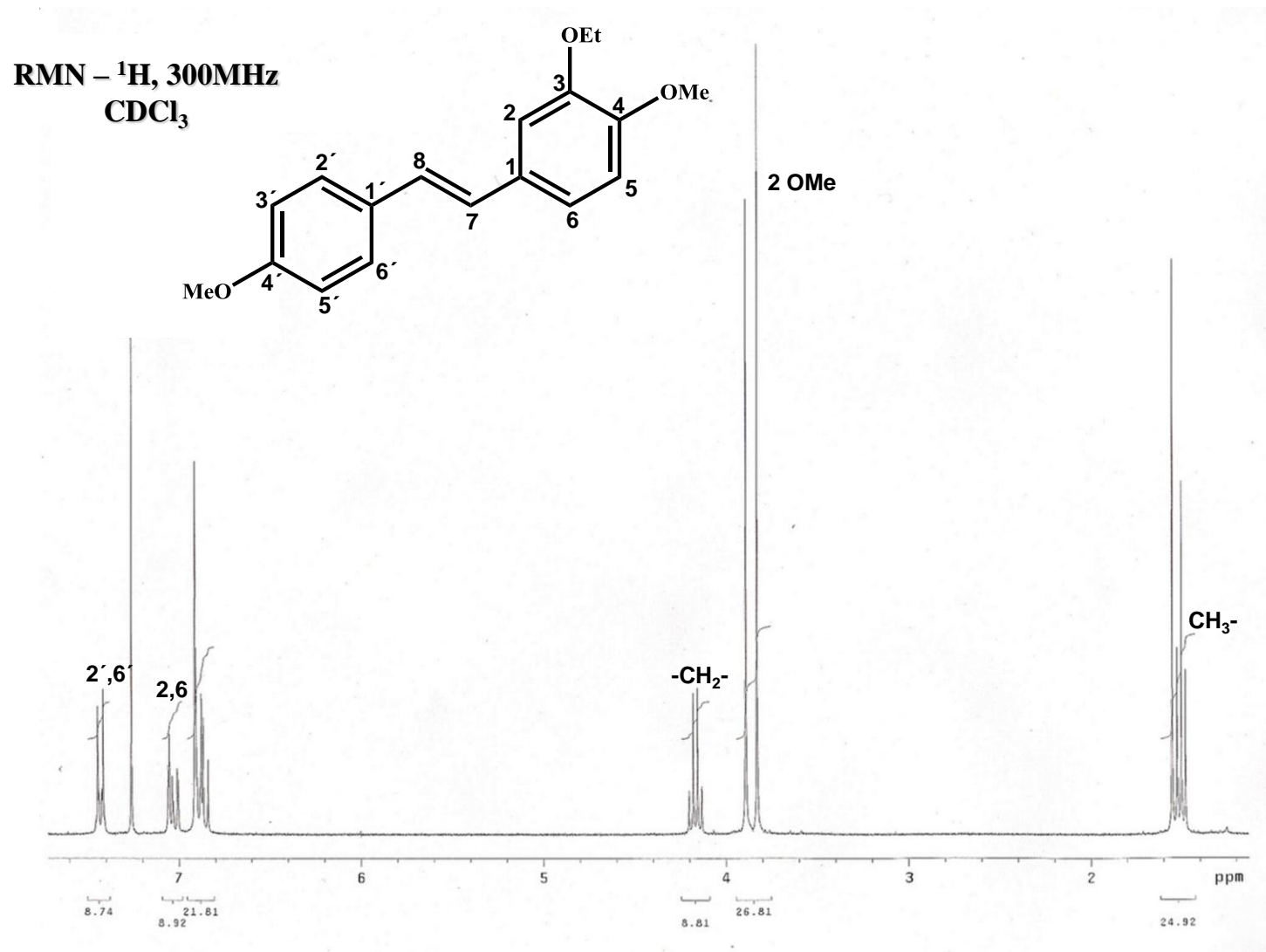


Figura 16. Espectro de RMN- ^1H del 3,4-dimetoxi-4'-metoxiestilbeno.

Figura 17. Espectro de RMN- ^1H del 3-etoxi-4-metoxi-4'-metoxiestilbeno.

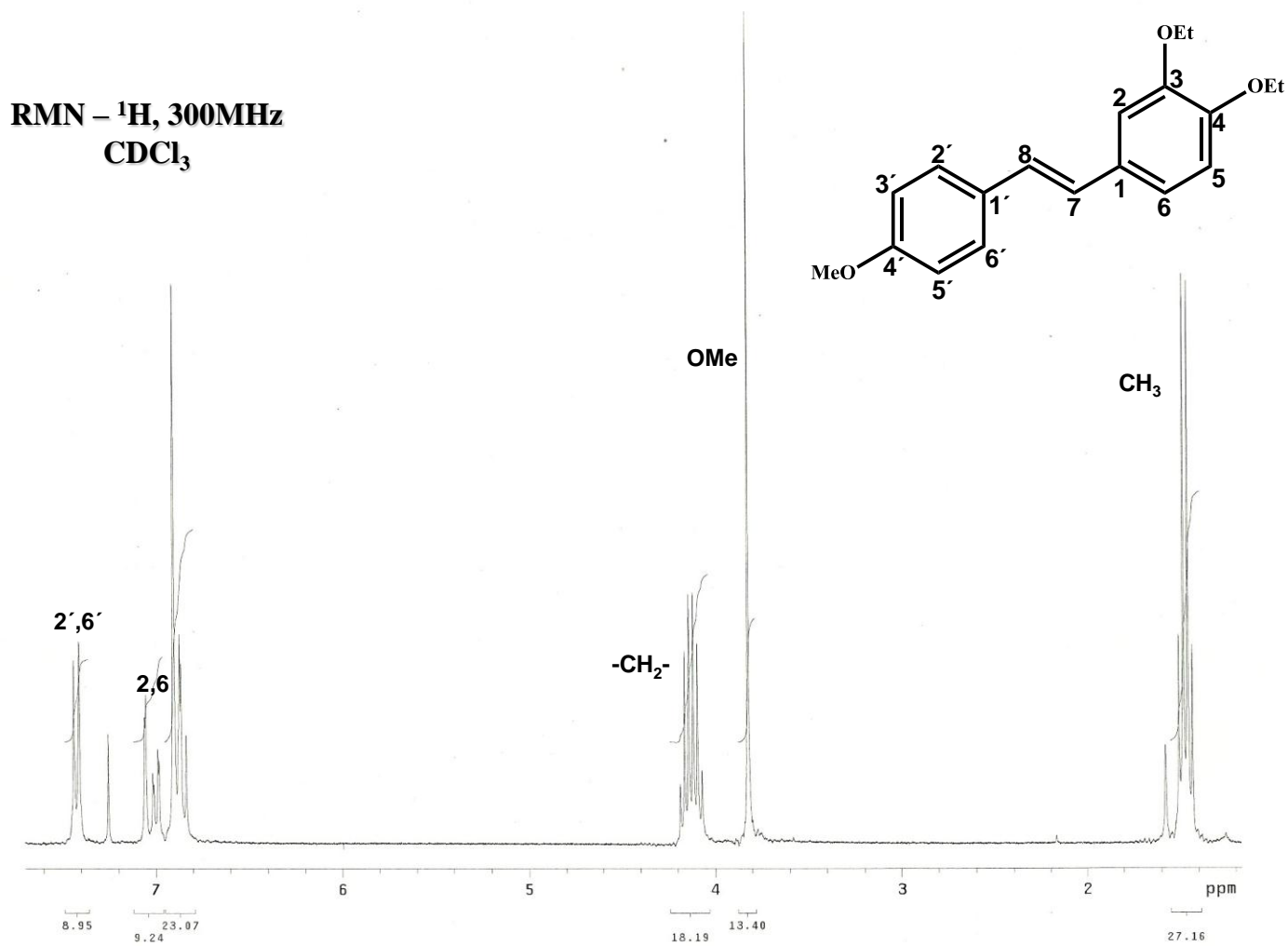


Figura 18. Espectro de RMN- ^1H del 3,4-dietoxi-4'-metoxiestilbeno.

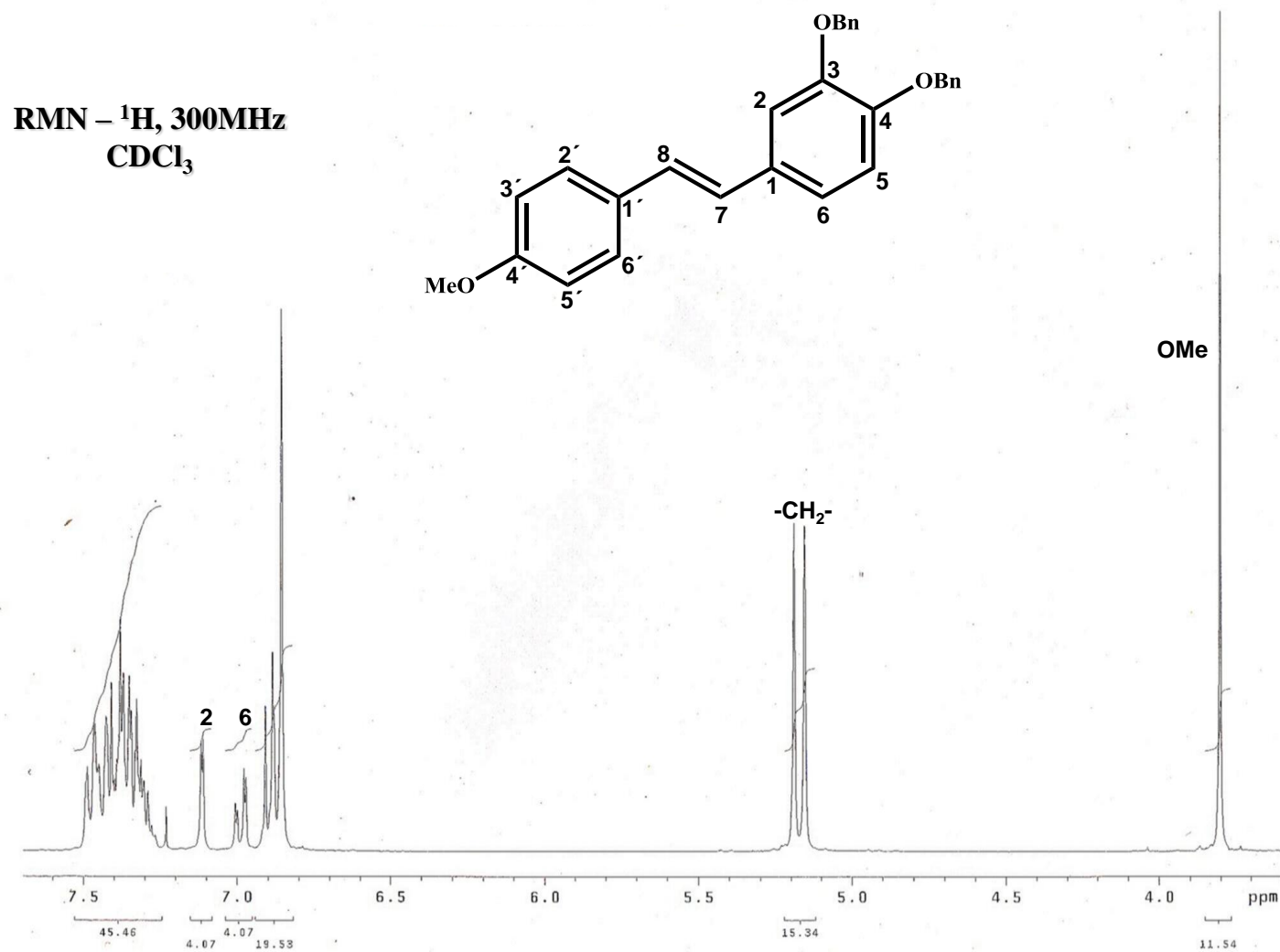
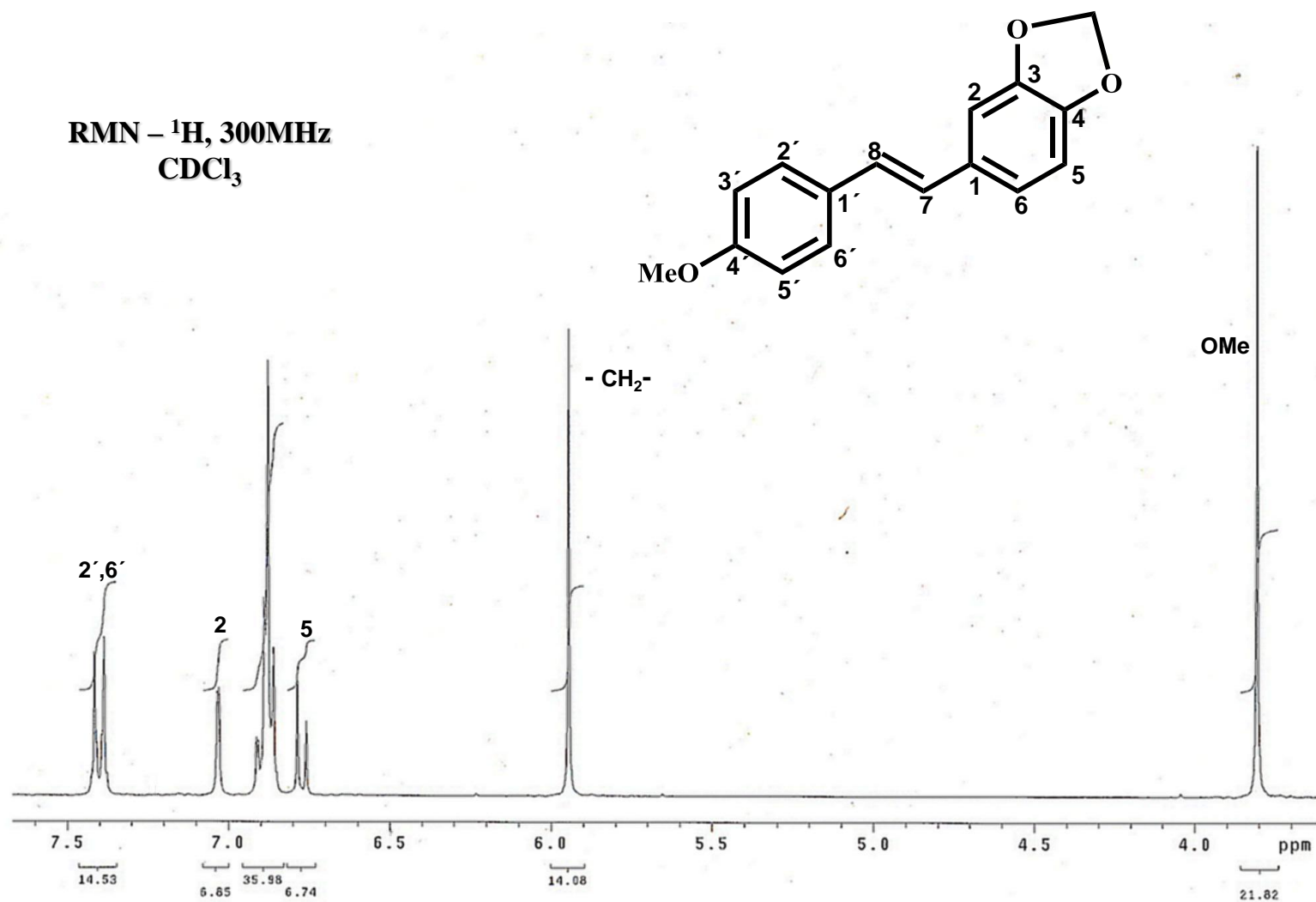


Figura 19. Espectro de RMN- ^1H del 3,4-dibenciloxi-4'-metoxiestilbeno.

Figura 20. Espectro de RMN- ^1H del 3,4-metilendioxi-4'-metoxiestilbeno.

8 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

8.1 Resultados de la determinación de GSH y GSSG en hígado y sangre

La determinación de GSH y GSSG, así como de la relación GSH/GSSG y la cantidad total de glutatión (GSH+GSSG) en hígado nos sirven como parámetros del estado óxido-reducción en el citoplasma de los hepatocitos. Lamentablemente, a pesar de que se observaron diferencias entre el grupo control y el grupo de daño, los compuestos no presentaron efecto alguno sobre estos marcadores (ver tabla 3).

8.3 Resultados de la determinación del grado de peroxidación lipídica

La cuantificación de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico es un indicador del grado de peroxidación lipídica en la membrana de los hepatocitos. Nuevamente, el CCl₄ indujo un incremento en el grado de peroxidación lipídica y la gran mayoría de compuestos no fue capaz de prevenirlo (ver tabla 3), sin embargo, el compuesto FME previno de manera total el incremento en este marcador (figura 10).

8.4 Resultados de los marcadores enzimáticos

La actividad de la enzima γ -GTP es un marcador de daño por colestasis y es considerado como uno de los indicadores de daño hepático más sensibles y específicos. La actividad de la γ -GTP se incrementó considerablemente en el grupo administrado con CCl₄ (ver tabla 4). En este caso, el DCIME previno totalmente este incremento y los compuestos FME, BrME, DMME y MDME lo hicieron de forma total, sugiriendo un efecto anticoléstatco de estos compuestos (figura 11).

La actividad enzimática de la ALT, que es un marcador de necrosis hepática, mostró un incremento de más de 3 veces en el grupo tratado con CCl₄, mientras que la mayoría de los compuestos no mostraron efecto alguno (ver tabla 4), solo el 2DFME previno de

manera parcial pero significativa el incremento de este marcador de daño hepático (figura 12).

Basados en estos resultados, se eligió a los compuestos FME y 2DFME para realizar los análisis subsiguientes.

8.5 Resultados de la evaluación histológica

La tinción de rutina de HE puso de manifiesto la uniformidad del tejido hepático. La figura 13 consta de un panel de seis fotografías. La imagen A es una muestra representativa del grupo control, en donde se encuentra centrada una vena central que se conserva en todas las imágenes mostradas como referencia. En esta imagen se observa la homogeneidad del parénquima hepático, constituido en la gran mayoría por cordones de hepatocitos con los núcleos teñidos en color azul violáceo. La imagen B es una muestra del grupo tratado con CCl_4 en donde se ha perdido la homogeneidad y arquitectura del tejido hepático mostrando zonas necróticas peri-centrolobulillares, edema, infiltración inflamatoria aguda y degeneración de los hepatocitos, caracterizada por vacuolación celular y picnosis nuclear. Las imágenes C y D muestran a los grupos FME+ CCl_4 y 2DFME+ CCl_4 respectivamente, en ellas se observa que solo el 2DFME fue capaz de prevenir parcialmente los cambios morfológicos inducidos por el CCl_4 , lo que concuerda muy bien con los resultados obtenidos con los marcadores bioquímicos de daño hepático. Las fotografías E y F corresponden a una muestra de hígado representativa de los grupos tratados con FME y con 2DFME respectivamente, donde no se observa que la administración de los compuestos haya modificado de forma negativa el tejido normal hepático.

8.5 Resultados del análisis por Western blot

Como ya se mencionó, existe gran evidencia de que el TNF- α es el principal regulador de las respuestas inflamatoria, necrótica y apoptótica en el daño hepático agudo inducido con CCl_4 (Weber, 2003), por ello se examinó la expresión de esta proteína en muestras de hígado de ratas tratadas. La figura 14 muestra el resultado obtenido por Western blot y como se esperaba, La administración de CCl_4 causó una elevación

significativa en la expresión de esta citocina, la cual fue parcialmente prevenida por el DFME en concordancia con los hallazgos bioquímicos e histológicos. El FME no mostró efecto.

La IL-6 es una citocina que antagoniza el daño celular inducido por el TNF- α (Weber, 2003), el análisis por Western blot de la expresión de esta citocina muestra un incremento considerable inducido por el CCl₄, el FME no tuvo efecto en el nivel de expresión de esta proteína. De forma interesante, el DFME evitó completamente el incremento en el grupo con CCl₄ (figura 15).

TRATAMIENTO	LIPOPEROXIDACIÓN nmol MDA/mg prot.	GSH μmol/g de hígado	GSSG μmol/g de hígado	GSH/GSSG	GSH+GSSG μmol/g de hígado
V + V	0.119 ± 0.007	5.04 ± 0.23	0.43 ± 0.01	11.72 ± 0.52	5.47 ± 0.23
V + CCl ₄	0.17 ± 0.011 ^a	5.68 ± 0.54	1.11 ± 0.11 ^a	5.31 ± 0.59 ^a	6.79 ± 0.59 ^a
Compuesto + V					
FME	0.123 ± 0.008 ^b	4.90 ± 0.16 ^b	0.87 ± 0.03 ^{a,b}	5.67 ± 0.30 ^a	5.73 ± 0.16 ^b
BrME	0.136 ± 0.007 ^b	5.53 ± 0.31	0.63 ± 0.02 ^b	7.96 ± 1.03 ^{a,b}	6.42 ± 0.45 ^a
DFME	0.136 ± 0.006 ^b	5.86 ± 0.38	0.83 ± 0.04 ^{a,b}	7.08 ± 0.39 ^{a,b}	6.69 ± 0.41 ^a
2DFME	0.155 ± 0.004 ^{a,b}	5.84 ± 0.32	0.83 ± 0.02 ^{a,b}	7.03 ± 0.35 ^{a,b}	6.67 ± 0.33 ^a
DCME	0.154 ± 0.004 ^b	5.17 ± 0.19 ^b	0.54 ± 0.02 ^b	9.54 ± 0.23 ^{a,b}	5.71 ± 0.21 ^b
DMME	0.148 ± 0.005 ^b	5.39 ± 0.26	0.69 ± 0.02 ^b	9.68 ± 0.77 ^{a,b}	6.12 ± 0.30 ^b
EMME	0.137 ± 0.004 ^b	6.05 ± 0.36	0.60 ± 0.06 ^b	10.55 ± 0.87 ^b	6.64 ± 0.38
DEME	0.187 ± 0.006 ^a	5.16 ± 0.22	0.61 ± 0.05 ^b	8.76 ± 0.66 ^{a,b}	5.77 ± 0.25 ^b
DBME	0.114 ± 0.004 ^b	4.87 ± 0.19 ^b	0.94 ± 0.04 ^{a,b}	5.02 ± 0.32 ^a	5.85 ± 0.18 ^b
MDME	0.165 ± 0.007 ^a	5.45 ± 0.28	0.58 ± 0.02 ^b	9.42 ± 0.54 ^{a,b}	6.03 ± 0.28 ^b
Compuesto + CCl ₄					
FME	0.132 ± 0.008 ^b	6.18 ± 0.52 ^a	1.24 ± 0.10 ^a	5.31 ± 0.15 ^a	7.43 ± 0.61 ^a
BrME	0.175 ± 0.008 ^a	6.24 ± 0.64 ^a	1.64 ± 0.19 ^a	4.96 ± 0.29 ^a	8.16 ± 0.82 ^a
DFME	0.200 ± 0.006 ^a	7.85 ± 0.60 ^a	1.40 ± 0.13 ^a	3.40 ± 0.51 ^a	9.13 ± 0.96 ^a
2DFME	0.198 ± 0.010 ^a	5.96 ± 0.65	1.46 ± 0.18 ^a	4.35 ± 0.48 ^a	7.42 ± 0.79 ^a
DCME	0.216 ± 0.005 ^a	6.79 ± 0.47 ^a	1.69 ± 0.21 ^a	4.24 ± 0.39 ^a	8.48 ± 0.62 ^a
DMME	0.227 ± 0.014 ^a	6.50 ± 0.65 ^a	1.69 ± 0.19 ^a	4.29 ± 0.20 ^a	8.20 ± 0.82 ^a
EMME	0.171 ± 0.013 ^a	6.02 ± 0.62 ^a	1.75 ± 0.17 ^a	3.88 ± 0.30 ^a	7.76 ± 0.76 ^a
DEME	0.305 ± 0.022 ^{a,b}	7.63 ± 0.75 ^a	1.77 ± 0.15 ^a	3.50 ± 0.47 ^a	9.40 ± 0.81 ^a
DBME	0.165 ± 0.006 ^a	5.58 ± 0.63 ^a	1.52 ± 0.16 ^a	4.44 ± 0.32 ^a	7.09 ± 0.75 ^a
MDME	0.181 ± 0.009 ^a	6.63 ± 0.55 ^a	1.68 ± 0.14 ^a	3.74 ± 0.30 ^a	8.63 ± 0.73 ^a

Tabla 3. Resultados obtenidos para los marcadores de estrés oxidativo a nivel citoplasmático GSH (μmol/g de hígado), GSSG (μmol/g de hígado), GSH/GSSG y GSH+GSSG (μmol/g de hígado); y a nivel membranar Peroxidación lipídica (nmolMDA/mg prot.) determinados en muestras de hígado de los diferentes grupos experimentales. Cada valor representa el valor promedio de los experimentos realizados por duplicado, con muestras de 6 animales ± error estándar. **a**: diferente vs. grupo control. **b**: diferente vs. grupo CCl₄. p < 0.05, ANOVA, prueba de Tukey.

PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

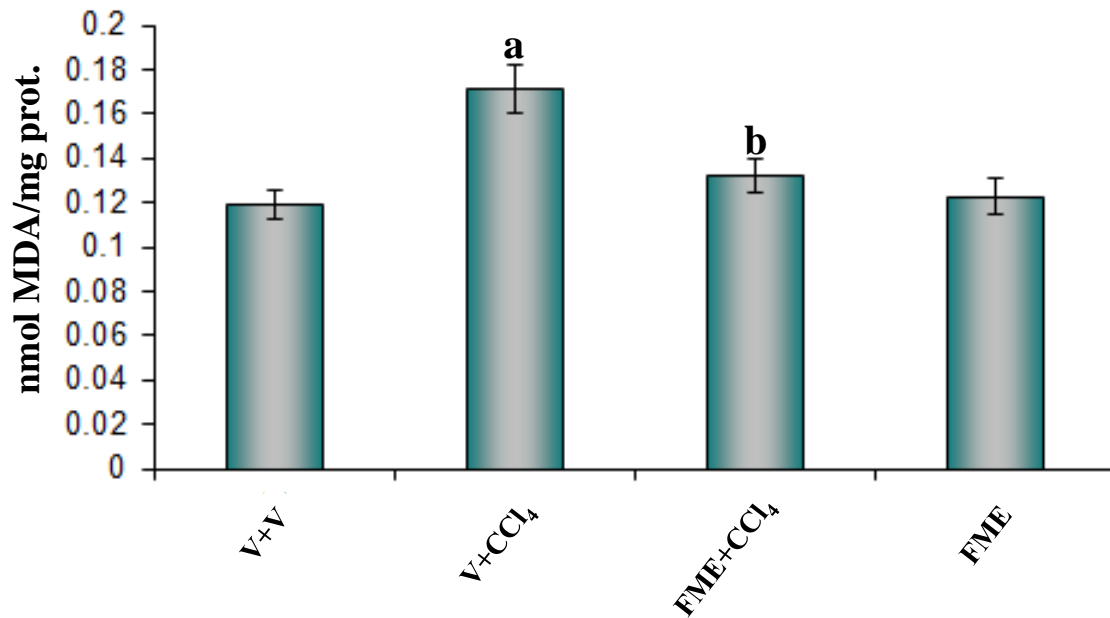


Figura 10. Grado de peroxidación lipídica determinada en muestras de hígado de los diferentes grupos experimentales. Cada barra representa el valor promedio de los experimentos realizados por duplicado, con muestras de 8 animales \pm error estándar. **a**: diferente vs. grupo V. **b**: diferente vs. grupo V+CCl₄. $p < 0.05$, ANOVA, prueba de Tukey.

TRATAMIENTO	γ -GTP $\mu\text{mol/l min}$	ALT $\mu\text{mol/l min}$
V + V	9.95 \pm 1.51	19.10 \pm 0.59
V + CCl ₄	19.51 \pm 1.88 ^a	70.05 \pm 0.85 ^a
Compuesto + V		
FME	11.01 \pm 1.61 ^b	21.33 \pm 1.19 ^b
BrME	10.43 \pm 1.55 ^b	17.41 \pm 1.00 ^b
DFME	9.85 \pm 1.16 ^b	19.46 \pm 0.64 ^b
2DFME	8.22 \pm 1.16 ^b	19.83 \pm 1.10 ^b
DCME	12.49 \pm 1.76 ^b	19.53 \pm 1.26 ^b
DMME	7.19 \pm 0.97 ^b	21.19 \pm 2.18 ^b
EMME	11.33 \pm 1.79 ^b	20.73 \pm 2.01 ^b
DEME	7.36 \pm 1.15 ^b	24.27 \pm 1.22 ^b
DBME	13.62 \pm 0.90 ^b	21.16 \pm 0.89 ^b
MDME	10.07 \pm 1.07 ^b	22.18 \pm 0.95 ^b
Compuesto + CCl₄		
FME	12.18 \pm 1.67 ^b	68.16 \pm 0.60 ^a
BrME	12.54 \pm 1.59 ^b	65.51 \pm 0.66 ^a
DFME	20.46 \pm 1.88 ^a	70.79 \pm 0.75 ^a
2DFME	19.58 \pm 3.13 ^a	53.37 \pm 0.70 ^{a,b}
DCME	14.91 \pm 1.47 ^{a,b}	65.10 \pm 1.08 ^a
DMME	11.99 \pm 1.28 ^b	68.12 \pm 1.01 ^a
EMME	21.46 \pm 2.68 ^a	68.58 \pm 0.49 ^a
DEME	20.68 \pm 2.05 ^a	67.19 \pm 0.73 ^a
DBME	20.28 \pm 2.03 ^a	67.79 \pm 0.46 ^a
MDME	11.03 \pm 1.31 ^b	69.33 \pm .071 ^a

Tabla 4. Resultados obtenidos para los marcadores enzimáticos: γ -GTP ($\mu\text{mol/lmin}$) y ALT ($\mu\text{mol/lmin}$) determinados en muestras de hígado de los diferentes grupos experimentales. **a**: diferente vs. grupo control. **b**: diferente vs. grupo CCl₄. $p < 0.05$, ANOVA, prueba de Tukey.

γ -GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA

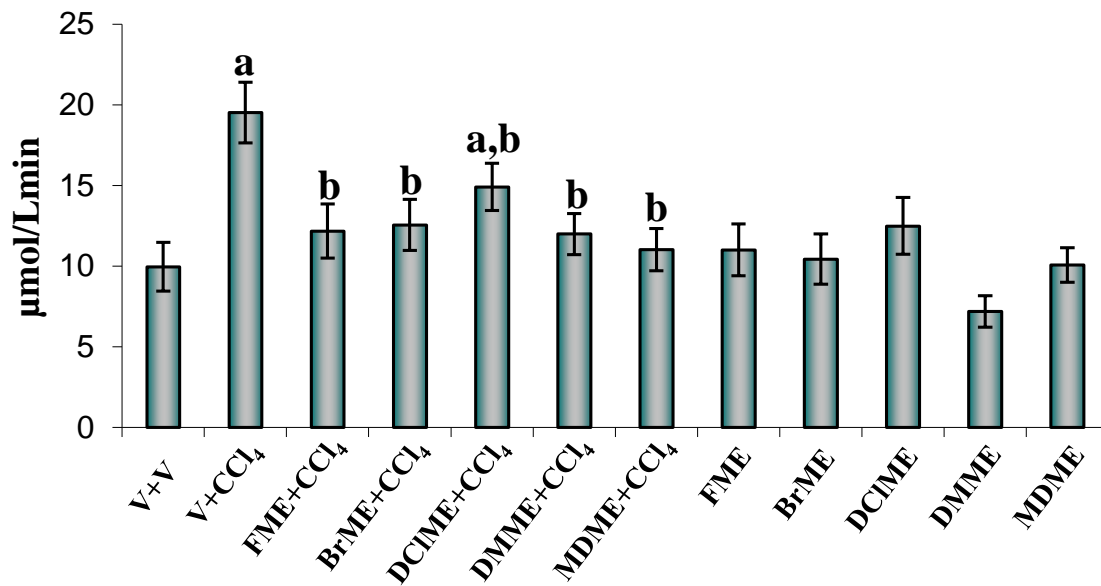


Figura 11. Actividad de la enzima γ -glutamil transpeptidasa determinada en muestras de plasma de los diferentes grupos experimentales. Cada barra representa el valor promedio de los experimentos realizados por duplicado, con muestras de 8 animales \pm error estándar. **a**: diferente vs. grupo V. **b**: diferente vs. grupo V+CCl₄. $p < 0.05$, ANOVA, prueba de Tukey.

ALANINA AMINOTRANSFERASA

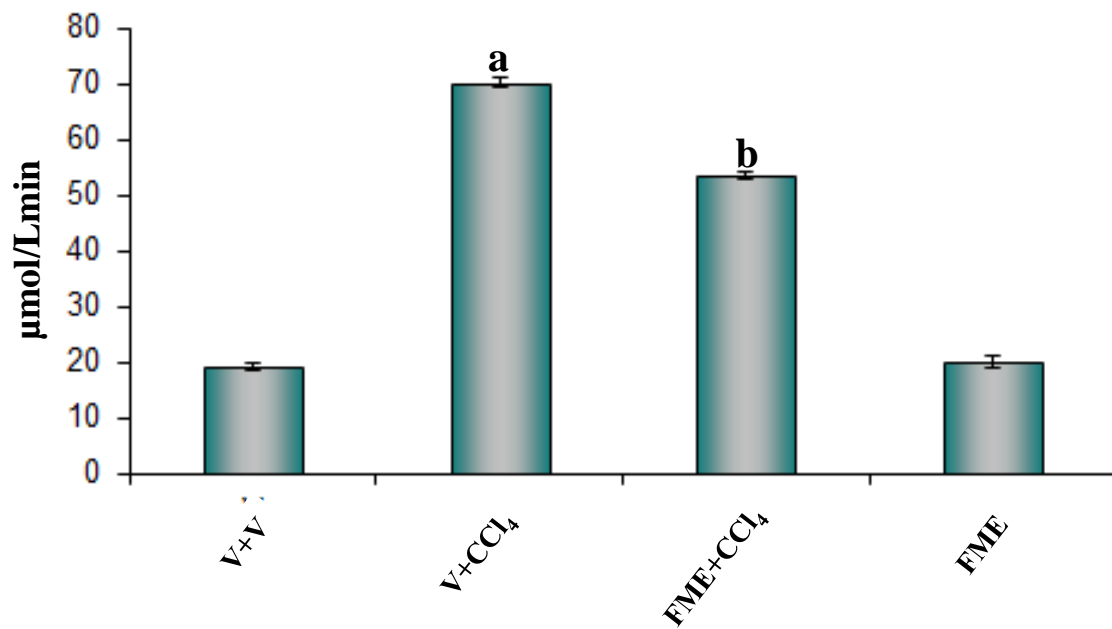


Figura 12. Actividad de la enzima alanina aminotransferasa determinada en muestras de plasma de los diferentes grupos experimentales. Cada barra representa el valor promedio de los experimentos realizados por duplicado, con muestras de 8 animales \pm error estándar. **a**: diferente vs. grupo V. **b**: diferente vs. grupo V+CCl₄. $p < 0.05$, ANOVA, prueba de Tukey.

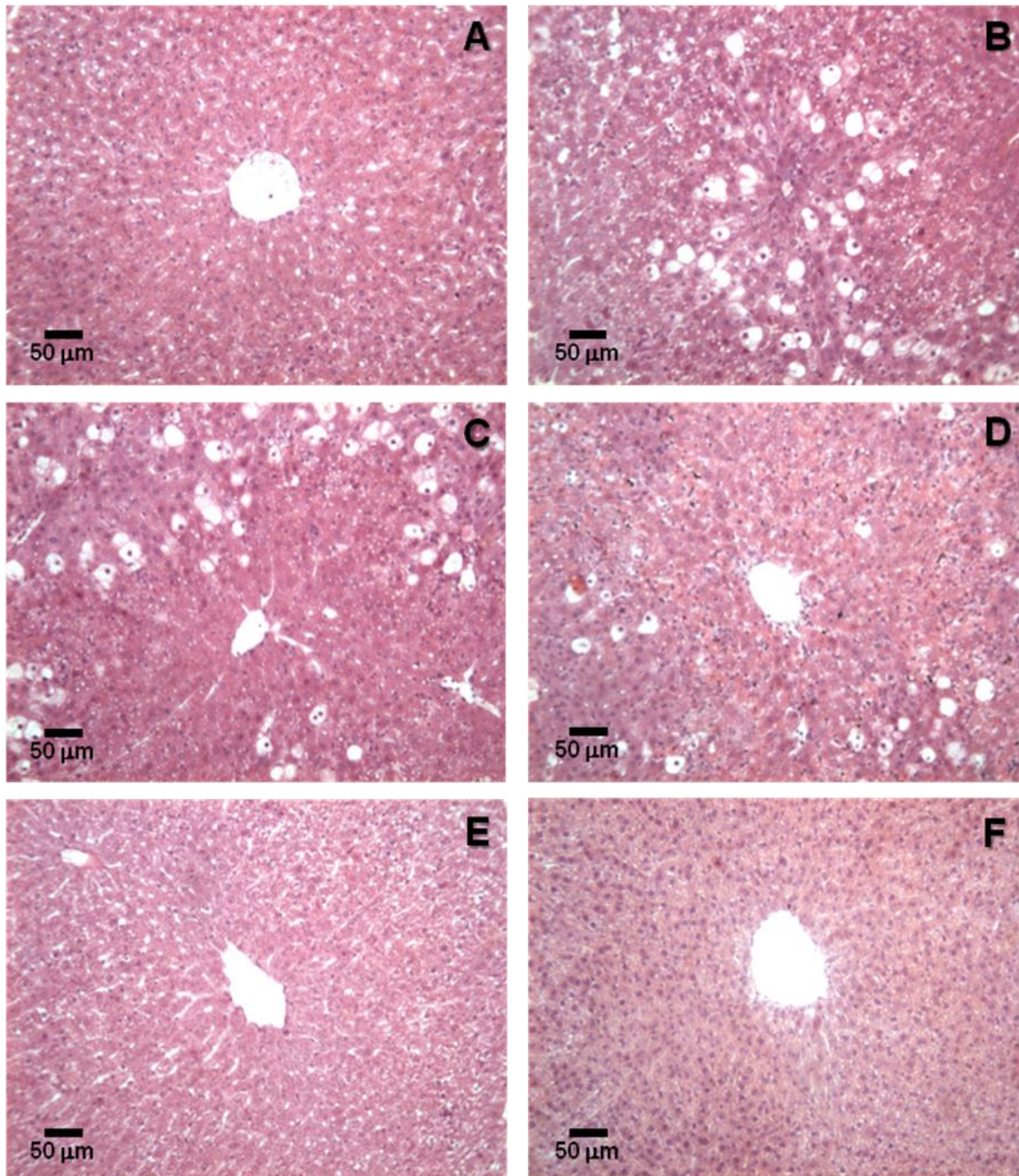


Figura 13. Tinción histológica de hematoxilina/eosina en muestras de hígados de los diferentes grupos experimentales:

A: Fotografía representativa de un corte de hígado del grupo CONTROL

B: Fotografía representativa de un corte de hígado del grupo CCl₄

C: Fotografía representativa de un corte de hígado del grupo FME+CCl₄

D: Fotografía representativa de un corte de hígado del grupo 2DFME+CCl₄

E: Fotografía representativa de un corte de hígado del grupo FME

F: Fotografía representativa de un corte de hígado del grupo 2DFME

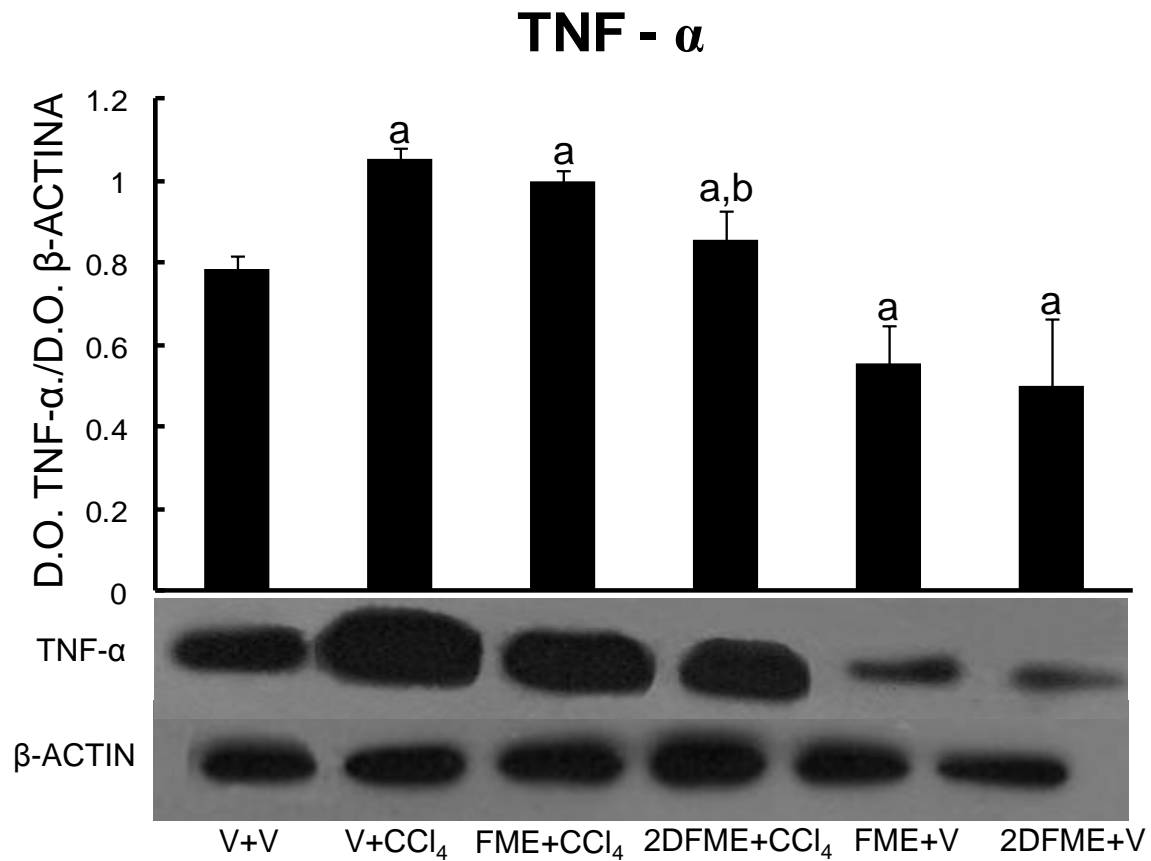


Figura 14. Efecto de los compuestos en la expresión de TNF- α analizado por Western blot en muestras de hígado de ratas del grupo control (V+V), grupo de daño (V+CCl₄), grupo tratado con FME más CCl₄ (FME+CCl₄), grupo tratado con 2DFME y CCl₄ (2DFME+CCl₄) y animales tratados solo con FME (FME+V) o 2DFME (2DFME+V). Se usó a la β -actina como control de carga. La intensidad de las señales fue determinada por análisis densitométrico de las membranas tratadas y los valores se calcularon como el cociente de TNF- α / β -actina. Cada barra representa el valor promedio de los experimentos realizados por duplicado, con muestras de 8 animales \pm error estándar. **a**: diferente vs. grupo V+V. **b**: diferente vs. grupo V+CCl₄. $p < 0.05$, ANOVA, prueba de Tukey.

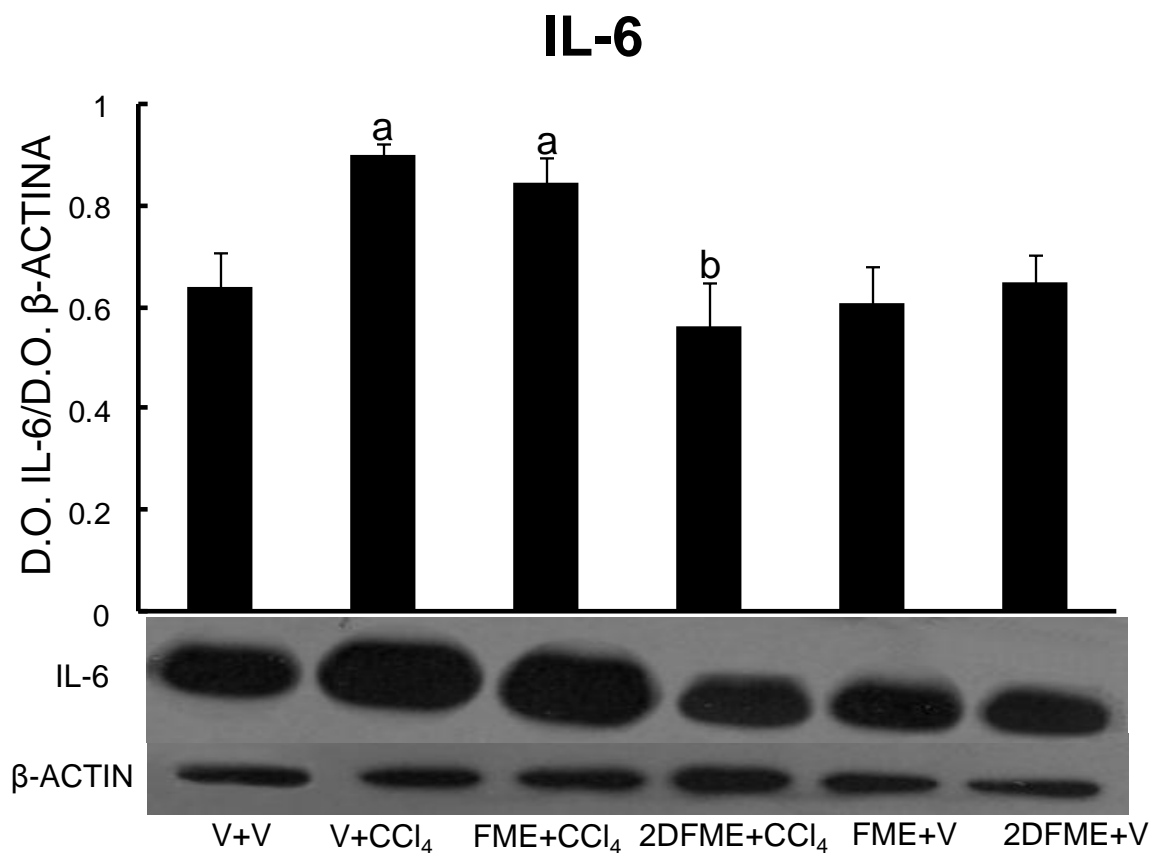


Figura 15. Efecto de los compuestos en la expresión de la IL-6 analizado por Western blot en muestras de hígado de ratas del grupo control (V+V), grupo de daño (V+CCl₄), grupo tratado con FME más CCl₄ (FME+CCl₄), grupo tratado con 2DFME y CCl₄ (2DFME+CCl₄) y animales tratados solo con FME (FME+V) o 2DFME (2DFME+V). Se usó a la β -actina como control de carga. La intensidad de las señales fue determinada por análisis densitométrico de las membranas tratadas y los valores se calcularon como el cociente de IL-6/ β -actina. Cada barra representa el valor promedio de los experimentos realizados por duplicado, con muestras de 8 animales \pm error estándar. **a**: diferente vs. grupo V+V. **b**: diferente vs. grupo V+CCl₄. $p < 0.05$, ANOVA, prueba de Tukey.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó una serie de 10 estilbenos sustituidos y se encontró que a pesar de que el FME muestra resultados discretos en los marcadores bioquímicos, el 2DFME es capaz de prevenir parcialmente el desarrollo del daño hepático agudo a nivel bioquímico y a nivel molecular

Las enfermedades hepáticas constituyen un problema de salud de proporciones mundiales, en nuestro país ocupan del cuarto al sexto lugar como causa de muerte y se desencadenan por diversos factores como: infecciones bacterianas y virales, consumo desmesurado de alcohol, esteatosis (hígado graso), estenosis que conduce a colestasis crónica y contacto con varios agentes tóxicos incluidos algunos fármacos ingeridos en exceso, entre otras (INEGI, 2006).

El CCl_4 es una hepatotoxina muy bien conocida que ha sido ampliamente usada para estudiar el daño hepático experimental. El daño causado por el CCl_4 es visto como el análogo del daño hepático causado por una gran variedad de hepatotoxinas en humanos. Las lesiones en animales y en humanos son similares y su mecanismo involucra la ruptura del enlace carbono-cloro y la descomposición peroxidativa de los lípidos de membrana y daño al DNA (Muriel, 1997). A pesar de que la intoxicación por CCl_4 no es relevante a nivel clínico, el hecho de que las lesiones provocadas por este compuesto compartan muchas características con aquellas que se observan en humanos por diversas patologías, hacen que el uso de esta sustancia para inducir daño hepático sea un modelo adecuado para el estudio de estas enfermedades (Pérez-Tamayo, 1983).

A nivel molecular, el CCl_4 activa la secreción del $\text{TNF-}\alpha$ en las células de Kupffer, proceso que parece conducir a la muerte celular por necrosis y apoptosis. A su vez esta citocina promueve la expresión de la IL-6 que muestra un claro efecto antiapoptótico y por lo tanto tiene el potencial de iniciar la recuperación del órgano después del daño (Weber et al., 2003).

Un compuesto de especial interés es el RSV, debido a que además de tener una potente actividad antioxidante, es capaz de inhibir la respuesta inflamatoria a varios niveles (Pervaiz, 2003). Esta molécula es capaz de regular la actividad de la enzima ciclooxigenasa y de algunos factores de transcripción claves en la regulación de respuestas inflamatorias como el NF- κ B, aunque la diana biológica precisa de este compuesto no ha sido identificada. (Rotondo et al., 1998; Macarrone et al., 1999; Tsai et al., 1999) Varios estudios sobre la relación estructura-actividad se han llevado a cabo tomando como base el esqueleto estilbénico, dando como resultado moléculas que de las cuales, el FME mostró ser cerca de 100 veces más potente que el resveratrol para inhibir al NF- κ B. De hecho, se ha probado que en general, los estilbenos metoxi-sustituídos en la posición 4' son más activos que el RSV como inhibidores de la activación inducida por el TNF- α del NF- κ B (Heynekamp et al., 2006). A pesar de que estos estudios se han realizado *in vitro*, en nuestro laboratorio hemos probado previamente uno de tales compuestos en nuestro modelo *in vivo* con buenos resultados (Rivera et al., 2008).

La presente investigación se encausó en evaluar las propiedades hepatoprotectoras de una serie de estilbenos sustituidos, en el daño hepático agudo inducido por CCl₄. Los cuales se dividieron en dos series, una con análogos con grupos éteres y la otra con análogos halogenados. Estos compuestos no presentan, virtualmente actividad antioxidante, por lo que sus efectos se deberán única y exclusivamente a su capacidad de inhibir la expresión de citocinas inflamatorias (Heynekamp, 2006).

Los compuestos fueron sintetizados satisfactoriamente, en base al método propuesto y se corroboró la identidad de los productos finales mediante las técnicas de RMN-¹H y RMN-¹³C. Cabe señalar que el método de síntesis con irradiación con microondas fue desarrollado en nuestro laboratorio y esta herramienta redujo el tiempo de reacción de 5 horas a 2 minutos, además de que en general, las mezclas de reacción resultantes contenían menos productos secundarios. A pesar de que el rendimiento no se mejoró comparado con el calentamiento convencional, el método por microondas provee una herramienta más eficiente para obtener estos compuestos.

El GSH es uno de los componentes más importantes de las defensas antioxidantes del organismo (Kidd, 1997). Como se observó anteriormente, los compuestos no modificaron las alteraciones provocadas por el CCl₄, esto concuerda con el hecho de que no se espera que presenten efectos antioxidantes debido a que no contienen grupos hidroxilo en su estructura, dichos grupos son propuestos como los responsables de la actividad antioxidante en el RSV (Stivala, 2001).

Los resultados de la peroxidación lipídica muestran que la administración de FME previene el incremento de este parámetro de estrés oxidativo, lo que contrasta con lo observado en la determinación de GSH. Este hallazgo se contrapone con la observación de que el compuesto no presenta actividad antioxidante (Heynekamp, 2006). Cabe señalar que este estudio fue realizado *in vitro*, por lo que la acción de un metabolito no debe descartarse.

La actividad de la enzima γ -GTP, marcador de daño por colestasis, mostró que el DCIME previno parcialmente el incremento en la actividad de esta enzima y los compuestos FME, BrME, DMME y MDME lo hicieron de forma total, sugiriendo un efecto anticoléstatco de estos compuestos. Lo anterior concuerda únicamente con lo observado en los resultados para la peroxidación lipídica para el FME, ya que la γ -GTP es una enzima que se encuentra anclada a la membrana de los hepatocitos, entonces, entre menor sea el daño oxidativo a la membrana, menor será la cantidad de enzima liberada (Bulle et al., 1990).

La ALT es una enzima que se encuentra en el citoplasma del hepatocito, el aumento en su actividad es un buen indicador de cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática, lo que se puede asociar a la muerte celular o necrosis (Plaa et al., 1982), se observa que el único compuesto capaz de disminuir parcialmente la necrosis fue el 2DFME. Este resultado bioquímico concuerda con lo observado en el análisis histológico, donde se puede apreciar una disminución en el número de zonas necróticas en el hígado.

Como se puede notar, los resultados sugieren que el FME y el 2DFME presentan el mejor perfil hepatoprotector, ya que el primero previno los incrementos en la peroxidación lipídica y la enzima γ -GTP, mientras que el segundo previno el incremento de la actividad de la enzima ALT. Por ello, se decidió estudiar el efecto de ambos compuestos en la expresión de TNF- α e IL-6.

Los resultados de la expresión tanto de TNF- α como de IL-6 mostraron el mismo patrón, ya que en ambos casos, solo el 2DFME fue capaz de prevenir el aumento en la expresión de ambas citocinas, lo que concuerda con nuestros hallazgos bioquímicos e histológicos.

Como ya se mencionó anteriormente, mientras que ambos compuestos prevenieron el daño colestático, sólo el 2DFME tuvo en efecto hepatoprotector consistente, ya que además redujo la necrosis y el aumento en la expresión del TNF- α . Varias hipótesis pueden explicar los resultados observados. La más probable es que la adición del átomo del flúor a la molécula puede mejorar un número de características farmacocinéticas y fisicoquímicas tales como la estabilidad metabólica o una permeabilidad de membranas mejorada. Incrementos en la afinidad de moléculas fluoradas por algún blanco terapéutico, también se ha documentado en varios casos (Shah y Westwell, 2007). Otras explicaciones no se pueden descartar: puede ser que el FME y el 2DFME actúen como el RSV con actividad anticiclooxigenasa, modulando la actividad del metabolismo de lípidos y de las lipoproteínas o inhibiendo la activación del NF- κ B y AP-1 (Goldberg et al., 1995; Jang et al., 1997; Macarrone et al., 1999).

Es importante observar que 2DFME demostró características hepatoprotectoras más altas que FME incluso cuando ambas estructuras mantienen el sustituyente 4'-methoxy en la base del estilbeno, de ahí, podemos concluir que las diferencias en las características farmacológicas entre los compuestos son solamente debido al átomo adicional del flúor en el 2DFME. Puesto que los compuestos fueron probados *in vivo*, la estabilización metabólica parece ser la explicación más razonable.

A pesar de que la posterior investigación para encontrar el blanco terapéutico exacto de estos compuestos es necesaria para mejorar la actividad farmacológica basados en estudios de relación estructura-actividad, se demuestra que el 2DFME puede usarse como una herramienta terapéutica a reserva de más estudios o como una estructura líder para en base a ella, encontrar un fármaco con efectos hepatoprotectores óptimos.

CONCLUSIONES

I.- De la síntesis química:

- a) Se desarrolló un novedoso método de síntesis orgánica basado en el uso de microondas que reduce el tiempo de reacción y facilita la purificación.
- b) Se realizaron las asignaciones espectroscópicas de RMN-¹H y ¹³C para todos los compuestos.
- c) Se sintetizaron los compuestos propuestos satisfactoriamente.

II.- De la evaluación farmacológica:

- a) El 2DFME y el FME fueron capaces de prevenir el daño al hígado inducido por la intoxicación aguda de CCl₄.
- b) El 2DFME mostró un efecto más pronunciado, principalmente sobre la prevención de la actividad enzimática de la ALT y de la expresión del TNF- α y de IL-6.
- c) Las diferencias entre los compuestos se deben a la adición de un átomo de flúor en la posición 3.
- d) El 2DFME representa una herramienta terapéutica prometedora para las enfermedades hepáticas o un compuesto base para la optimización de la estructura.

PERSPECTIVAS

1. Identificar el blanco terapéutico preciso de tanto del RSV como del 2DFME para determinar si comparten el mecanismo de acción y enfocar los estudios estructura-actividad a la diana biológica correcta.
2. Determinar si el mejor efecto del 2DFME se debe a la estabilización metabólica mediante la determinación de sus metabolitos en orina y/o plasma, así mismo, la determinación de algunos parámetros farmacocinéticos como la vida media, su biodisponibilidad por vía oral, Cmax y Tmax, sería de gran utilidad.
3. Sintetizar y evaluar compuestos con diferentes patrones y tipos de sustituyentes, considerando remplazos bioisostéricos y algunas otras estrategias de diseño de moléculas bioactivas.
4. Estudios *in vitro*, especialmente sobre células de Kupffer, células estelares y hepatocitos, así como en modelos tanto de prevención como de reversión del daño *in vivo* como el modelo de ligadura del conducto biliar común y el modelo crónico de CCl₄, nos darían mayor información sobre las propiedades hepatoprotectoras potenciales de este compuesto.
5. Debido a que la dosis utilizada puede considerarse baja si se compara con las utilizadas para otras sustancias, la evaluación del 2DFME a dosis más altas podría producir un mayor efecto hepatoprotector de este compuesto.

BIBLIOGRAFÍA

- Ara C, Kirimlioglu H, Karabulut AB, Coban S, Ay S, Harputluoglu M, Kirimlioglu, V y Yilmaz S. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in cholestasis. *J Surg Res* 2005;127:112-117.
- Barrao CF. Funciones Biológicas del sinusoides hepático. En: Herrerías G, Díaz DA y Jiménez AM, eds. Tratado de hepatología. Tomo II. Sevilla: Universidad de Sevilla, 1996.
- Bavaresco L, Fregoni C, Cantú E y Trevisan M. Stilbene compounds: from the grapevine to wine. *Drug Exp Clin Res* 1999;25:57-63.
- Bjornsson OG, Bourgeois CS y Gibbons GF. Varying very low-density lipoprotein secretion of rat hepatocytes by altering cellular levels of calcium and the activity of protein kinase C. *Eur J Clin Invest* 1998;28:720-729.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
- Buege JA y Austin SD. Microsomal lipid peroxidation. En: Fleischer S y Packer L, eds. *Methods in Enzymology*. Vol. 52. New York: Academic Press, 1978.
- Bulle F, Mavier P, Zafrani, ES, Preaux AM, Lescs MC, Siegrist S, Dhumeaux D y Guellaen G. Mechanism of gamma-glutamyl transpeptidase release in serum during intrahepatic and extrahepatic cholestasis in the rat. A histochemical, biochemical and molecular approach. *Hepatology* 1990;11:545-550.
- Castro JA. Mechanistic studies and prevention of free radical cell injury. En: Paton W, Mitchell J y Turner P, eds. *Proceedings of IUPHAR 9th Int Congress Pharmacol*. London: MacMillan, 1984:243-250.
- Chavez E, Reyes-Gordillo K, Segovia J, Shibayama M, Tsutsumi V, Vergara P, Moreno MG y Muriel P. Resveratrol prevents fibrosis, NF-kappaB activation and TGF-beta increases induced by chronic CCl₄ treatment in rats. *J Appl Toxicol* 2008;28:35-43.
- Clawson GA, MacDonald J y Woo C. Early hypomethylation of 2'-O-ribose moieties in hepatocyte cytoplasmic ribosomal RNA underlies the protein synthetic defect produced by CCl₄. *J Cell Biol* 1987;105:705-711.

- Comporti M. Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab Invest* 1985; 53:599-623.
- DiRenzo AB, Gandolfi AJ y Sipes IG. Microsomal bioactivation and covalent binding of aliphatic halides to DNA. *Toxicol Lett* 1982;11:243-252.
- Fremont, L, Belguendouz L y Delpal S. Biological effects of resveratrol. *Life Sci*, 2000;66:663-673.
- Glossman M y Neville D. Glutamyl Transferase in Kidney Brush Border Membranes. *FEBS Lett* 1972;19:340-344.
- Godichaud S, Krisa S, Couronne B, Dubuisson L, Merillon JM, Desmouliere A y Rosenbaum J; Deactivation of cultured human liver myofibroblasts by trans-resveratrol, a grapevine-derived polyphenol. *Hepatology* 2000;31:922-931.
- Goldberg DM et al. Beyond alcohol: beverage consumption and cardiovascular mortality. *Clin. Chim. Acta* 1995;237: 155–187.
- Goldberg D, Tsang E, Karuanchiri A, Diamandis E, Soleas G y Ng E. Method to assay the concentrations of phenolic constituents of biological interest in wines. *Anal Chem* 1996;68:1688-1694.
- Gonzalez FJ, Tukey RH. Drug metabolism. En: Brunton L, Lazo J y Parker K, eds. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Vol. 1. New York: McGraw-Hill, 2006.
- González RC, Hevia VA y Davidson HG. Anatomía microscópica del hígado. En: Herrerías G, Díaz DA y Jiménez AM, eds. *Tratado de hepatología*. Tomo 1. Sevilla: Universidad de Sevilla, 1996.
- Han D, Hanawa N, Saberi B y Kaplowitz N. Mechanisms of Liver Injury III. Role of glutathione redox status in liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291:1-7.
- Hansen HC et al. Stilbene analogs as inducers of apolipoprotein-I transcription. *Eur J Med Chem* 2010;45:2018-2023.
- Hevia VA, González RC y Davidson HG. Ultraestructura del hígado. En: Herrerías G, Díaz DA y Jiménez AM, eds. *Tratado de hepatología*. Tomo 1. Sevilla: Universidad de Sevilla, 1996.

- Heynekamp JJ, Weber WM, Hunsaker LA, Gonzales AM, Orlando RA, Deck LM y Jagt DL. Substituted trans-stilbenes, including analogues of the natural product resveratrol, inhibit the human tumor necrosis factor alpha-induced activation of transcription factor nuclear factor kappaB. *J Med Chem* 2006;30:7182-7189.
- Hissin PJ y Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976;74:214-226.
- Holmes-McNary M y Baldwin AS Jr. Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the IkappaB kinase. *Cancer Res* 2000;60:3477-3483.
- Jang M et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997;275:218-220.
- Kang SS et al. Synthesis and biological evaluation of a library of resveratrol analogues as inhibitors of COX-1, COX-2 and NF- κ B. *Bioorg Med Chem* 2009; 17(3): 1044-1054.
- Moran et al. Synthesis, structural characterisation and biological evaluation of fluorinated analogues of resveratrol. *Bioorg Med Chem* 2009;17:4510-4522.
- Khartulyari AS et al. Concise Strategy to the core structure of the macrolide queenslandon. *Org Lett* 2006;8:5833-5836.
- Kaplan MM. Laboratory tests. En: Schiff RE y Schiff JB, eds. *Diseases of the liver*. 7th ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company 1993:108-144.
- Kawada N, Seki S, Inoue M y Kuroki T. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology* 1998;27:1265-1274.
- Kidd PM. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alt Med Rev* 1997;2:155-176.
- Kopp P; Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? *Eur J Endocrinol* 1998;138:619-620.
- Langcake P y Pryce R. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol Plant Pathol* 1976;9:77-86.
- Lockrad VG, Mehendale, HM y O'Neal, RM. Chlordecone-induced potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity: a light and electron microscopy study. *Exp Mol Pathol* 1983;39:230-245.

- MacCarrone M et al. Resveratrol prevents apoptosis in K562 cells by inhibiting lipoxygenase and cyclooxygenase activity. *Eur. J. Biochem.* 1999;265:27–34.
- Manna SK, Mukhopadhyay A y Aggarwal BB. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol* 2000;164:6509–6519.
- Mazué F et al. Structural determinants of resveratrol for cell proliferation inhibition potency: Experimental and docking studies of new analogs. *Eur J Med Chem* 2010;45:2972-2980.
- Murias M et al. Resveratrol analogues as selective cyclooxygenase-2 inhibitors: synthesis and structure–activity relationship. *Bioorg Med Chem* 2004;12:5571-5578.
- Murias M et al. Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: structure–activity relationship. *Biochem Pharmacol* 2005; 69:903-912.
- Muriel P. Peroxidation of lipids and liver damage. En: Baskin S, Salem H, eds. *Oxidants, Antioxidants and Free Radicals*. USA: Taylor & Francis Press, 1997:237-257.
- Netter FH. Sistema digestivo: hígado, vías biliares y páncreas. En: Colección Ciba de ilustraciones médicas. Tomo 3.3, secciones XV y XI. Barcelona: Ed. Científicas y Técnicas (Masson-Salvat de Medicina), 1981.
- Nishimaki-Mogami T, Suzuki K y Takahashi A. The role of phosphatidylethanolamine methylation in the secretion of very low density lipoproteins by cultured rat hepatocytes: rapid inhibition of phosphatidylethanolamine methylation by bezafibrate increases the density of apolipoprotein B48-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1996;1304:21-31.
- Omura M, Katsumata T, Misawa H y Yamaguchi M. Decrease in protein kinase and phosphatase activities in the liver nuclei of rats exposed to carbon tetrachloride. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;15:192-197.
- Perez-Tamayo R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ and adequate model of human cirrhosis? *Hepatology* 1983;3:112-120.
- Pervaiz S. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB J* 2003;17:1975-1985.

- Plaa GL, Hewitt WR. Detection and evaluation of chemically induced liver injury. En Hayes L, ed. Principles and methods of toxicology. New York: Raven press, 1982.
- Raucy JL, Krane, JC y Lasker JM. Bioactivation of halogenated hydrocarbons by cytochrome P450E1. Crit Rev Toxicol 1993;23:1-20.
- Reitman S y Frankl SA. A Colorimetric Method for the Determination of Serum Glutamic Oxaloacetic Pyruvic and Glutamic Piruvic Transaminases. Am J Clin Pathol 1957;28:56-63.
- Reynolds ES. Liver parenchymal cell injury. I. Initial alterations of the cell following poisoning with carbon tetrachloride. J Cell Biol 1963;19:139-157.
- Rivera H, Shibayama M, Tsutsumi V, Perez-Alvarez V y Muriel P. Resveratrol and trimethylated resveratrol protect from acute liver damage induced by CCl(4) in the rat. J Appl Toxicol 2008;28:147-155.
- Rotondo S et al. Effect of transresveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. B J Pharmacol 1998;123:1691-1699.
- Schubert R, Fischer R, Hain R, Schreier PH, Bahnweg G, Ernst D y Sanderman. H An ozone-responsive region of the grapevine resveratrol synthase promoter differs from the basal pathogen-responsive sequence. Plant Mol Biol 1997;34:417-426.
- Shah P, Westwell AD. The role of fluorine in medicinal chemsitry. J Enzyme Inhib Med Chem 2007;22:527-540.
- Stivala LA, Savio M, Carafoli F, Perucca P, Bianchi L, Maga G, Forti L, Pagnoni UM, Albini A, Prosperi E y Vannini V. Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. J Biol Chem 2001;276:22586-22594.
- Tsai SH et al. Suppression of nitric oxide synthase and the down regulation of the activation of NF kappa B in macrophages by resveratrol. Br J. Pharmacol 1999;126:673-680.
- Wadsworth TL y Koop DR. Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. Biochem Pharmacol 1999;57:941-949.
- Weber LWD, Boll M y Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. Crit Rev Toxicol 2003;33:105-136.

Woodman DD. Assessment of Hepatic Function and Damage in Animal Species. *J Appl Toxicol* 1988;8:249-254.

Zimmermann HJ. Experimental hepatotoxicity. En: Eichler O, ed. *Handbook of experimental pharmacology*. Vol. 16, parte 5. New York: Springer, 1976:1-120.