



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**“Efecto hepatoprotector y antioxidante del extracto y los
principios activos de *Geranium shiedeanum*”**

Tesis que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

Presenta:

L. N. NANCY VARGAS MENDOZA

Director(a) de Tesis

DRA. MIRANDELI BAUTISTA ÁVILA

San Agustín Tlaxiaca Hgo. a 3 de diciembre de 2012



Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca.

Durante el periodo 1 de octubre a 30 de diciembre de 2011 se realizó una estancia internacional de investigación en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid en Madrid, España apoyada por Beca Mixta del CONACyT.

Dedicatorias y agradecimientos

A Dios por permitirme lograr realizar este gran reto, a mis padres Adán y Vero por darme todo su amor y apoyo en todo momento desde que nací. Mi hermano Edumir y su familia porque siempre me apoyan y están conmigo cuando más lo necesito.

A la Dra. Mirandeli Bautista porque simplemente sin ella no hubiese sido parte de este proyecto. A los doctores Claudia Velázquez, Juan Gayosso, Mini de la O, la Mtra. Gina por su conocimiento y la ayuda que me brindaron durante mi estancia en los laboratorios.

A Aanuar y mis amigas Paty, Yoli, Iza, Eli que siempre me han brindado su amor y amistad incondicional desde que nos conocimos.

A mis amigos de España Lau, Miguel, Patri, Andrea por recibirme y enseñarme muchas cosas pero lo más importante por su bella amistad. A la Dra. Juana Benedi por recibirme en su laboratorio.

A todos mis compañeros de maestría por compartir este camino así como a mis maestros por darnos su conocimiento.

A todos ellos y a quienes me falta por mencionar pero que han sido parte importante durante mi vida y a lo largo de los últimos dos años que implicó este proyecto:

MUCHAS GRACIAS...

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS	6
INDICE DE TABLAS	9
INDICE DE ESQUEMAS.....	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	12
ABREVIATURAS	14
I. INTRODUCCIÓN.....	17
II. ANTECEDENTES	19
2.1 Anatomía del hígado	19
2.2 Funciones del hígado.....	23
2.1.1 Metabolismo de proteínas.....	24
2.1.2 Metabolismo de los hidratos de carbono.....	24
2.1.3 Metabolismo de los lípidos	25
2.1.4 Detoxificación de fármacos y toxinas	25
2.2 Mecanismos de hepatotoxicidad.....	26
2.2.1 Biotransformación de hepatotóxicos y producción de radicales libres.....	27
2.3 Marcadores de lesión hepática	29
2.3.1 Aspartato aminotransferasa (AST).....	29
2.3.2 Alanina aminotransferasa (ALT).....	30
2.3.3 Bilirrubinas.....	30
2.4 Metabolismo hepático de la Tioacetamida.....	31
2.5 Sistemas de defensa antioxidante	32
2.5.1 Sistemas de defensa antioxidante endógeno	34
2.5.1.1 Enzimas antioxidantes	34
2.5.1.2 Glutación	38
2.5.1.2.1 Biosíntesis de glutación.....	39
2.5.1.2.2 Función antioxidante del Glutación.....	41
2.5.1.2.3 Glutación y detoxificación de xenobióticos.....	42
2.5.2 Sistemas de defensa antioxidante exógeno	43
2.6 Medicina complementaria alternativa y productos naturales	44
2.6.1 Especies con efecto hepatoprotector	45
2.6.1.1 Especie Geranium	47
2.6.1.1.1 Geranium shiedeanum.....	48
2.6.1.1.1.1 Biodisponibilidad y metabolismo de flavonoides	53
2.6.1.1.1.2 Biodisponibilidad y metabolismo de elagitaninos.....	54

III. JUSTIFICACIÓN.....	56
IV. HIPÓTESIS.....	59
V. OBJETIVOS	60
5.1 Objetivo General	60
5.2 Objetivos específicos	60
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
6.1 Animales y tratamiento con extracto de <i>Geranium shiedeanum</i>	61
6.2 Determinación de enzimas antioxidantes por Western blot	62
6.3 Determinación de glutatión reducido GSH y oxidado GSSG	63
6.4 Determinación de actividad antioxidante DPPH.....	64
6.5 Purificación de los principios activos de <i>G. shiedeanum</i>	65
6.6 Animales y tratamiento con extracto y principios activos de <i>G. shiedeanum</i>	66
6.7 Determinación en suero de Alanina aminotransferasa	68
6.8 Aspartato aminotransferasa	69
6.9 Determinación en suero de Bilirrubina total.....	70
6.10 Análisis estadístico	71
VII. RESULTADOS.....	72
7.1 Efecto del pretratamiento con extracto de <i>G. shiedeanum</i> sobre los niveles de enzimas del sistema antioxidante endógeno en hígado de ratas después de la intoxicación con TAA	72
7.1.1 Catalasa.....	73
7.1.2 Superóxido Dismutasa	73
7.1.3 Glutatión Peroxidasa.....	73
7.1.4 Glutatión reductasa	74
7.2 Efecto del pretratamiento con el extracto de <i>G. shiedenum</i> sobre el índice de reducción (IR) GSH/GSSG en ratas intoxicadas con TAA.....	79
7.3 Evaluación de la capacidad antioxidante del extracto de <i>G. shiedeanum</i> por el método DPPH.....	81
7.4 Efecto del pretratamiento con extracto de y los principios activos de <i>G. shiedeanum</i> sobre los marcadores de lesión hepática inducida por TAA.	83
7.4.1 Alanina aminotransferasa.....	83
7.4.2 Aspartato aminotransferasa	85
7.4.3 Bilirrubinas totales	87
VIII. DISCUSIÓN.....	89

8.1 Efecto del pretratamiento con extracto de <i>G. shiedeanum</i> sobre los niveles de enzimas del sistema antioxidante endógeno en hígado de ratas después de la intoxicación con TAA	89
8.2 Efecto del pretratamiento con el extracto de <i>G. shiedenum</i> sobre el índice de reducción (IR) GSH/GSSG en ratas intoxicadas con TAA.....	92
8.3 Evaluación de la capacidad antioxidante del extracto de <i>G. shiedeanum</i> por el método DPPH.....	94
8.4 Efecto del pretratamiento con extracto y principios activos de <i>G. shiedeanum</i> sobre los marcadores de lesión hepática inducida por TAA	95
IX. CONCLUSIONES	100
X. BIBLIOGRAFÍA	102

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación del acino hepático unidad estructural y funcional del hígado conformado por lóbulos hepáticos contiguos y hepatocitos que se disponen formando sinusoides derivados de dos venas portales. Los sinusoides son irrigados por las arterias hepáticas cerca de la periferia de lóbulo. Cada lóbulo tiene aporte arterial, portal y drenaje biliar. El acino hepático es considerado la base para diferenciar las distintas zonas dentro del hígado.	20
Figura 2. La imagen muestra un corte de parénquima hepático representado por hepatocitos teñidos con hematoxilina-eosina (40X). Se observan las membranas celulares bien definidas y un citoplasma basófilo y grumoso. Los núcleos tienen cromatina puntiforme y presencia de nucleolos.	23
Figura 3. Representación grafica del metabolismo de TAA. El primer paso comprende la transformación de TAA en TASO por acción del CYP2E1, en el segundo paso la molécula de TASO se convierte en el metabolito electrofílico TASO ₂ capaz de unirse covalentemente a estructuras subcelulares y generar lesión hepática.	32
Figura 4. Representación de las principales rutas metabólicas productoras de radicales libres y la intervención de los sistemas antioxidantes endógenos y exógenos. O ₂ ^{•-} : radical anión superóxido, HO [•] : radical hidróxilo, RO [•] : radical alquilo,ROO [•] : radical peroxilo, ROOH: hidroperóxido, Fe: hierro, Cu: cobre, GSH:glutación reducido, GSSG: glutación oxidado, GPx: glutación peroxidasa, GR: glutación reductasa, NADPH: Nicotinamida Adenina DinucleótidoFosfato, Cat: catalasa, SOD: Superóxido Dismutasa.	34
Figura 5. Destoxificación de las especies reactivas de oxígeno por sistemas enzimáticos de defensa antioxidante (SOD, catalasa y GPx). La acción concertada de estos sistemas se encuentra complementada por una serie de antioxidantes no enzimáticos (GSH, L-cisteina y vitamina E).	35
Figura 6. Metabolismo de glutación en tres pasos: a) Síntesis de glutación a partir de glutamato, b) Ciclo del γ -glutamilo realizado en seis pasos, funciona como mecanismo de transporte de aminoácidos y gasta tres moléculas de ATP en cada ciclo, y c) Oxidación de GSH a GSSG.	40
Figura 7. Especie <i>Geranium shidedeanum</i>	49
Figura 8. Principales compuestos aislados de <i>G. shidedeanum</i> . (1) ácido gálico, (2) ácido elágico, (3) acetnil geraniina, (4) 3-O- α -L-arabinofuranosido-7-O- β -D-ramnosido de Kaemferol.	50
Figura 9. Clasificación de los polifenoles.	52
Figura 10. Apertura de cavidad abdominal	Figura 11. Extracción del hígado 61
Figura 12. Electroforesis en gel	Figura 13. Bloqueo de membranas..... 63
Figura 14. Lectura en placa para la determinación de GSH.....	64
Figura 15. Obtención de acetnil geraniina por cromatografía en columna	65

Figura 16. Obtención de 3-O- α -L-arabinofuranosido-7-O- β -D-ramnosido de Kaemferol por cromatografía en columna.....	66
Figura 17. Apertura de cavidad abdominal y obtención de sangre portal	68
Figura 18. Efecto del pretratamiento con extracto de <i>G. shiedeanum</i> en los niveles de Catalasa (Cat) analizados por Western blot en homogenados de hígado de ratas intoxicadas con una dosis subletal de tioacetamida (TAA). Las muestras fueron obtenidas a las 0, 24, 48 h después de administrada la TAA. Los resultados expresados en unidades arbitrarias (u.a.) fueron la media \pm SD de los valores obtenidos por duplicado en homogenados de hígados de 4 animales diferentes para cada condición. Las diferencias frente a los respectivos controles están representadas como (a) y las diferencias debidas al extracto como (b) $p < 0.05$	75
Figura 19. Efecto del pretratamiento con extracto de <i>G. shiedeanum</i> en los niveles de Superóxido Dismutasa (SOD) analizados por Western blot en homogenados de hígado de ratas intoxicadas con una dosis subletal de tioacetamida (TAA). Las muestras fueron obtenidas a las 0, 24, 48 h después de administrada la TAA. Los resultados expresados en unidades arbitrarias (u.a.) fueron la media \pm SD de los valores obtenidos por duplicado en homogenados de hígados de 4 animales diferentes para cada condición. Las diferencias frente a los respectivos controles están representadas como (a) y las diferencias debidas al extracto como (b) $p < 0.05$	76
Figura 20. Efecto del pretratamiento con extracto de <i>G. shiedeanum</i> en los niveles de Glutación Peroxidasa (GPx) analizados por Western blot en homogenados de hígado de ratas intoxicadas con una dosis subletal de tioacetamida (TAA). Las muestras fueron obtenidas a las 0, 24, 48 h después de administrada la TAA. Los resultados expresados en unidades arbitrarias (u.a.) fueron la media \pm SD de los valores obtenidos por duplicado en homogenados de hígados de 4 animales diferentes para cada condición. Las diferencias frente a los respectivos controles están representadas como (a) y las diferencias debidas al extracto como (b) $p < 0.05$	77
Figura 21. Efecto del pretratamiento con extracto de <i>G. shiedeanum</i> en los niveles de Glutación Reductasa (GR) analizados por Western blot en homogenados de hígado de ratas intoxicadas con una dosis subletal de tioacetamida (TAA). Las muestras fueron obtenidas a las 0, 24, 48 h después de administrada la TAA. Los resultados expresados en unidades arbitrarias (u.a.) fueron la media \pm SD de los valores obtenidos por duplicado en homogenados de hígados de 4 animales diferentes para cada condición. Las diferencias frente a los respectivos controles están representadas como (a) y las diferencias debidas al extracto como (b) $p < 0.05$	78
Figura 22. Efecto del pretratamiento con extracto de <i>G. shiedeanum</i> en los niveles de en el índice de reducción (IR) Glutación reducido/oxidado (GSH/GSSG) analizados por a través de la medición de fluorescencia en homogenados de hígado de ratas intoxicadas con una dosis subletal de tioacetamida (TAA). Las muestras fueron obtenidas a las 0, 24, 48 h después de administrada la TAA. Los resultados expresados fueron la media \pm SD de los	

valores obtenidos por duplicado en homogenados de hígados de 4 animales diferentes para cada condición. Las diferencias frente a los respectivos controles están representadas como (a) y las diferencias debidas al extracto como (b) $p < 0.05$ 80

Figura 23. Evaluación de la capacidad antioxidante del extracto de *G. shiideanum* por la técnica DPPH. Los resultados expresados como el porcentaje de inhibición (PI) fueron la media \pm SD calculados por triplicado para cada muestra. Las diferencias contra el control negativo DPPH+MeOH son expresadas como (a), las diferencias contra el control positivo DPPH+BHT son expresadas como (b) con valor $p < 0.05$ 82

Figura 24. Efecto del pretratamiento de extracto y principios activos obtenidos de *G. shiideanum* en la actividad de Aspartato aminotransferasa (ALT) en suero intoxicadas con una dosis subletal de Tioacetamida (TAA). Los resultados expresados en Unidades por litro de suero (U/L de suero) fueron la media \pm SD de tres mediciones por cada muestra (n = 5). Las diferencias significativas contra el control son expresadas como (a) y las diferencias contra TAA se expresan como (b) $p < 0.05$ 84

Figura 25. Efecto del pretratamiento de extracto y principios activos obtenidos de *G. shiideanum* en la actividad de Aspartato aminotransferasa (AST) en suero intoxicadas con una dosis subletal de Tioacetamida (TAA). Las muestras fueron obtenidas a las 24 h después de administrada la TAA. Los resultados expresados en Unidades por litro de suero (U/L de suero) fueron la media \pm SD de tres mediciones por cada muestra (n = 5). Las diferencias significativas contra el control son expresadas como (a) y las diferencias contra TAA se expresan como (b) $p < 0.05$ 86

Figura 26. Efecto del pretratamiento de extracto y principios activos obtenidos de *G. shiideanum* en los valores de Bilirrubina total (BILT) en suero de ratas intoxicadas con una dosis subletal de Tioacetamida (TAA). Las muestras fueron obtenidas a las 24 h después de administrada la TAA. Los resultados expresados en miligramos por decilitro de suero (mg/dL de suero) fueron la media \pm SD de tres mediciones por cada muestra (n = 5). Las diferencias significativas contra el control son expresadas como (a) y las diferencias contra TAA se expresan como (b) $p < 0.05$ 88

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los sistemas antioxidantes de acuerdo a su origen.....	33
Tabla 2. Especies con actividad hepatoprotectora.....	45
Tabla 3. Plan de tratamiento del extracto y compuestos de <i>G. shiideanum</i>	67

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinada fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de ALT en la muestra.	69
Esquema 2. La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinada fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de AST en la muestra.	70

RESUMEN

El uso de plantas medicinales se ha reportado en todo el mundo para el tratamiento de múltiples enfermedades desde épocas ancestrales, sin embargo la mayoría de ellas no cuentan con estudios científicos suficientes que sustenten su uso.

El *Geranium shiedenum*, es una especie que crece en los bosques de Mineral del Monte y Mineral del chico en el Estado de Hidalgo, México, de este, se ha descrito un uso en la medicina tradicional como antiséptico y antipirético, sin embargo tampoco contaba con ningún estudio científico al respecto. Cabe mencionar, que otras especies de geranio reportadas anteriormente, han presentado actividad antioxidante, hipoglucemiente, antihipertensiva, hepatoprotectora, antiinflamatoria, hipocolesterolemiente y anticancerígena. En estudios previos del grupo, del extracto de *G.shiedeanum* se identificó actividad hepatoprotectora al reducir los marcadores de lesión hepática a niveles cercanos a los controles a las 24 y 48 hrs. Además, identificaron cuatro componentes principales, tres taninos hidrolizables: ácido gálico, ácido elágico, acetnil geraniina y un flavonoide 3-O- α -L-arabinofuranosido-7-O- β -D-ramnosido de Kaemferol.

Este estudio tuvo dos fases, la primera tuvo por objetivo evaluar el efecto del pretratamiento con extracto de *G. shiedeanum* sobre la estimulación del sistema de defensa antioxidante endógeno (SDAE) Catalasa (Cat), Superóxido Dismutasa (SOD), Glutación Peroxidasa (GPx) y Glutación Reductasa (GR) y el Índice de Reducción de glutación (IR GSH/GSSG) en ratas intoxicadas con una dosis subletal de Tioacetamida (6.6 mmol/Kg). En esta primera fase también se evaluó la actividad antioxidante del extracto por la técnica de DPPH. En la segunda fase, se realizó la extracción de los principios activos acetnil geraniina y 3-O- α -L-arabinofuranosido-7-O- β -D-ramnosido de Kaemferol por cromatografía en columna y capa fina, la identificación de los compuestos se realizó por RMN. Posteriormente, se evaluó la capacidad del extracto y los compuestos activos para reducir la lesión hepática a través de la medición las enzimas Aspartato aminotransferasa (AST), Alanina aminotransferasa (ALT) y Bilirrubinas totales (BILT) en ratas intoxicadas con TAA.

Resumen

Los resultados de la presente investigación mostraron que el extracto fue capaz de inducir la producción de las enzimas del SDAE así como mejorar el IR GSH/GSSG a las 24 y 48 h posteriores a la intoxicación; de igual forma el extracto mostró una elevada actividad antioxidante con un porcentaje de reducción del $86.91 \pm 7.93\%$ valor marcadamente diferente de los controles. La segunda parte del estudio confirmó el efecto hepatoprotector que ejerció el extracto pero además la actividad de los principios activos fue aún más notable, al reducir significativamente los marcadores de lesión AST, ALT y BILT.

En conclusión, el extracto y los principios activos de *G. shiedeanum* poseen elevada actividad antioxidante y ejercen un poderoso efecto hepatoprotector lo cual sugiere la continuación de estudios moleculares pertinentes para dilucidar los mecanismos de acción que ejercen en el organismo frente al daño hepático y así tener bases fundamentadas para hacer una propuesta en el tratamiento de las enfermedades hepáticas.

ABSTRACT

The use of medicinal plants has been reported worldwide for the treatment of multiple diseases since ancient times, but most of them do not have sufficient scientific studies to support its use.

Geranium shiedenum is a specie that grows in the forests of Mineral del Monte and Mineral del Chico in Hidalgo State, Mexico, it has been described its therapeutic use as antiseptic and antipyretic. The use of other *Geranium* extracts species has reported activity as antioxidant, hipoglycemic, antihypertensive, antinflammatory, hepatoprotective, hypocolesterolemic and anticancerigen. Previous studies of the group, it was identified hepatoprotective activity from *G. shiedeanum* extract by reducing injury markers to levels close to controls at 24 and 48 hrs. In addition, it has been identified four major components three hydrolyzable tannins: gallic acid, ellagic acid, acetyl geraniin and the flavonoid Kaemferol 3-O- α -L-arabinofuranose-7-O- β -D-Ramoside.

This study had two phases; the first one included the evaluation of pre-treatment with *G. shiedeanum* extract on stimulating endogenous antioxidant defense system (EADS): Catalase (Cat), Superoxide Dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Reductase (GR) and glutathione reduction index (RI GSH/GSSG) in rats liver tissue treated with a sublethal dose of thioacetamide (6.6 mmol/Kg). In this phase also antioxidant activity of *G. shiedeanum* extract was measured by DPPH technique. In the second stage, the active compounds geraniin acetyl and kaempherol 3-O- α -L-arabinofuranoside-7-O- β -D-rhamnosyde purification was performed by column and thin layer chromatography. The identification of such compounds was performed by NMR. Subsequently, we assessed the ability of the extract and the active compounds to reduce liver injury by measuring the enzyme aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and total bilirubin (TBIL) in rats intoxicated with TAA.

The results showed that *G shiedeanum* extract was able to induce the production of EADS enzymes improving RI GSH/GSSG at 24 and 48 h after intoxication, likewise, the extract showed a high antioxidant activity with reduction rate of $86.91 \pm 7.93\%$ value

markedly different from the controls. The second part of the study confirmed the hepatoprotective effect exerted by the extract but also the activity of active ingredients was even more remarkable, by significantly reducing damage markers AST, ALT and TBIL.

In conclusion, *G. shiedeanum* extract and its active compounds have high antioxidant activity and powerful hepatoprotective effect suggesting to keep going with phytochemical studies on other plant components and relevant molecular studies to elucidate action mechanisms exerted on the body against liver damage and thus have substantial grounds to make a serious proposal for the treatment of liver diseases.

ABREVIATURAS

ALT: Alanina aminotransferasa	•OH: Radical hidroxilo
AST: Aspartato aminotransferasa	ALP: Fosfatasa alcalina
ATP: Adenosin trifosfato	BHMT: Betaína homocisteína metiltransferasa
BHT: Butilhidroxitolueno	BILD: Bilirrubina directa
BILT: Bilirrubina total	CAM: Medicina complementaria alternativa
Cat: Catalasa	CBS: Cistationina β -sintetasa
CCl₄: Tetracloruro de carbono	COX-2: Ciclooxygenasa-2
CYP450: Citocromo P 450	CuZnSOD: Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc
DNA: Ácido desoxirribonucleico	DMSO: Dimetil sulfóxido
<i>G. shiedeanum:</i> <i>Geranium shiedeanum</i>	DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
GOT: Transaminasa glutámico oxalacética	G6PDH: Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
GPx: Glutación peroxidasa	GCL: Glutamato cisteína ligasa
GR: Glutación reductasa	GCLC: Glutamato cisteína ligasa catalizadora
GSH: Glutación reducido	GCLM: Glutamato cisteína ligasa moduladora
GSSG: Glutación oxidado	GS: Glutación sintetasa
GTP: Transaminasa glutámico pirúvica	H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

i.p.: Intraperitoneal	HTG: Triglicéridos hepáticos
IgA: Inmunoglobulina A	Hyc: Homocisteína
IL-1B: Interleucina-1B	i.g.: Intragástrica
LDH: Lactato deshidrogenasa	LOH: Lipohidroperóxido
LDL: Lipoproteínas de baja densidad	LOOH: Lipoperoxido
MeOH: Metanol	MDA: Malonaldehído
NaCl: Cloruro de sodio	MDH: Malato deshidrogenasa
NAD: Nicotinamida adenina dinucleotido	MnSOD: Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato	NH₃: Amoníaco
NK: Natural killer	NOM: Norma Oficial Mexicana
ORAC: Capacidad para atrapar radicales oxígeno	O₂^{-•}: Anión superóxido
QR: Quinona reductasa	ONOO: Peroxinitrito
REL: Retículo endoplásmico liso	Prx: Peroxiredoxina
RER: Retículo endoplásmico rugoso	RMN: Resonancia magnética nuclear
RO: Radical alcohoxilo	ROOH: Radical peroxílo
ROS: Especies reactivas de oxígeno	SAH: S-adenosil homocisteína
RPBI: Residuos peligrosos biológico infecciosos	SAMe: S-adenosil metionina

SDAE: Sistema de defensa antioxidante endógeno **SD:** Desviación estándar

SOD: Superóxido dismutasa

TASO: Tioacetamida sulfóxido

TASO₂: Tioacetamida disulfóxido

TAA: Tioacetamida

TBARS: Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico

UI: Unidades Internacionales

Trx: Tiroredoxina

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

u.a.: Unidades arbitrarias

γ-GT: gamma-glutamyl transferasa

γ-GCS: Gamma-glutamina cisteína sintetasa

I. INTRODUCCIÓN

El hígado es uno de los órganos más susceptibles de daño por el contacto frecuente que tiene con fármacos, drogas, alcohol, toxinas etc., esto supone una elevada incidencia de enfermedades hepáticas en México y en todo el mundo. Dentro de estas se encuentran básicamente la cirrosis, hepatitis, hepatopatía alcohólica, esteatosis hepática, entre otras. Se ha considerado que el cáncer hepático ocupa la séptima posición entre los de mayor incidencia y es la sexta causa de las muertes por cáncer. Tan solo en 2008 se reportaron 748 300 nuevos casos de cáncer hepático y 695 900 muertes en todo el mundo (1). En México los datos más recientes del INEGI en 2010 estimaron 23 453 muertes relacionadas con enfermedades del hígado y en el estado de Hidalgo se diagnosticaron 990 (2).

El tratamiento de las enfermedades hepáticas resulta costoso en varios sentidos porque involucra una serie de alteraciones sistémicas además del gasto económico asociado a la enfermedad y sus complicaciones. Conjuntamente, el uso de fármacos para el tratamiento de las enfermedades hepáticas muchas veces no resulta ser el más indicado ocasionando hepatotoxicidad inducida por fármacos evento que agrava aún más la condición patológica. La investigación sobre las terapias alternativas de estos padecimientos es un área poco explorada por eso resulta ser oportuno realizar propuestas de nuevos tratamientos que sean menos costosos y que impliquen menor número de alteraciones.

La medicina complementaria alternativa (CAM) de la que se ha obtenido conocimiento empírico sobre el uso de plantas en el tratamiento de infinidad de enfermedades ha sido básica para el diseño de estudios fitoquímicos cuyo principal objetivo es identificar las moléculas responsables de los efectos terapéuticos descritos, así como de los estudios biológicos en los que se intenta explicar los mecanismos de acción a través de los que dichas moléculas funcionan. Muchas personas en todo el mundo prefieren utilizar plantas medicinales en lugar de fármacos de patente porque sugieren que las plantas, al ser productos que ofrece la naturaleza generaran menores riesgos y complicaciones, aunado a esto tienen un menor costo. Sin embargo, es importante hacer notar que no por el hecho de ser de origen natural, su utilización no tendrá consecuencias, por esta razón es necesario

realizar los estudios toxicológicos pertinentes para establecer dosis letal media y dosis terapéuticas, esto permitirá con mayor seguridad utilizar de forma adecuada las plantas medicinales.

En este estudio se probó el efecto hepatoprotector y antioxidante del extracto y compuestos activos de la especie *G. shiedeana* en un modelo de hepatotoxicidad inducida por TAA con la finalidad de realizar una propuesta a partir de una especie endémica, los resultados de esta investigación resultaron ser muy prometedores.

II. ANTECEDENTES

2.1 Anatomía del hígado

El hígado es después de la piel, el órgano más grande del organismo humano, pesa entre 1500 y 1900 g., alrededor del 3% del peso corporal de un adulto está representado por el hígado, recibe entre el 25 y 28% del flujo sanguíneo y utiliza aproximadamente el 20% de oxígeno total que necesita una persona (3). Anatómicamente, se localiza en el cuadrante superior derecho y parte izquierdo por debajo del diafragma en la cavidad abdominal. Se considera una glándula mixta ya que posee funciones endócrinas y exócrinas. Esta cubierto por la capsula de Glisson, que es una fina capsula de tejido conectivo, a su vez rodeada en su mayoría por el peritoneo (4). Esta irrigado por las arterias hepáticas derecha e izquierda del tronco celiaco en un 15% y entre el 70 a 75% del riego proviene de la vena porta hepática con sangre procedente del tracto digestivo, páncreas y bazo, por lo tanto recibe los nutrientes absorbidos en el intestino (excepto lípidos que son transportados vía linfática), agentes tóxicos, fármacos, secreciones pancreáticas, productos de la degradación de las células sanguíneas del bazo. Por lo tanto las células hepáticas son las primeras en estar expuestas a una gran cantidad de compuestos tanto nutrimentos como sustancias tóxicas (5).

El hígado posee diferentes componentes estructurales: el *parénquima* que está conformado por placas de hepatocitos, el *estroma de tejido conectivo* que continua con la *capsula de Glisson* y sostiene las estructuras de las ramificaciones de la *vena porta*, la *arteria hepática* y los *conductos biliares* así como los *nervios* y la *venas centrales*. Los *sinusoides hepáticos* son espacios vasculares que recorren las placas de los hepatocitos y los *espacios paresinusoidales* o *de Disse* que separan el endotelio de los sinusoides de los hepatocitos (6).

Por otra parte, se encuentra el *lobulillo clásico* y los *lobulillos portales*. El *lobulillo clásico* que son unidades de forma hexagonal por donde atraviesan las arterias y la venas de las triadas portales que pasan por los sinusoides hepáticos y terminan en la vena

centrolobulillar o hepática terminal. Los *lobulillos portales* son bloques triangulares de parénquima hepático de tres lobulillos clásicos que en su eje central poseen unos conductos biliares y constituyen la parte medular de los lobulillos hepáticos.

Los *acinos hepáticos* representan la unidad hepática más pequeña (**Figura 1**), están formados por tres zonas adyacentes de dos lobulillos clásicos separados por los vasos sanguíneos de distribución que van de un espacio porta al otro; esta unidad correlaciona la irrigación, la histología del hígado y la actividad metabólica (6).

Las tres zonas descritas comprenden: *la zona I* que representa el área de tejido hepático que rodea en forma inmediata al dúctulo biliar y a las ramas terminales de la vena porta y la arteria hepática. *La zona III* comprende el parénquima más alejado de estas estructuras, la región que rodea a la vena central y la *zona II* formada por el tejido hepático ubicado en las dos zonas anteriores.

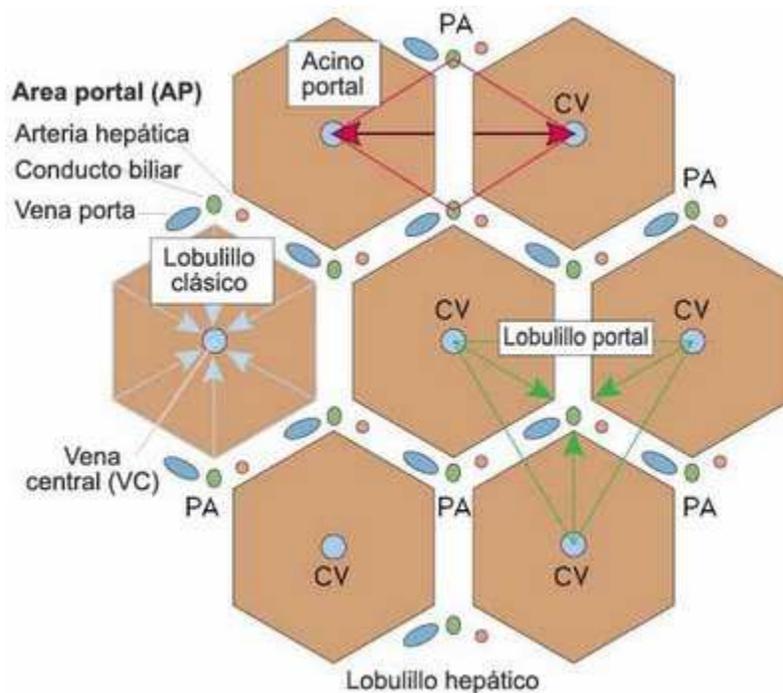


Figura 1. Representación del acino hepático unidad estructural y funcional del hígado conformado por lóbulos hepáticos contiguos y hepatocitos que se disponen formando sinusoides derivados de dos venas portales. Los sinusoides son irrigados por las arterias hepáticas cerca de la periferia de lóbulo. Cada lóbulo tiene aporte arterial,

portal y drenaje biliar. El acino hepático es considerado la base para diferenciar las distintas zonas dentro del hígado.

Las *células Kupffer* son macrófagos específicos del hígado poseen forma estrellada y un núcleo oval grande y globoso y un núcleo visible; su citoplasma contiene una gran cantidad de lisosomas por ser de tipo fagocitaria para incorporar partículas grandes como eritrocitos y bacterias; también unen partículas pequeñas pero lo hacen a través de vesículas por pinocitosis. En estas células se expresa la enzima NADPH-oxidasa la cual participa definitivamente en el desarrollo de la lesión hepática inducida por tóxicos. Tienen diversas funciones la principal quizá sea la de mantener la homeostasis hepática a diferentes niveles, la endocitosis es el proceso mediante el cual se mantiene la homeostasis por la captación de algunas proteínas plasmáticas y otras sustancias sanguíneas ya que su reclutamiento propicia una respuesta metabólica que lleva a producir citocinas y eicosanoides. Se observa una elevada actividad de peroxidasa en retículo endoplásmico rugoso y la envoltura nuclear. Remueven los remanentes de las LDL oxidadas del plasma, también captan las VLDL y lipoproteína A (7). En algunas enfermedades como cirrosis biliar primaria, la ictericia obstructiva y el consumo de etanol reducen la habilidad de las células Kupffer para formar complejos inmunitarios con la inmunoglobulina A (IgA) lo que afecta la capacidad inmunitaria del huésped. Las células Kupffer poseen receptores para los factores de complemento los cuales se unen a las inmunoglobulinas, el DNA, las bacterias y las plaquetas (8).

Las *células estrelladas* o *células de Ito* se localizan en los espacios de Disse entre las células parenquimatosas y las células endoteliales de los sinusoides sus funciones principales incluyen el almacenamiento de vitamina A, son las principales responsables de la producción de matriz extracelular durante la fibrosis (9). De manera normal las células estrelladas permanecen quiescentes pero pueden ser activadas por diversos factores que estimulan las lesiones hepáticas por lo que proliferan y generan matriz extracelular. El desarrollo de fibrosis hepática esta mediado por citocinas específicas y especies reactivas de oxígeno (ROS) liberadas por los hepatocitos dañados, las células de Kupffer y las células estrelladas activadas (10).

Las *células Pit* son células con actividad citotóxica de forma similar a los linfocitos granulares de sangre periférica y en función parecida a las células NK (asesinas naturales) que reconocen a las células blanco a través de receptores específicos uniéndose a ellas realizando sus funciones antitumorales por exocitosis de gránulos que contienen perforinas y granzimas, inducen apoptosis mediada por receptores y la activación de otras células del sistema inmune por la liberación de otras citosinas (11).

Los *hepatocitos* conforman los estratos celulares de los lobulillos hepáticos, tienen forma poligonal y miden entre 20 y 30 μm de diámetro y se disponen laminarmente en una o dos células de espesor de acuerdo a su localización dentro del lobulillo, constituyen aproximadamente el 80% de la población hepática y viven alrededor de 150 días (**Figura 2**). Sus dos caras basales se encuentran comunicadas con los espacios perisinusoidales o de Disse donde se extienden unas microvellosidades que aumentan la superficie de contacto con los sinusoides hepáticos. Las cuatro caras restantes son contiguas a otros hepatocitos y entre ellas se forman los canalículos biliares que son espacios intercelulares laberínticos de 1 a 2 μm de diámetro donde se secreta la bilis que es conducida hacia la periferia de los lobulillos (6). Algunos pueden tener dos núcleos, poseen un gran número de mitocondrias y peroxisomas, pequeños complejos de Golgi; en su citoplasma contienen el retículo endoplásmico rugoso (RER) y ribosomas libres donde se sintetizan las proteínas; además albergan inclusiones de glucógeno y depósitos de lípidos. En el retículo endoplásmico liso (REL) se sintetizan los lípidos de las lipoproteínas y ahí mismo se degradan y conjugan toxinas, drogas y el etanol lo que propicia la hipertrofia de este organelo estimulando la síntesis de membranas y enzimas del REL generando tolerancia en los individuos que ingieren grandes cantidades de estas sustancias. Los hepatocitos poseen gran capacidad regenerativa ya que entran en mitosis cuando su población se ve afectada por cirugía, enfermedad o toxicidad (12).

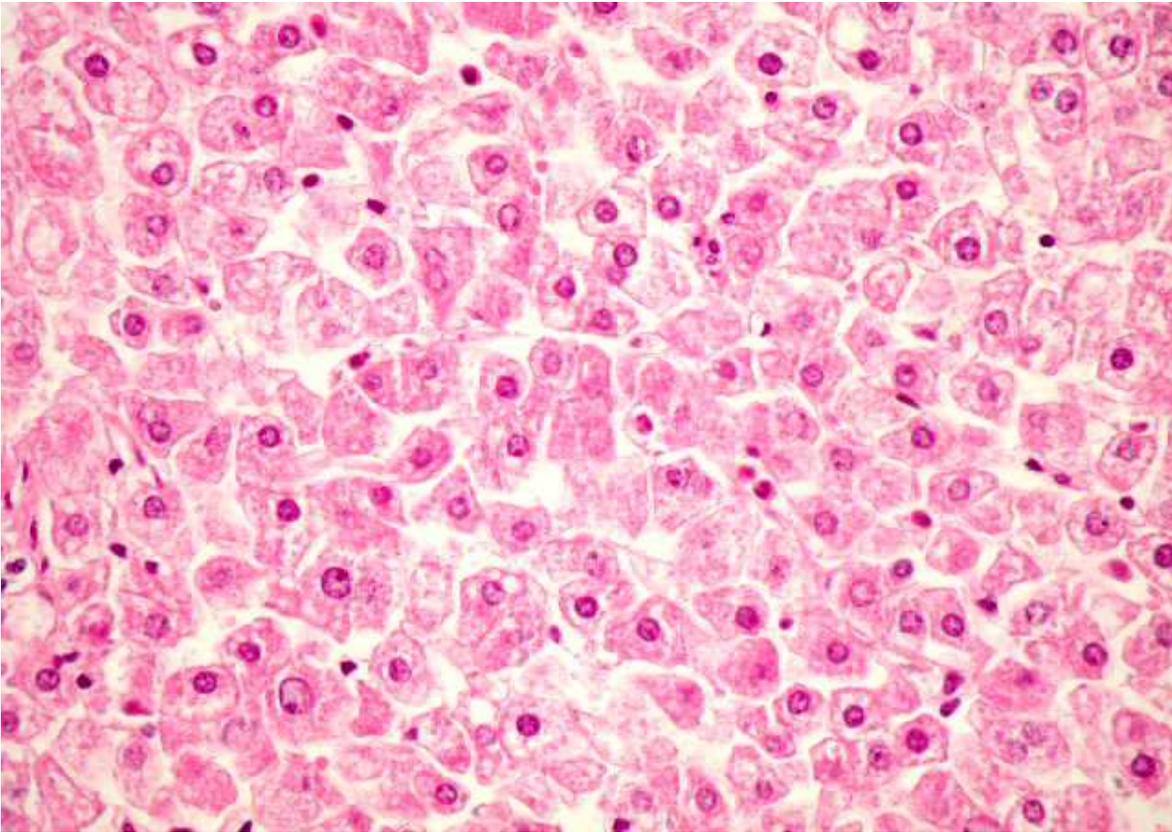


Figura 2. La imagen muestra un corte de parénquima hepático representado por hepatocitos teñidos con hematoxilina-eosina (40X). Se observan las membranas celulares bien definidas y un citoplasma basófilo y grumoso. Los núcleos tienen cromatina puntiforme y presencia de nucleolos.

2.2 *Funciones del hígado*

El hígado tiene un enorme número de funciones a su cargo dentro del organismo de las cuales destacan el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos, proteínas y la degradación de fármacos y toxinas. Participa en el almacenamiento y regulación de la vitamina A, así como de la síntesis de la proteína transportadora de la misma. En el hígado, la vitamina D es convertida a 25-dehidrocoleciferol y luego en el riñón se transforma en 1,25 dihidrocoleciferol que es la forma activa para que se absorba adecuadamente el calcio. La vitamina K es transportada hacia el hígado donde se forman los factores de coagulación como la protrombina. Este órgano también es responsable del metabolismo y

almacenamiento del hierro porque aquí se sintetizan proteínas como la transferrina, hemopexina, haptoglobina que están involucradas en el transporte y metabolismo; este elemento se almacena en el citoplasma de los hepatocitos en forma de ferretina y de gránulos de hemosiderina. El hígado también participa en la transformación de la hormona tiroxina secretada por la glándula tiroides como tetrayodotironina y posteriormente pasa a su forma biológicamente activa la triyodotironina. En el hígado se degrada la insulina y el glucagón, además, sintetiza el factor liberador de la hormona del crecimiento, tiene la función de secretar la bilis cuya función es la de emulsionar las grasas y posee una inminente relación con el sistema inmunológico por las células de Kupffer y las células Pit (6).

2.1.1 Metabolismo de proteínas

La albumina es la proteína plasmática de mayor importancia, regula el volumen sanguíneo y la presión oncótica. Las α y β globulinas transportan sustancias y regulan la presión coloidosmótica. En el hígado se degradan aminoácidos y el amoníaco que se forma como producto de desecho altamente tóxico a través del ciclo de la urea. Se transforman los aminoácidos no esenciales en esenciales; son sintetizadas las lipoproteínas de baja densidad LDL que transportan el colesterol desde el hígado a los tejidos del organismo, las lipoproteínas de muy baja densidad VLDL que transportan los triglicéridos desde el hígado a los tejidos y las proteínas de fase aguda importantes durante la respuesta inflamatoria (13).

2.1.2 Metabolismo de los hidratos de carbono

En el hígado se lleva a cabo una parte importante del metabolismo de los hidratos de carbono, se inicia con la fosforilación de la glucosa a glucosa 6 fosfato, éste es el primer paso de diversas rutas metabólicas y dependiendo de las necesidades energéticas de la célula, la glucosa 6 fosfato puede entrar a glucólisis para obtener energía o ser almacenada en forma de glucógeno hepático (glucogénesis) y durante un periodo de ayuno este será

utilizado como combustible principal para la liberación de glucosa dando paso a la glucogenólisis evento mediado por las hormonas adrenalina y glucagón (14). Este órgano también realiza otro proceso bioenergético llamado gluconeogénesis que consiste en la obtención de glucosa a partir de otros metabolitos no hidrocarbonados y esto ocurre cuando las reservas energéticas se han agotado durante un ayuno de 12 horas o por ejercicio físico prolongado y la glucosa debe mantener sus niveles en sangre por lo que es necesario la biosíntesis proveniente de otros sustratos alternativos como el glicerol liberado por la hidrólisis del triacilglicerol, de lactato originado en la glucólisis anaerobia de los eritrocitos y músculo esquelético y de aminoácidos por la degradación de proteína muscular (14).

2.1.3 Metabolismo de los lípidos

En el hígado se lleva a cabo la lipogénesis o biosíntesis de ácidos grasos que consiste en una serie de reacciones cíclicas para la construcción de una molécula de ácido graso a través de la adición de dos moléculas de carbono derivadas de acetil CoA a una cadena de ácido graso; por otra parte, también se realiza la β -oxidación de ácidos grasos a partir de los depósitos de triglicéridos del tejido adiposo para proporcionar energía durante el ejercicio o el ayuno prolongados. En la degradación de los ácidos grasos se eliminan dos unidades de carbono de la molécula de un ácido graso produciendo acetil CoA, que puede ser oxidado a CO_2 y H_2O por el ciclo de Krebs. La síntesis de colesterol y fosfolípidos también se efectúa en el hígado así como la producción de VLDL (15).

2.1.4 Detoxificación de fármacos y toxinas

Las membranas que rodean los sinusoides está constituido por una gran cantidad de fenestraciones o poros que permiten el paso directo de moléculas hacia los hepatocitos lo cual confiere a los hepatocitos esta capacidad de depurar fármacos, toxinas, drogas, etc. Muchas de las sustancias no pueden ser eliminadas del organismo manera directa por vía renal por lo que tiene que sufrir algunos procesos para convertirse en sustancias más solubles y así ser desechados. Esos procesos consisten en dos fases: oxidación y

conjugación. La oxidación se realiza en el REL o en las mitocondrias de los hepatocitos y consiste en una serie de reacciones llevadas a cabo por las enzimas del citocromo P450 que oxidan a estas sustancias y las inactivan. La conjugación se realiza con el ácido glucurónico, la glicina, taurina o radicales sulfato. Se ha visto que el consumo prolongado de ciertos fármacos genera hipertrofia del REL y por consiguiente aumentan las enzimas encargadas de estos procesos (16).

2.2 Mecanismos de hepatotoxicidad

En el mundo entero la lesión al hígado es muy frecuente debido al consumo desmesurado de alcohol, fármacos, de ciertos compuestos derivados de plantas y suplementos para bajar de peso, la exposición a virus como los de la hepatitis, el daño ocasionado por el ataque de los ácidos grasos libres producidos en el síndrome metabólico, procesos inflamatorios mediados por el sistema inmunológico y ciertas condiciones genéticas. Estas condiciones patológicas y las características metabólicas y de vascularización propias de este órgano lo hacen más vulnerable.

Alrededor del 75% del flujo sanguíneo hepático llega directamente del tracto gastrointestinal por la vena porta. El otro 25% es conducido por la arteria hepática. Los xenobióticos, una vez absorbidos en el intestino delgado viajan en la sangre portal para ser descargados en el hígado, por lo tanto este órgano ha tenido que desarrollar un sistema de detoxificación eficiente. En el proceso de detoxificación los compuestos son convertidos a metabolitos secundarios para ser eliminados más fácilmente del organismo, pero también pueden ser biotransformados a otros compuestos intermediarios altamente reactivos causando un daño directo al hígado (17).

La hepatotoxicidad depende de la dosis y el tiempo de contacto, por lo general es reversible en las etapas iniciales de la intoxicación siempre y cuando se elimine la exposición al tóxico. Existen otros factores que potencializan el efecto hepatotóxico uno de ellos es la elevada concentración que alcanzan en el hígado una gran cantidad de sustancias con naturaleza liposoluble, las transformaciones que sufren dentro del hepatocito y que el

hígado es la puerta de entrada hacia los demás tejidos. Los organelos celulares y sus funciones son los primeros en sufrir el daño, pero no solo los hepatocitos lo experimentan también los colangiocitos, células Kupffer, células de Ito, las células epiteliales sinusoidales, entre otros (17).

Una gran variedad de fármacos y agentes del medio ambiente son considerados como xenobióticos hepatotóxicos que originan lesión hepática en distintas formas: en su triple aspecto (zonal, masiva o difusa), esteatosis, colestásis, fibrosis, cirrosis, carcinoma hepatocelular y colangiocelular y alteraciones circulatorias intrahepáticas. El acino hepático es el lugar donde llegan las especies químicas reactivas por el flujo sanguíneo producto del metabolismo de estos compuestos lo que propicia letalidad característica en zonas específicas debidas, en parte, a la expresión de enzimas y a la presencia de tóxicos en la sangre a lo largo del acino. La mayor parte de estas sustancias producen necrosis lo cual implica pérdida de la homeostasis, alteración de la morfología celular, formación de protuberancias en la membrana, rotura y por último destrucción de organelos (18-20) .

2.2.1 Biotransformación de hepatotóxicos y producción de radicales libres

El hígado es capaz de eliminar toxinas de origen endógeno o exógeno a través del sistema de óxido-reducción monooxigenasa de función mixta dependiente del citocromo P-450 (CYP450). Este sistema consiste en una super familia que implica más de 13 000 genes encontrados en todos los reinos biológicos; catalizan un amplio número de reacciones de monooxigenación: hidroxilación, epoxidación, desaminación, sulfuración, N-desmetilación, O-desalquilación, S-oxidación y deshalogenación oxidativa. Más del 50% de las sustancias que ingresan al organismo son biotransformadas por este sistema. El CYP450 es una hemoproteína conformado por un grupo hemo y una cadena polipeptídica de 45 a 55 kD. El grupo hemo lo constituye una protoporfirina IX con un átomo de hierro localizado al centro del anillo protoporfirínico, el cual tiene cuatro ligandos insertos a los grupos pirrolicos y dos ligandos axiales. El sistema enzimático P-450 consiste en dos componentes proteicos: la hemoproteína CYP450 y una flavoproteína NADPH citocromo P-450 reductasa. El CYP450 es el lugar de unión del sustrato y del oxígeno molecular, la

reductasa sirve como transportador electrónico enviando electrones desde NADPH hacia el complejo CYP450 al sustrato, ya que el transporte de estos electrones es sumamente importante para que lleve a cabo las actividades de monooxigenación (21). En las células eucariotas el CYP450 se localiza en el retículo endoplasmico liso (microsomas) y en la mitocondria de los hepatocitos con mayor concentración en la región que rodea la vena central, por esto es común observar necrosis perivenosa producto del contacto con los metabolitos reactivos resultantes de la transformación de xenobióticos (22, 23).

Los hepatotóxicos biotransformados generan especies químicas reactivas que originan una serie de alteraciones moleculares por su gran avidez de unirse covalentemente con macromoléculas ricas en electrones de naturaleza nucleofílica o con el grupo $-SH$ del glutatión interviniendo en funciones celulares críticas (24). Básicamente se forman dos tipos de especies químicas reactivas: *compuestos electrofílicos* y *radicales libres*. Los *compuestos electrofílicos* resultan del metabolismo de hepatotoxinas como tioacetamida, bromobenceno y acetaminofeno; son capaces de generar enlaces débiles con el grupo $-SH$ de la cisteína o de la metionina y con el grupo NH_2 de la arginina e histidina, en consecuencia hay alteración estructural y funcional de proteínas, disminución de actividad enzimática y de transportadores celulares. Los enlaces fuertes los forman con sitios nucleofílicos fuertes como el DNA lo que puede ocasionar mutagénesis y carcinogénesis. Los *radicales libres* son derivados de hepatotóxicos como el tetracloruro de carbono y las especies reactivas de oxígeno (ROS) formadas en reacciones oxidativas por reducción del oxígeno molecular y son capaces de desencadenar peroxidación lipídica. Los sitios nucleofílicos de las macromoléculas en orden creciente son: grupos tiol (residuos cisteinil en proteínas y glutatión), átomos de azufre de residuos metionil de las proteínas, grupos aminos primarios y secundarios de las proteínas, grupos amino de las bases puricas y pirimidinas en DNA y RNA, átomos de oxígeno, átomos de oxígeno del fosfato en DNA y RNA (19).

Generalmente los hepatocitos reaccionan frente al daño por medio de la expresión y activación de sus mecanismos de defensa incluyendo hipertrofia del retículo endoplasmico, inducción de la expresión génica de enzimas antioxidantes, aumento del glutatión y síntesis de proteínas de fase aguda y choque térmico. Sin embargo, la exposición continua al estrés

oxidativo promueve una serie de alteraciones bioquímicas y morfológicas representadas por formación de protuberancias en la membrana celular que consecuentemente pueden alterar la permeabilidad celular y el funcionamiento de la bomba de calcio dependiente de ATP anclada a la membrana lo que genera aumento del calcio citosólico (25-27). El aumento del calcio intracelular activa diferentes enzimas como las endonucleasas que degradan el DNA. La perturbación de la homeostasis involucra otros eventos como la disrupción del citoesqueleto, activación de enzimas degradativas (fosfolipasa A2 y proteasas) y la estimulación de la poli-(ADP-ribosa) polimerasa. Estos eventos son precedentes activadores de las rutas metabólicas que culminan en muerte celular por apoptosis o necrosis. Cuando la lesión afecta el mantenimiento de los programas celulares, la célula opta por la vía apoptótica. La necrosis inicia a nivel citosólico e implica hinchamiento y pérdida de la integridad de la membrana celular, mitocondrial y nuclear con la concomitante dilatación del retículo endoplásmico (28). La apoptosis determina la condensación citoplasmática y nuclear con fragmentación sin ruptura de la membrana celular. La apoptosis inducida por fármacos es irregular mientras que la necrosis es zonal (18, 29).

2.3 Marcadores de lesión hepática

Muy frecuentemente en la práctica clínica se realizan diferentes estudios que reflejan grado de funcionalidad del hígado. Según lo que se quiera conocer, se puede evaluar la excreción de compuestos a través de la medición de bilirrubinas (total, directa e indirecta), la integridad hepatocelular (transaminasas) y síntesis de proteínas (albumina) por mencionar algunos. La evaluación de enzimas es lo más utilizado ya que generalmente se encuentran elevadas en presencia de lesión o enfermedad hepática (29, 30).

2.3.1 Aspartato aminotransferasa (AST)

La AST también llamada transaminasa glutámico pirúvica (GOT) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al cetoglutarato con formación de

glutamato y oxalacetato, éste es reducido a malato en por la malato deshidrogenasa (MDH) y NADH. La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinada espectrofotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de AST en suero. Esta enzima esta presente en el citosol y mitocondria de células hepáticas, corazón, músculo esquelético, cerebro, riñón, páncreas, pulmón, eritrocitos y linfocitos. Los niveles elevados de AST no son tan específicos para daño hepático por esta razón se debe tomar en cuenta otros marcadores como la ALT y ALP en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad (29, 31).

2.3.2 Alanina aminotransferasa (ALT)

La ALT o transaminas glutámico pirúvica (GPT) cataliza la transferencia reversible de un grupo de la alanina al α -cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato. El piruvato producido es reducido a lactato en presencia de lactato deshidrogenasa (LDH). La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de ALT en suero. Se encuentra principalmente en células hepáticas y riñón. La liberación de estas enzimas en el torrente circulatorio no necesariamente es signo de muerte hepatocelular pueden elevarse únicamente como indicador de daño. Se observan niveles elevados en enfermedades hepáticas como la hepatitis, enfermedades de los músculos, y traumatismos (31).

2.3.3 Bilirrubinas

La bilirrubina es formada por la descomposición de los glóbulos rojos (grupo hemo) en el sistema retículo reticuloendotelial. La bilirrubina no conjugada se trasporta del bazo al hígado ligada a albumina, es insoluble en agua por lo tanto no es excretada por medio de la orina. La bilirrubina conjugada puede ser excretada en la orina. Dentro del hígado es conjugada a bilirrubina glucoronido y posteriormente es secretada en la bilis y el intestino respectivamente. En el intestino la flora intestinal la degrada a urobilinógeno, el cuál cierta parte es reabsorbida y es excretada por el riñón a través de la orina o es excretada por el

hígado a través del tracto gastrointestinal. El resto es eliminada por las heces y esto es lo que le da su color característico. Normalmente en el suero se encuentra en forma no conjugada reflejando el balance entre la producción y la excreción hepatobiliaria. La hiperbilirrubinemia es el resultado de un incremento de la bilirrubina en plasma. La bilirrubina total se altera por aumento de la hemólisis, alteraciones genéticas, anemia neonatal, alteraciones eritropoyéticas, presencia de drogas. La bilirrubina directa refleja colestasis hepática, alteraciones genéticas y alteraciones hepáticas (31, 32).

La bilirrubina se convierte en azobilirrubina mediante el ácido sulfanílico diazotado midiéndose fotométricamente.

2.4 Metabolismo hepático de la Tioacetamida

Debido a la gran incidencia de enfermedades hepáticas por el contacto con agentes tóxicos se han diseñado modelos de experimentación los cuales permiten conocer los mecanismos moleculares, bioquímicos y fisiopatológicos por los cuales se desarrolla la lesión hepática. Un modelo muy utilizado es la tioacetamida (TAA) para representar daño agudo y crónico (**Figura 3**). La TAA es considerada un potente hepatotóxico que causa daño a nivel centrilobular, fundamentalmente se metaboliza en el CYP2E1 (33) en dos pasos primero a tioacetamida sulfóxido (TASO) y posteriormente al metabolito tioacetamida disulfóxido (TASO₂) el cual es altamente reactivo y capaz de unirse covalentemente para formar aductos con los ε-residuos de lisina de las proteínas nucleares favoreciendo a aparición de fibrosis, cirrosis y cáncer (34, 35). EL efecto dosis-dependiente por la administración de una dosis de TAA se refleja en el aumento de los niveles de las enzimas Aspartato aminotransferasa (AST), Alanina aminotransferasa (ALT), Bilirrubina total (BILT), Bilirrubina directa (BILD), amoníaco (NH₃), y r-Glutamil transpeptidasa (r-GT), la disminución de los valores de hemoglobina, plaquetas y albumina sérica. También se han observado alteraciones en conteo de células blancas, de las citosinas proinflamatorias TNF-α e IL-6, el aumento de Óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y del Factor nuclear-κβ (NF-κβ). Se especula que el mecanismo de daño es por la activación iNOS y del NF-κβ y eso aumenta los niveles de TNF-α e IL-6 induciendo daño hepático inexorable (36).

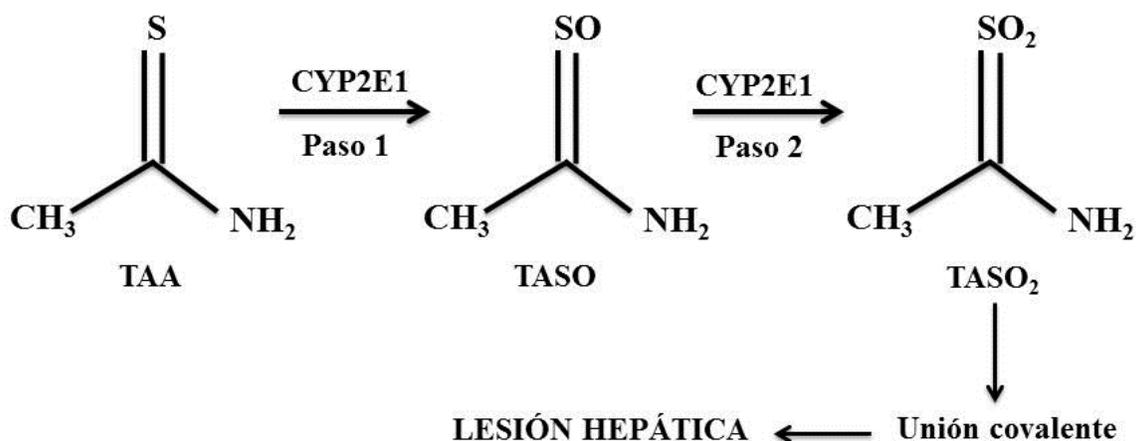


Figura 3. Representación grafica del metabolismo de TAA. El primer paso comprende la transformación de TAA en TASO por acción del CYP2E1, en el segundo paso la molécula de TASO se convierte en el metabolito electrofílico TASO₂ capaz de unirse covalentemente a estructuras subcelulares y generar lesión hepática.

La administración de una dosis subletal de 500 mg/Kg de TAA da lugar a intoxicación aguda manifestada por necrosis perivenosa, en cambio las dosis pequeñas y continuas provocan lesión crónica expuesta como fibrosis, cirrosis y cáncer (37-41). Los desórdenes clínicos, bioquímicos e histológicos en tejido hepático inducidos por intoxicación con TAA han sido profundamente estudiados y son altamente parecidos a la lesión hepática aguda en humanos esto lo hace un modelo confiable para la evaluación de extractos de plantas o compuestos que parezcan detener y/o revertir el daño (42).

2.5 Sistemas de defensa antioxidante

En un sistema biológico, un antioxidante es capaz de reaccionar con radicales libres siendo entonces un terminador de cadena oxidativa. La capacidad antioxidante de una sustancia o molécula se define como la habilidad para inhibir la degradación oxidativa (por ejemplo, lipoperoxidación). La capacidad antioxidante está determinada a su vez por: a) reactividad química del antioxidante asociada a la actividad antiradicalaria o estabilizadora

de radicales libres, b) capacidad para acceder al sitio de reacción y c) estabilidad de los productos formados después del proceso de estabilización de radicales libres (43).

Ante un incesante daño que ejercen los radicales libres en los sistemas vivos la naturaleza ha brindado diferentes fuentes de protección que permiten mediar este daño. Estos sistemas, de acuerdo a su origen, pueden clasificarse como *endógenos* y *exógenos* (**Tabla 1**). Los *sistemas de defensa antioxidante endógeno* consisten en una serie de elementos biológicos que brindan protección ante la producción continua de radicales libres generados por funciones celulares como la respiración y síntesis de ATP a nivel mitocondrial (**Figura 4**); el sistema antioxidante endógeno, a su vez, se divide en *enzimático* y *no enzimático*. El primero lo constituyen las enzimas antioxidantes Superóxido dismutasa, Catalasa, Glutación peroxidasa, glutación reductasa, glutación S-transferasa, entre las más importantes. El segundo lo integran el glutación, la coenzima Q y el ácido tíoico o lipoico. El sistema de defensa antioxidante exógeno se forma por todos los elementos provistos del medio ambiente (alimentos, plantas, etc.) que han sido sometidos a estudios científicos y se les ha identificado actividad antioxidante. Entre los más estudiados se encuentran la vitamina E, vitamina C, β -carotenos y polifenoles (flavonoides y taninos) (44).

Tabla 1. Clasificación de los sistemas antioxidantes de acuerdo a su origen

Exógenos		Endógenos
Vitamina E		Glutación
Vitamina C		Coenzima Q
Flavonoides		Ácido tíoico
β -caroteno	Cofactor	Enzimas
	Licopenos	Catalasa
	Cobre	Superóxido dismutasa
	Zinc	Glutación peroxidasa
	Hierro	Glutación reductasa
	Manganeso	Glutación S-transferasa

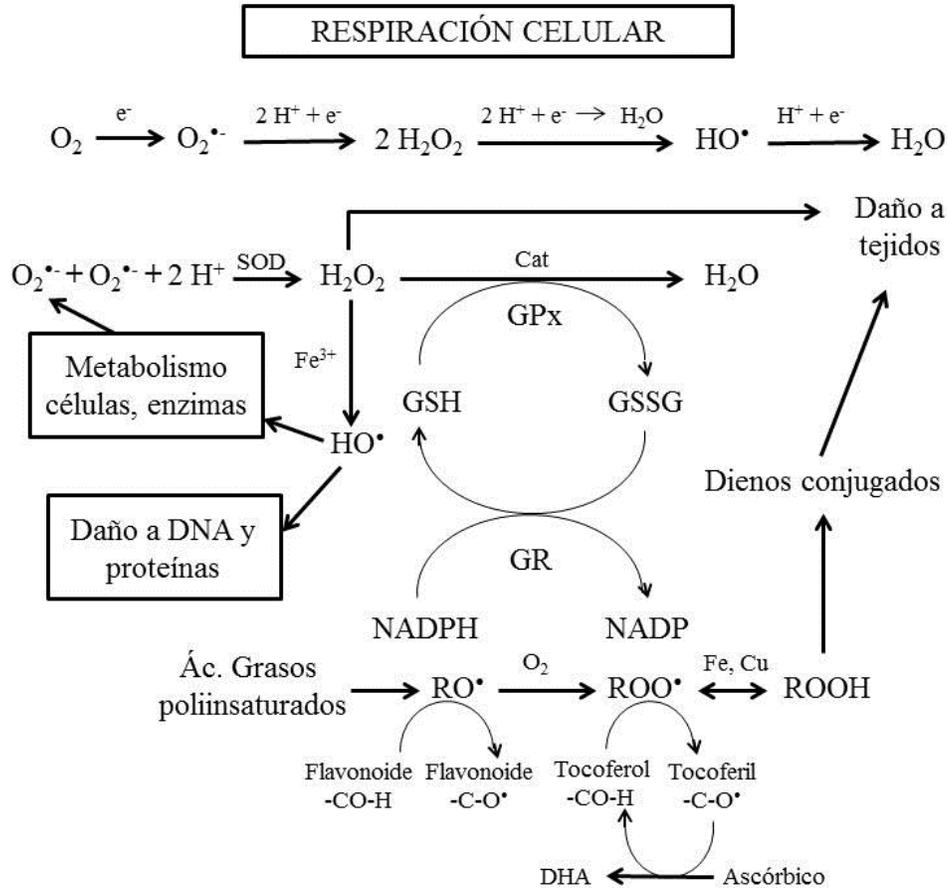


Figura 4. Representación de las principales rutas metabólicas productoras de radicales libres y la intervención de los sistemas antioxidantes endógenos y exógenos. $O_2^{\bullet -}$: radical anión superóxido, HO^{\bullet} : radical hidróxilo, RO^{\bullet} : radical alquilo, ROO^{\bullet} : radical peróxido, $ROOH$: hidroperóxido, Fe: hierro, Cu: cobre, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado, GPx: glutatión peroxidasa, GR: glutatión reductasa, NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato, Cat: catalasa, SOD: Superóxido Dismutasa.

2.5.1 Sistemas de defensa antioxidante endógeno

2.5.1.1 Enzimas antioxidantes

Las enzimas antioxidantes forman parte del sistema de defensa antioxidante endógeno de los organismos y ha surgido a lo largo de la evolución de las especies como mecanismo de protección frente al daño originado ROS. Los sistemas enzimáticos de defensa antioxidante consisten en una serie de enzimas que actúan coordinadamente: las

superóxido dismutasas dependientes de cobre y cinc (Cu,ZnSOD) y manganeso (MnSOD), la catalasa, la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GR), la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y el enzima málico (ME) (45). En la **Figura 5** se muestra la acción y coordinación de estos sistemas y su relación con el ciclo redox del glutatión.

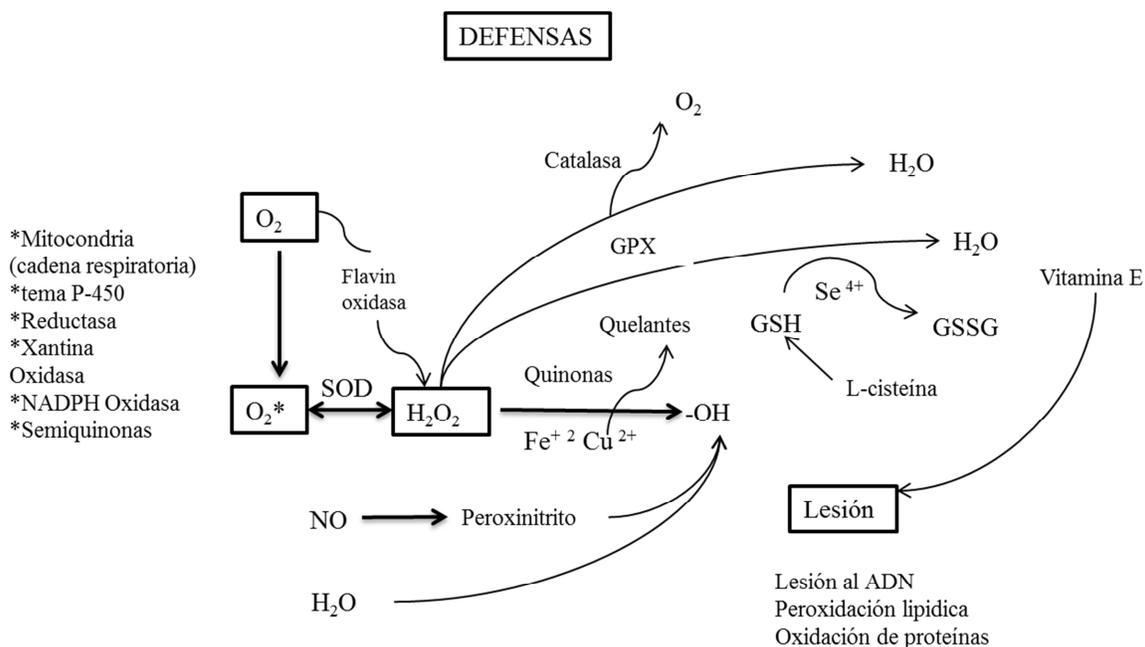


Figura 5. Destoxificación de las especies reactivas de oxígeno por sistemas enzimáticos de defensa antioxidante (SOD, catalasa y GPx). La acción concertada de estos sistemas se encuentra complementada por una serie de antioxidantes no enzimáticos (GSH, L-cisteína y vitamina E).

Superóxido dismutasa. La SOD es un componente muy importante del sistema antioxidante, su función consiste en catalizar la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 en la siguiente reacción:



La familia de las SOD se conforma por las SOD dependiente de Cu y Zn (CuZnSOD) que se encuentra en el citosol de las células eucariotas, la SOD dependiente de

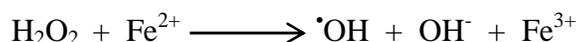
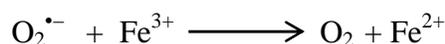
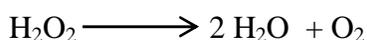
Mn (MnSOD) localizada en la matriz mitocondrial en eucariotas y la SOD dependiente de Fe (SOD) en bacterias aerobias (46).

El $O_2^{\cdot-}$ se forma como producto de la cadena de transporte electrónico en los complejos I y III, es sabido que bajo condiciones normales existe una producción de ROS bien tolerada por la economía celular pero el aumento desmedido de estas especies radicalarias genera estrés oxidativo que provoca daño en diversas estructuras celulares, lipoperoxidación de membranas y daño al DNA lo cual conlleva a envejecimiento prematuro y enfermedades asociadas a éste como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes y carcinogénesis. Recientemente se ha propuesto que la ausencia en la expresión del gen Sirt3 puede alterar la actividad de la MnSOD. La SIRT3 es una proteína que pertenece a las sirtuinas una familia de 7 proteínas desacetilasas dependientes de NAD^+ ; comparten un dominio catalítico de 275 aminoácidos y se encuentran en el núcleo (SIRT1, 6 y 7), mitocondria (SIRT 3, 4 y 5) y citosol (SIRT 2) (47). Además se ha visto que la función mitocondrial está regulada por acetil transferasas y desacetilasas, como las sirtuinas por lo consiguiente están involucradas en la producción de energía y ROS para que la síntesis de ATP coincida con los requerimientos intracelulares (48, 49). De tal manera que siendo la desacetilasa más importante, ha sido propuesto que SIRT3 puede actuar como proteína de mantenimiento que determina el control de las funciones mitocondriales como la regulación de la respiración, aclaramiento metabólico y posiblemente el inicio de una respuesta protectora y/o reparadora (50).

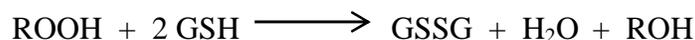
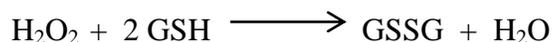
Mutaciones en de la MnSOD están asociadas con aumento de daño por estrés oxidativo, formación de tumores, enfermedades neurológicas y cardiomiopatías (51) esto sugiere que las mutaciones en los genes que codifican proteínas responsables de regular la función de la MnSOD están relacionadas con el desarrollo de enfermedades propias del envejecimiento. Por otra parte, se ha propuesto que SIRT3 protege contra el ataque por ROS al potenciar la actividad del sistema de defensa antioxidante. El gen Sirt3 regula las propiedades enzimáticas de MnSOD ya que disminuye su desacetilación por lo tanto aumenta su actividad, es decir, aumenta la detoxificación del $O_2^{\cdot-}$. También se ha demostrado que la MnSOD interactúa físicamente con Sirt3 porque la lisina 122 es

desacetilada por Sirt3 sugiriendo que al menos la desacetilación de esta lisina en parte regula la función de MnSOD (50, 51).

Catalasa. La Cat cataliza la conversión del H_2O_2 en H_2O . En ausencia de esta enzima el H_2O_2 acumulado reacciona con metales como Fe^{2+} y Cu^{2+} que se encuentran en el medio para producir el radical $\cdot\text{OH}$, este tipo de reacciones se les conoce como Fenton. La catalasa se encuentra en mayor proporción en el peroxisoma (80%) y en menor proporción en el citosol (20%) y está en mayor concentración en hígado, riñón y eritrocitos. Las reacciones en las que participa son las siguientes:



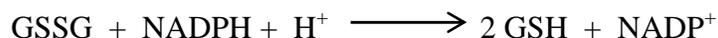
Glutación Peroxidasa. La GPx fue descubierta por Mills en 1957 (52), cataliza la reacción de oxidación del GSH a GSSG a expensas de H_2O_2 o de peróxidos orgánicos. Las reacciones son las siguientes:



En esta familia de proteínas existe la GPx dependiente de Selenio que actúa sobre hidroperóxidos de lípidos y la Gpx no dependiente de Selenio que es dimérica de menor peso molecular y se relaciona con las Glutación S-transferasas porque participa en la eliminación de xenobióticos. Las GPx dependientes de Selenio son tetraméricas y contienen un átomo de selenio en cada monómero de su región catalítica. En el sitio activo de la GPx hay selenocisteína donde el sulfuro de la cisteína ha sido remplazado por selenio. Durante el ciclo catalítico un selenol (proteína- Se^-) reacciona con un peróxido ya sea H_2O_2 , lipoperóxido o LOOH, dando lugar a un ácido selénico (proteína- SeOH). El grupo de ácido selénico reducido nuevamente a selenol por dos GSH los cuales se oxidan a GSSG y LOOH a su correspondiente LOH (53).

Recientemente se ha descubierto una familia de proteínas conocidas como peroxiredoxinas (Prx) y tienen la capacidad de reducir peróxidos directamente, la proteína oxidada que resulta puede ser regenerada por una tiroredoxina (Trx) reductasa (54). Se sabe que por lo menos existen 13 Prxs en las células de los mamíferos y que son inducibles en respuesta al estrés oxidativo y cuando se sobrepresan funcionan como agentes protectores (55). Las Prxs y Trx funcionan en conjunto con las GPx para conservar un nivel adecuado de peróxidos y proteincisteínas reducidas ya que cuando la célula experimenta un aumento del estrés oxidativo de igual manera aumenta el número de proteincisteínas oxidadas lo que induce la inactivación de algunas fosfatasa y factores de transcripción generando desregulación de ciertas reacciones inflamatorias (53).

Glutación Reductasa. La GR fue observada por primera vez por Hopkins y Elliot en 1931, posteriormente fue aislada de hígado de conejo en 1932. Cataliza la reacción de restauración del glutatión en su forma reducida con la presencia de equivalentes reductores de NADPH. La reacción en la que participa es la siguiente:



2.5.1.2 *Glutación*

El glutatión (γ -L-glutamyl-L-cisteinilglicina) es el compuesto tiolico no proteico más cuantioso en las células. El hígado es el órgano donde se encuentra más abundantemente (5-10 mM). Existe en forma reducida (GSH) y oxidada (GSSG) en una proporción de 100 a 1. En las células se haya en tres reservorios en el citosol en un 90%, en la mitocondria en 10% y una pequeña cantidad en el retículo endoplásmico. Se forma básicamente en dos pasos, primero a partir de glutamato y cisteína es producida γ -glutamylcisteína por acción de la γ -glutamylcisteína sintetasa, después la enzima GSH sintetasa utiliza γ -glutamylcisteína y glicina para formar GSH, estas reacciones se llevan a

cabo en presencia de ATP. Se ha descrito previamente a este compuesto como potente antioxidante y agente reductor ya que puede reaccionar con diversas moléculas electrofílicas y oxidantes como H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$ y $\bullet\text{OH}$. Se le ha asociado también con procesos fisiológicos entre los que destaca el metabolismo de xenobióticos, reacciones de intercambio de grupos tiólicos y procesos de señalización en los que está implicado el ciclo celular, proliferación y apoptosis (56). Debido a su poder reactivo el GSH es fácilmente reducido gracias a la presencia de sustancias químicas hepatotóxicas induciendo peroxidación lipídica, desestabilización de estructuras y daño celular.

2.5.1.2.1 Biosíntesis de glutatión

La biosíntesis del glutatión depende de dos factores fundamentales: la biodisponibilidad de cisteína y la presencia de γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -GCS) (**Figura 6**). En principio, la cisteína es un aminoácido no esencial lo que significa que puede ser sintetizado por el organismo a partir de otros aminoácidos como la metionina. La cisteína contiene un grupo tiol que es altamente susceptible de oxidación y se encuentra predominantemente al interior de la célula; en su forma oxidada se convierte en cistina, es decir, un dímero de dos moléculas de cisteína unidas por un puente disulfuro y en esta forma se encuentra fuera de la célula (57, 58). La cisteína se obtiene a partir de metionina en un proceso de transulfuración, descrito inicialmente por Tarver y Schmidt en 1939 (59) el cual consiste en una serie de pasos para convertir homocisteína en cisteína. El primer paso consiste en la formación de S-adenosilmetionina (SAME) a partir de metionina por la metionina adenosil transferasa (MAT) (60). La SAME participa en reacciones de transmetilación y transulfuración pero generalmente la mayor parte se dirige a reacciones de transmetilación. Para formar S-adenosil homocisteína (SAH) la SAME dona su grupo metilo, y a su vez SAH es hidrolizada por la SAH hidrolasa para formar homocisteína (Hyc). Hyc se convierte en cisteína en el hígado uniéndose a serina para formar cisteatona por acción de la cistiatona β -sintetasa (CBS) que requiere vitamina B_6 como cofactor; la cistiatona es metabolizada por cistiatoninasa también dependiente de vitamina B_6 para liberar cisteína y así poder sintetizar GSH.

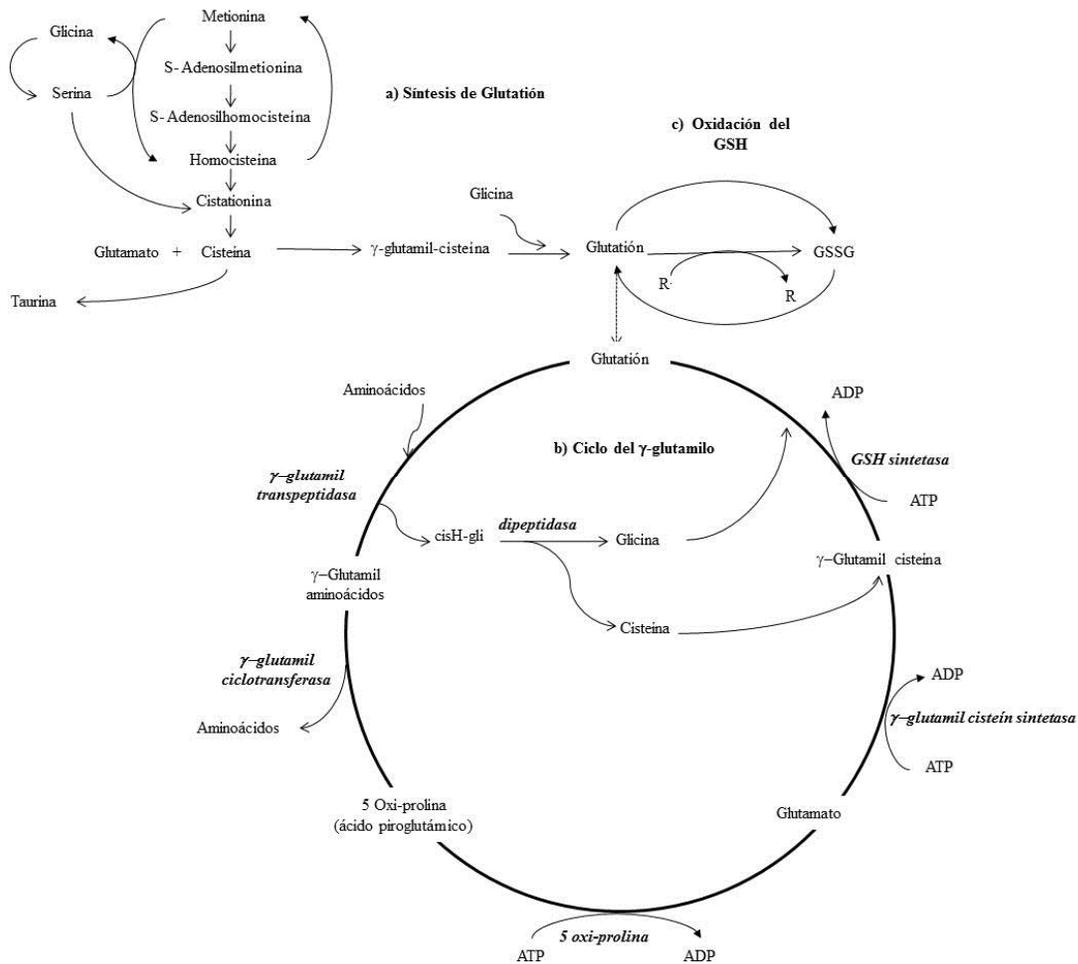


Figura 6. Metabolismo de glutatión en tres pasos: a) Síntesis de glutatión a partir de glutamato, b) Ciclo del γ -glutamilo realizado en seis pasos, funciona como mecanismo de transporte de aminoácidos y gasta tres moléculas de ATP en cada ciclo, y c) Oxidación de GSH a GSSG.

Cuando se detecta baja concentración de SAME la Hcy es remetilada para normalizar los niveles de SAME por las enzimas metil sintetasa (MS) dependiente de vitamina B₁₂ y por la betaína homocisteína metiltransferasa (BHMT) dependiente de betaina, un metabolito de colina. Cuando los niveles están elevados la Hcy es canalizada para la vía de transulfuración.

En pacientes con cirrosis se ha observado alteraciones en el metabolismo de la metionina por anomalías en el funcionamiento de MAT, este mecanismo puede explicar en cierta forma la deficiencia de GSH (58, 60).

Por otro lado, la enzima γ -GCS también llamada glutamato cisteína ligasa (GCL) resulta imprescindible para el proceso de formación de GSH; dicha enzima requiere de Mg^{+2} y Mn^{+2} como cofactores enzimáticos. Así mismo, posee dos subunidades catalíticas una grande o catalizadora (GCLC) y una ligera o modificadora (GCLM) que son codificadas por distintos genes (Yan y Meister, 1990). La GCL es específica para la parte de la cisteína, se encuentra regulada por dos eventos: 1) la inhibición competitiva de retroalimentación no alostérica que está condicionada por el GSH e implica la unión del glutamato a otra región de la enzima, y 2) la biodisponibilidad de su precursor cisteína.

La enzima GSH sintetasa (GS) también está implícita en la génesis del GSH; está conformada por dos subunidades aparentemente iguales y pesa aproximadamente 118 000 Kd. Se ha considerado a la GCL como factor determinante de la velocidad de síntesis de GSH debido a que se ha reportado muy baja concentración de γ -glutamilcisteína en presencia de GS. La sobreexpresión de GS no aumenta la concentración de GSH, en contraste, la sobreexpresión de GCL si lo hace (61, 62).

La GS no se encuentra inhibida por retroalimentación de GSH, no obstante, aunque la GS no esté directamente implicada en la regulación de la síntesis de GSH la deficiencia en humanos de esta enzima puede traer consecuencias graves porque su ausencia favorece la acumulación de γ -glutamilcisteína y en consecuencia es transformada a 5-oxoprolina que altas concentraciones produce acidosis metabólica, daño al sistema nervioso central y anemia hemolítica (63).

2.5.1.2.2 Función antioxidante del Glutati6n

Todos los organismos aerobios est1n sometidos a un cierto tipo de estr3s oxidativo en gran medida por la funci6n mitocondrial en la cadena de transporte electr6nico y fosforilaci6n oxidativa para la producci6n de energa. Los subproductos de estos procesos

son especies altamente reactivas primordialmente el $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 y son capaces de inducir daño celular, es por eso que este compartimento celular está equipado con un arsenal antioxidante en el que se incluye la enzima Superóxido dismutasa (SOD) y el glutatión. Al parecer la función básica del glutatión (GSH) es la de reducir el H_2O_2 producido por el consumo de oxígeno mitocondrial. Aproximadamente el 5% del oxígeno consumido produce H_2O_2 . El GSH juega un papel muy importante en la regulación de la toxicidad por ROS al interrumpir la cadena de reacciones desde la producción del radical $O_2^{\cdot-}$ hasta la formación de radicales $\cdot OH$. Además su presencia es extremadamente importante en la mitocondria debido a que en este compartimento la catalasa está ausente; esta enzima encargada de reducir H_2O_2 está relegada al espacio peroxisómico por lo tanto el GSH es el principal agente reductor de H_2O_2 dentro de la mitocondria (56, 58). Para que el GSH realice su acción reductora necesita de la enzima Glutatión peroxidasa (GPx) y posteriormente el GSSG formado vuelve a ser reducido por la Glutatión reductasa (GR) dependiente de NADPH por acción de G6P deshidrogenasa que a su vez es proporcionado través la vía de las pentosas fosfato (figura). El balance entre GSH y GSSG tiene una gran influencia sobre el balance redox en los grupos tiólicos de las proteínas porque bajo condiciones de estrés oxidativo aumenta el nivel de GSSG lo cual puede aumentar la producción de proteínas con enlaces disulfuro mixto y esto afecta su estabilidad. Por esta razón, resulta importante mantener el índice GSH/GSSG elevado para evitar los eventos que ocurren como consecuencia de la depleción de los grupos tiólicos celulares: peroxidación lipídica, formación de protuberancias en la membrana, alteraciones en el metabolismo del calcio intracelular, entre otros (46).

2.5.1.2.3 *Glutatión y detoxificación de xenobióticos*

Se puede decir que una de las funciones más importantes del GSH consiste en la detoxificación de xenobióticos y de sus metabolitos, estos compuestos son moléculas electrofílicas que forman conjugados con el GSH a través de reacciones catalizadas por GSH-S-transferasas (GST). Las GST son enzimas que suelen unirse a compuestos hidrofóbicos pero también se unen a GSH. Se sabe que son dímeros de 25 kD que catalizan la adición nucleofílica del grupo tiol del GSH hacia aceptores electrofílicos como haluros

acíclicos o alquilados, peróxidos orgánicos, olefinas, ésteres sulfato y quinonas. En mayor medida los sustratos son los productos de la lesión tóxica como los aldehídos, hidroperóxidos, epóxidos, alquenos y 4-hidroxi alquenos que son compuestos citotóxicos generados por peroxidación lipídica de las membranas celulares. Adicionalmente, el colesterol oxidado, los hidroperóxidos del ácido linolénico y araquidónico son sustratos del GSH (46, 58).

Todos estos productos forman conjugados con el GSH para ser eliminados de las células y en el caso de los hepatocitos son eliminados por medio de la bilis. Estos conjugados pueden hidrolizarse liberando primero al γ -glutamato dejando al conjugado de glicina-cisteína, en seguida una peptidasa realiza la escisión en la unión entre glicina y cisteína dando lugar al conjugado de cisteína; este conjugado es metabolizado a mercapturato (Ác. Mercaptúrico) por N-acetilación, o a mercaptano por hidrólisis (β -liasa). El mercaptano puede a su vez formar un tiol-glucurónido por unión al ácido glucurónico o metilarse para formar un compuesto metil-tiólico. El metabolismo de los conjugados de GSH a mercapturato inicia desde el árbol biliar, intestino o riñón pero normalmente la formación del conjugado de N-acetilcisteína ocurre en el riñón (64). La β -liasa del conjugado de cisteína se encuentra en hígado, riñón y en la microflora del intestino y cataliza la hidrólisis del carbono β de la cisteína dando lugar a piruvato, amonio y derivado tiol. La conjugación del GSH irreversible consume GSH intracelular (46, 56).

2.5.2 Sistemas de defensa antioxidante exógeno

Los antioxidantes exógenos están presentes en fármacos y en la dieta incluyendo frutas, verduras, semillas, granos, especias, etc. Fitoquímico es la denominación genérica que reciben los compuestos orgánicos presentes en alimentos y plantas, muchos de ellos poseen un elevado potencial antioxidante. Estos compuestos antioxidantes conforman un heterogéneo grupo de moléculas capaces de capturar radicales libres que producen especies menos dañinas reduciendo el nivel de estrés oxidativo. Los compuestos más estudiados son la vitamina E, vitamina C, algunos minerales como el selenio, cobre, zinc y magnesio, los β -carotenos y los polifenoles entre los que se incluyen los taninos y flavonoides.

2.6 Medicina complementaria alternativa y productos naturales

La medicina complementaria alternativa (CAM) ha sido ampliamente utilizada durante mucho tiempo para el tratamiento de múltiples enfermedades, a pesar de los grandes avances en las ciencias médicas. Se estima que alrededor del 80 % de la población mundial utilizan de alguna forma la CAM (65). La CAM engloba conocimiento empírico y prácticas médicas en las que se hace uso de medicamentos a base plantas, animales, minerales, terapias manuales o ejercicios, solas o en conjunto con el tratamiento de las enfermedades para lograr mejores beneficios a la salud (66).

Después de que en 1928 Alexander Fleming aislara la penicilina (67) inició una gran expansión tanto en el aislamiento de productos naturales como la síntesis de compuestos. Durante 1940 a 1985 el estudio de productos naturales para el desarrollo de fármacos fue una de las herramientas más utilizadas por las compañías farmacéuticas. A principios de la década de 1980 surgió un fuerte interés por su estudio lo que ha influenciado de manera importante la industria farmacéutica en el desarrollo de tecnologías para determinar nuevas estructuras y entidades químicas que se utilizan para la síntesis de fármacos (68). Se ha demostrado que los productos naturales mantienen un importante papel en el descubrimiento de compuestos para el desarrollo de medicamentos para tratar múltiples enfermedades (69). Una investigación documental de 1981 a 2006 mostró que los productos naturales han sido fuente del 5.7 % de los fármacos producidos en esos 25 años. Los derivados de productos naturales generalmente son moléculas químicas semisintetizadas de productos naturales que han aportado el 27.6 % del total (70).

Actualmente, más de 100 nuevos productos como anticancerígenos y antiinfecciosos están siendo desarrollados; muchos de ellos, se prueban con bacterias y levaduras echando mano de innovadoras técnicas de biología molecular favoreciendo la disponibilidad de nuevos compuestos, y a partir de esos estudios, se generan bases de datos virtuales que posteriormente facilitan la investigación de fármacos. De esta manera, se espera que medios más efectivos de estudio y aplicación de productos naturales, optimice el descubrimiento de nuevos fármacos (71). Se ha propuesto que los productos naturales

ofrecen hoy en día potencia y selectividad de sus compuestos como resultado de largos años de evolución. Esto ha permitido que investigadores basen sus estudios en sustancias bioactivas como puntos de referencia y tomen métodos análogos de síntesis orgánica para diseñar modificaciones específicas de ciertas estructuras químicas a fin de crear nuevos agentes terapéuticos (72). Por otra parte, el descubrimiento de estos nuevos productos funciona como una herramienta para comprender de mejor manera las rutas específicas que siguen las enfermedades (73).

2.6.1 Especies con efecto hepatoprotector

Ciertamente un gran número de fármacos son diseñados constantemente para tratar los padecimientos hepáticos debido al enorme número de enfermedades que alteran éste órgano vital. Aún no existe un tratamiento específico pero en algunos países de oriente como China, Malasia e India ancestralmente hacen uso tradicional de diversas plantas medicinales en el tratamiento de las enfermedades hepáticas. Lo más interesante es que en estos lugares la práctica de la CAM no solo está relegada a la utilización informal de dichas especies sino que éstas han sido sometidas a estudios científicos formales para ser analizadas detalladamente y así brindar un sustento probado sobre sus efectos. Eso ha permitido que la CAM sea parte integral de la atención médica en muchos ámbitos de la salud.

A continuación se mencionan algunas de las plantas que han sido investigadas como modelos de protección hepática y los resultados obtenidos (**Tabla 2**).

Tabla 2. Especies con actividad hepatoprotectora

Especie	Compuesto responsable	Resultado
<i>Phyllanthus amarus</i> (74)	Extracto acuoso	Reducción de los niveles de AST, ALT, HTG and TNF- α ; disminución de daño histopatológico en hígado de ratas tratadas con etanol

<i>Fructus Piperis Longi</i> (75)	Extracto etanólico	Reducción de los niveles de AST, ALT, ALP, γ -GT, BILD y BILT en ratas intoxicadas con TAA
<i>Cordia macleodii</i> (76)	Extracto metanólico	Reducción de los niveles de AST, ALT, ALP y BILT en ratas intoxicadas con CCl ₄
<i>Rubus parvifolius</i> L (77)	Extracto n-butanol	Reducción de los niveles de ALT y AST; aumento de la actividad de SOD; menor producción de MDA; reducción de alteraciones histopatológicas en ratas intoxicadas con CCl ₄
<i>Carissa opaca</i> (78)	Extracto metanólico	Aumento de peroxidación lipídica (TBARS) y de la producción de H ₂ O ₂ ; Reducción de los niveles AST, ALT, ALP, LDH y γ -GT; aumento GSH hepático y de la actividad de Cat, POD, SOD, GPx, GR, GST y QR en ratas intoxicadas con CCl ₄
<i>Orthosiphon stamineus</i> (79)	Extracto etanólico	Reducción de los niveles de ALT, AST, ALP y BILT; normalización de valores de albúmina; reducción de MDA; disminución del daño histopatológico en ratas intoxicadas con TAA
<i>Phyllanthus niruri</i> (80)	Extracto metanólico	Reducción de los niveles de ALT, AST, ALP y BILT comparado con silimarina en ratas intoxicadas con TAA
<i>Panus giganteus</i> (42)	Frutos liofilizados	Reducción de los niveles de ALP, ALT, γ -GT y BILT; disminución de MDA, normalización de proteína total; disminución de nódulos hepáticos en ratas intoxicadas con TAA.

ALT: Alanina aminotransferasa; AST: Aspartato aminotransferasa; ALP: Fosfatasa alcalina; γ -GT : Gama-glutamil trasferasa; BILD: Bilirrubina directa; BILT: Bilirrubina total; MDA: Malonaldehído; TBARS: Sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico; SOD: Superóxido dismutasa; Cat: Catalasa; GPx: Glutación peroxidasa; GR: Glutación reductasa; GST: Glutación S-transferasa; GSH: Glutación reducido; POD: Peroxidasa; QR: Quinona

reductasa; TAA: Tioacetamida; CCl₄: Tetracloruro de carbono; H₂O₂: Peróxido de hidrogeno; LDH; Lactato deshidrogenasa; TNF- α : Factor de necrosis tumoral-alfa; HTG: Triglicéridos hepáticos.

2.6.1.1 Especie *Geranium*

Algunas de las especies de *Geranium* que han sido estudiadas desde el punto de vista farmacológico han mostrando actividad biológica: hipotensora, astringente, diurética protección hepática, antioxidante (81), antiinflamatoria (82), y antiviral (83). Es probable que las especies del mismo género que crecen en el Estado de Hidalgo posean actividad biológica y metabolitos similares. En todos los estudios fitoquímicos descritos para estas especies se indica la presencia de compuestos polifenólicos llamados taninos, los cuales se han considerado como compuestos solubles en agua, de peso molecular entre 500 y 30,000 g/mol con propiedades especiales como la habilidad de precipitar alcaloides, gnetina y otras proteínas. Algunos de los usos terapéuticos que se les ha dado a estos compuestos son: antihemorrágicos, antidiarreicos, antisépticos, antioxidantes, cicatrizantes, hipocolesterolémicos, entre otros (84). De los géneros *Phyllanthus*, *Murraya* y *Cochlospermum* se han aislado taninos de los cuales se ha demostrado que presentan actividad antioxidante y hepatoprotectora (81).

Se han descrito en estudios *in vitro* (85) el uso de otras especies, como *Geranium niveum*, en este caso los estudios se han basado en las raíz de esta planta, en la que se ha encontrado importante actividad antioxidante de las proantocianidinas geraninas A y D al funcionar como barreos o limpiadores de algunos radicales libres lo que explica su amplio uso por los indígenas tarahumaras para aliviar enfermedades intestinales y sus síntomas como dolor y fiebre asociados a estrés oxidativo. En *Geranium sibiricum*, otra especie de geranio, se identificaron tres compuestos fenólicos: geraniina, corilagina y ácido gálico, de ellos la geraniina mostró tener el mayor efecto antioxidante pero los tres mostraron inhibir a la xantina oxidasa que es una enzima que cataliza la oxidación de la hipoxantina en xantina y de esta forma participa en la formación de radicales libres; por lo que se ha inferido que *G. sibiricum* es una fuente potencialmente antioxidante y puede ser utilizada en la industria de alimentos saludables (86). A esta misma especie se le ha

identificado actividad antiinflamatoria al inhibir la actividad de Ciclooxygenasa 2 (COX-2) y la expresión de la interleucina 1- β (Il 1- β) (87) A la especie *G. sibricum* también se le ha detectado una glicoproteína de 18 kDa que consiste en una parte hidrocarbonada del 10.45% y una proteica de 59.55% la cuál presentó elevado porcentaje de inhibición de 88.49, 89.34 y 87.08% a concentraciones de 50, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}^{-1}$ en la prueba de DPPH lo cuál indica su elevado poder antioxidante (88).

En *Geranium bellum rose*, una especie nativa del estado de Hidalgo, México, se ha propuesto que los derivados brevifolin carboxilato identificados en esta especie pueden ser utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas gracias al efecto inhibitorio de la enzima triosafosfato isomeraza de *Tripanozoma cruzi* responsable de tal enfermedad (89).

2.6.1.1.1 *Geranium shiedeanum*

Geranium shiedeanum pertenece a la familia *Geraniaceae* de la cual existen ocho especies en el estado de Hidalgo. Su nombre común es “pata de león”, es una hierba perenne, de 15 a 30 cm de longitud; posee hojas anchas de unos 3 cm de ancho, borde partido, flores con pétalos morados de 1.5 cm de largo aproximadamente. La temporada en que florece es entre agosto y octubre (**Figura 7**). Es una planta endémica del Estado de Hidalgo crece en bosques de *Juniperus*, *Quercus* y *Abies* en lugares como Mineral del Monte y Mineral del Chico (90).



Figura 7. Especie *Geranium shiedeanum*.

Se ha descrito su uso terapéutico en la medicina tradicional como antiséptico en heridas y antipirético con la infusión obtenida a partir de la planta ya sea con o sin flores (90).

En la especie *G. shiedeanum* solo se ha realizado un estudio químico y farmacológico en el que se identificaron tres taninos hidrolizables: ácido gálico (1), ácido elágico (2), acetnil geraniina (3) y un flavonoide: 3-O- α -L-arabinofuranosido-7-O- β -D-ramnosido de Kaemferol (4) (**Figura 8**). De ellos la acetnil geraniina se encuentra presente en un 54% por lo tanto es el componente en mayor proporción; además también es la primera vez que se reporta la presencia de un derivado de Kaemperol en este género. En el modelo de hepatotoxicidad inducido por tioacetamida en ratas, el extracto de *G. shiedeanum* se observó la disminución y retraso de la lesión hepática, dicho efecto se cree que es debido a la acción de acetnil geraniina por ser el compuesto mayoritario (91).

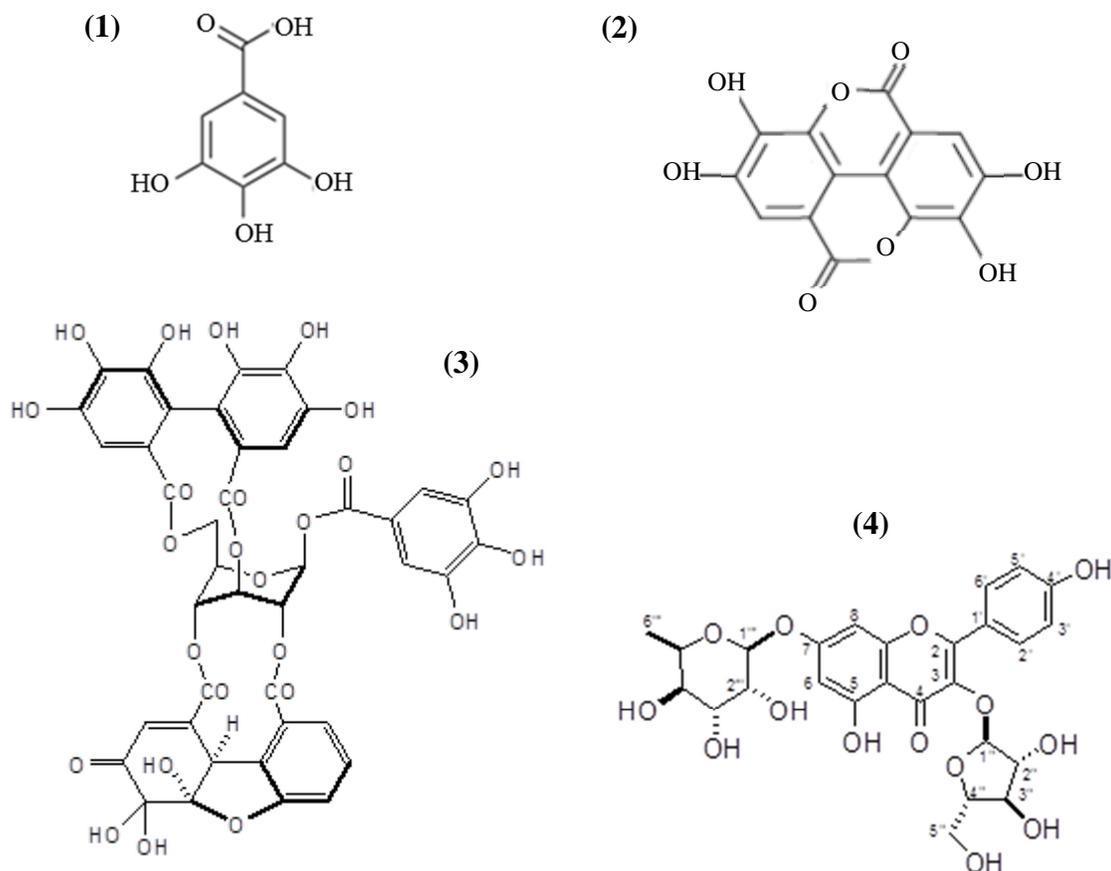


Figura 8. Principales compuestos aislados de *G. shideanum*. (1) ácido gálico, (2) ácido elágico, (3) acetoni geraniina, (4) 3-O- α -L-arabinofuranosido-7-O- β -D-ramnosido de Kaemferol

Uno de los componentes principales en las plantas de *Geranium* es la **geraniina**, aunque también ha sido encontrada en frutos como la granada (92), fue descrita por su descubridor como un tanino cristalizabile. Esta sustancia aislada de *Geranium thunbergi* Sieg. Et Zucc. Por Okuda T. en 1976 (93), ha sido evaluada biológicamente y ha presentado actividad antihipertensiva, inhibe la enzima convertidora de angiotensina (94) y la transcriptasa reversa del RNA de virus tumorales, ha sido propuesta como anticancerígena al reducir el porcentaje de ratones portadores de tumores y el número de tumores por ratón generados por el promotor tumoral 7,12-dimetillbenz(a)antraceno (95). Se le ha atribuido actividad antiviral al inhibir al enterovirus 71 que causa muerte en humanos (96). Geraniina aislada de *Phyllanthus muellerianus* exhibe un efecto estimulante en la producción de

fibroblastos y queratinocitos en células epiteliales, lo que favorece la proliferación celular, formación de la membrana y la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (97). La geraniina obtenida a partir de *Phyllanthus amarus* ha mostrado actividad radioprotectora en las mitocondrias de hígado de rata (98), se le ha encontrado actividad inmunomoduladora (99) y además, es un excelente antioxidante en estudios *in vitro* (100, 101). Se ha comparado también la actividad antioxidante por el método de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) y ORAC (oxygen radical absorbance capacity) de los metabolitos encontrados en orina de ratas de geraniina aislada de *Geranium thunbergii* contra geraniina y corilagina, los resultados indican que los 4 metabolitos probados muestran mayor capacidad antioxidante que los taninos intactos, lo cual sugiere que estos metabolitos brindan protección antioxidante importante dentro del organismo (102)

Los flavonoides entre los que se encuentra el kaemferol y sus derivados son compuestos fenólicos presentes en las plantas y se sabe que sus beneficios a la salud se atribuyen por su capacidad antioxidante lo que se traduce en la habilidad que poseen para atrapar radicales libres (103, 104). Estructuralmente consisten en dos anillos bencénicos A y B unidos por un anillo C heterociclo piranico. Biosintéticamente son de origen mixto, pues el anillo A proviene de la ruta de maloenilcoenzima A, mientras que los anillos B y C provienen de la ruta del ácido shikímico. Por las variantes estructurales que presenta el anillo C se han encontrado más de 5 mil compuestos diferentes que se clasifican en: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, catequinas, antocianinos, isoflavonas, pterocarpanos, rotenoides, chalconas, y auronas entre otros. El kaemferol pertenece al grupo de los flavonoles (105) (**Figura 9**). Su capacidad antioxidante se debe a los grupos hidroxilo, específicamente al 3',4'-OH del anillo B y a la doble ligadura 2, 3- del anillo C. La actividad aumenta con el número de grupos -OH en el anillo A y B. Estos fitoquímicos imparten su actividad al estabilizar diversos grupos de radicales entre ellos el radical hidroxilo (OH), anión superóxido (O_2^-), oxígeno singlete (1O_2), radical alcoxilo (RO), radical peroxilo (ROO), peroxinitrito (ONOO) y también actuando como agentes reductores de los antioxidantes que han sido oxidados (vitamina C y E) (105, 106).

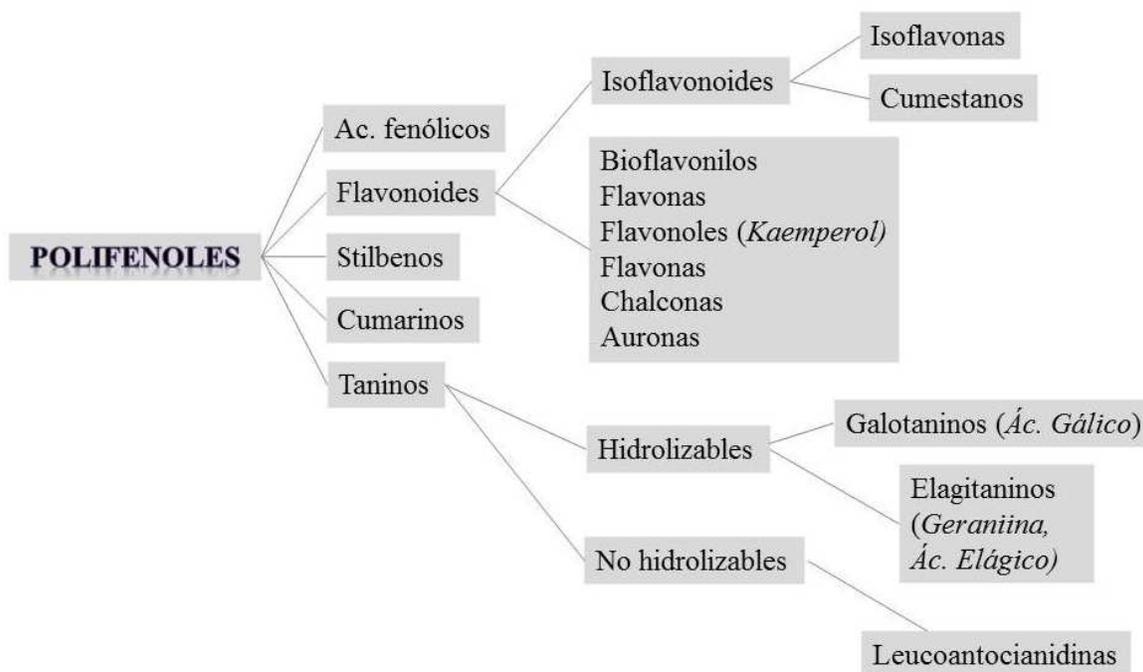


Figura 9. Clasificación de los polifenoles.

Algunas evidencias aseguran que el kaemferol y otros flavonoides son buenos atenuadores del oxígeno singulete formado por la exposición a radiaciones UV y a fotosintetizadores; en los sistemas biológicos está asociado a procesos bioquímicos ocurridos en los neutrófilos (107). El estudio realizado por Morales y colaboradores (108) basado en el análisis de parámetros cinéticos: la constante de velocidad total (k_T) y la constante de velocidad química (k_r) obtenidos por la reacción de algunos flavonoides (morina, quercetina, miricetina, quercitrina, rutina, kaempferol, catequina y epicatequina) con el oxígeno singulete en términos de descriptores globales teóricos de la estructura electrónica y de las funciones de Fukui de átomos condensados apoyan la formación de un exciplex de transferencia de carga en todas las reacciones analizadas. Un exciplex es un complejo formado por la interacción de una entidad molecular excitada con su contrapartida una estructura diferente en su estado fundamental. Sólo 1.5% del exciplex evoluciona para dar productos de reacción, a través de los intermediarios hidroperóxido y endoperóxido producidos por el ataque de oxígeno singulete en el doble enlace de del anillo C de los

flavonoides. Estas evidencias sugieren que los flavonoides son buenos eliminadores del oxígeno singlete y pueden actuar como eficientes antioxidantes en sistemas bajo estrés oxidativo. No obstante, el efecto antioxidante depende de los niveles que alcanzan en la circulación sistémica y en los tejidos, de igual forma influye su metabolismo y biotransformación. La concentración de los flavonoides en el organismo es transitorio por lo que para obtener los efectos deseados es necesario el consumo continuo a partir de una dieta rica en flavonoides.

En un estudio del extracto etanólico de *Bryophyllum pinnatum* se hallaron 7 flavonoides derivados ramnósidos de kaempferol: kaempferitrin (1), kaempferol 3-O- α -L-(2-acetil)ramnopiranosido-7-O- α -L-ramnopiranosido (2), kaempferol 3-O- α -L-(3-acetil)ramnopiranosido-7-O- α -L-ramnopiranosido (3), kaempferol 3-O- α -L-(4-acetil)ramnopiranosido-7-O- α -L-ramnopiranosido (4), kaempferol 3-O- α -D- glucopiranosido-7-O- α -L-ramnopiranosido (5), afzelin (6) y a-ramnoisorobin (7), mismos que muestran una interesante actividad antimicrobiana y antioxidante (109). Además de actividad antioxidante *in vitro*, el kaempferol ha demostrado inhibir el crecimiento tumoral de células epiteliales de pulmón inducidas por el humo de tabaco (110), identificado en el extracto de plantas medicinales como *Crassocephalum crepidioides* se le ha atribuido actividad hepatoprotectora contra el daño por CCl₄ (111) y disminuye eficientemente la oxidación de las LDL tanto en roedores (112) como en humanos (113) suponiendo un efecto cardioprotector.

2.6.1.1.1 Biodisponibilidad y metabolismo de flavonoides

Después del consumo de flavonoides en la dieta la mayoría de ellos son absorbidos en el intestino delgado, por un proceso de hidrólisis gracias a la acción de la lactasa phloridizin hidrolasa que libera la porción aglicona en el borde del cepillo de células epiteliales en el intestino delgado, es decir el flavonoide es separado de los azúcares a los que está unido para ser absorbido. Esta enzima muestra especificidad por flavonoides-O- β -D-glucosidos y la aglicona liberada después puede entrar a las células epiteliales del intestino por difusión pasiva gracias al aumento de su lipofilicidad lo que la hace más afín a

la membrana celular. La β -glucosidasa citosólica es una segunda opción para realizar la hidrólisis dentro de la célula pero para que esto suceda los glucósidos polares deben ser transportados al interior de la célula posiblemente a través del receptor GLUT-1 dependiente de sodio. Antes de pasar a la circulación sistémica las agliconas forman metabolitos con sulfatos, glucurónidos o con grupos metilo por la acción de sulfatasas, UDP-glucuronosiltransferasas y catecol-O-metiltransferasas. Una vez en el torrente circulatorio los metabolitos pueden ser sometidos a reacciones metabólicas de fase II en el hígado y algunos de estos metabolitos pueden ser reciclados por el transporte enterohepático de la bilis al intestino. Los flavonoides no absorbidos en el intestino delgado pueden ser absorbidos en intestino grueso por acción de la microflora colónica que liberarán la porción conjugada y una vez así las agliconas resultantes sufren fisión de su anillo dando lugar a la formación de ácidos fenólicos e hidroxicinamatos los que a su vez, son sometidos a reacciones de fase II en el hígado antes de ser excretados en la orina en cantidades importantes que en la mayoría de los casos, son muy superiores a los que se absorben en intestino delgado (114-116)

2.6.1.1.1.2 *Biodisponibilidad y metabolismo de elagitaninos*

Los estudios realizados con elagitaninos provenientes del jugo de granada en humanos indican que después de la ingesta de 318 mg punicalaginos se encontró ácido elágico en plasma a C_{\max} 60 nM a T_{\max} de 0.98 h, esto indica que la hidrólisis de estos compuestos libera ácido elágico el cual es absorbido directamente en el estómago o en la primer porción del intestino delgado. Los metabolitos encontrados en plasma a las 6 h después de la ingesta son urolitina A, urolitina A-3-O-glucuronido, urolitina B y urolitina B metilada. Después de 12 y hasta 36 h aparecen en la orina los metabolitos urolitina A-3-O-glucuronido, urolitina B-3-O-glucuronido y 3,8-O-ácido dimetil elágico-2-O-glucuronido, esto implica que cuando los elagitaninos alcanzan la parte distal del intestino delgado y el colon son metabolizados por la microflora para convertirlos en urolitinas A y B que junto con el ácido elágico son absorbidos y sometidos a reacciones de fase II por las UDP-glucuronosiltransferasas y catecol-O-metiltransferasas antes de ser eliminados en la orina (117). El estudio con frambuesas rojas indica que la absorción de los elagitaninos

tiene lugar en el intestino delgado y en colon por acción de la microflora; la excreción en orina es alrededor del 1% en relación a la ingesta y se observan como urolitinas O-glucuronido lo que indica que la microflora convierte estos elagitaninos en urolitinas, mientras que los procesos de glucuronidación ocurren en la pared del intestino grueso y/o también después de la absorción cuando llegan al hígado. En este mismo estudio, se reporta también la presencia de ácidos fenólicos en heces producto del metabolismo de antocianinas que son sometidos a reacciones de fase II del metabolismo. Se sugiere que tanto las urolitinas como ácidos fenólicos son los compuestos poseedores del papel protector descrito anteriormente (114, 118).

III. JUSTIFICACIÓN

El hígado es un órgano muy susceptible de daño debido al contacto frecuente que tiene con la mayoría de los agentes tóxicos que ingresan al organismo prueba de ello lo muestran las estadísticas de mortalidad en México según los datos disponibles más recientes de INEGI (2). En el año 2010 las enfermedades del hígado ocuparon la quinta causa de mortalidad a nivel nacional reportando 23 453 muertes en total, mientras que en el estado de Hidalgo fue la cuarta causa con 990 muertes de las cuáles casi 2 terceras partes fueron asociadas al consumo de alcohol; 723 del total de muertes en Hidalgo correspondieron al sexo masculino y el resto 267 al sexo femenino.

A menudo el tratamiento alopático incluye la prescripción de metadotoxina la cual inhibe la peroxidación lipídica de células hepáticas restaurando el daño hepático resultante de la ingesta prolongada del alcohol y reduce el hígado graso en la hepatitis crónica. En enfermedades como encefalopatía hepática, cirrosis, hepatitis crónica e hígado graso se utiliza L-aspartato y L-ornitina aminoácidos que favorecen el ciclo de la urea a través del cual se eliminan normalmente los compuestos nitrogenados. También se ha utilizado carnitina, metionina y vitamina B1 sinérgicamente para el tratamiento de síndrome de fatiga crónica, hiperamonemias, hepatotoxicidad inducida por fármacos antiepilépticos (ácido valproico), insuficiencia hepática, esteatosis, hepatitis tóxica, cirrosis hepática con y sin ascitis, hígado graso en diabéticos etc (119). Recientemente las tendencias en cuanto a prescripción médica se han basado en tratamientos complementarios en los que se prescribe medicamento alopático más algún otro fitofármaco o planta medicinal. Un ejemplo es el tratamiento con silimarina extraída de cardo mariano (*Silybum marianum*), y algunos antioxidantes probados como vitaminas E, C, A y flavonoides.

La CAM es desde hace mucho tiempo una opción en el tratamiento de un gran número de enfermedades, basada en el uso de plantas medicinales resulta ser económicamente accesible. La investigación farmacológica y clínica ha probado la eficacia de ciertos metabolitos aislados de plantas para el tratamiento de muchas enfermedades. El uso común de las plantas medicinales ha aportado conocimiento empírico que ha servido como referencia para estudiar científicamente los principios activos y los mecanismos de

acción que estas plantas poseen en el tratamiento de las enfermedades. En tanto, los estudios etnobotánicos y quimiotaxonómicos han permitido catalogar y registrar un gran número de especies medicinales.

En México se conocen alrededor de 4000 plantas con atributos medicinales (15% del total de especies), de ellas aproximadamente a 250 se les han aislado compuestos activos, es decir, han sido validadas farmacológica y clínicamente. Entre 3500 y 4000 especies son utilizadas por la población y de estas 1500 son utilizadas sin procesa. Algunas de las plantas de uso intesivo reportadas en nuestro país en el tratamiento de enfermedades hepáticas y vías biliares son el Ajenjo (*Artemisa absinthium L.*), Alcahofa (*Cynara scolimus L.*), Diente de León (*Taraxacum officinale L.*), Estafiate (*Artemisa mexicana wild keck*), Marrubio (*Marrubium vulgare L.*) y Romero (*Rosmarinus officinalis L.*) (120, 121). La mayoría de estas plantas se comercializan en casi todos los estados y regiones del país en forma fresca, seca, enteras, en partes (hojas, raíz, tallo), en diversas mezclas que se encuentran en los establecimientos herbolarios de los mercados. Generalmente sus costos son bajos dependiendo de la cantidad y la presentación que se desee. Cabe mencionar que algunos reportes realizados en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) refieren aceptación de la herbolaria en un 83% por parte del personal de salud como parte del tratamiento y alrededor del 90% de los pacientes aceptan su uso frecuente tanto en enfermedades graves como no graves (122). Por el momento en México no existen estudios suficientes que comprueben científicamente los efectos del uso de plantas medicinales en la salud del hígado

El estado de Hidalgo cuenta con una enorme variedad florística y en estas se incluyen las plantas medicinales usadas tradicionalmente en la terapéutica, sin embargo, aunque muchas de ellas han sido identificadas botánica y químicamente aun no se han realizado suficientes estudios fitoquímicos y farmacológicos para determinar su funcionalidad.

Únicamente se ha reportado un estudio previo de *Geranium shiedeanum* en el que se identificaron compuestos importantes como la geraniina, ácido elágico, ácido gálico y 3-O- α -L-arabinofuranosido-7-O- β -D-ramnosido de Kaemferol, además se demostró que el extracto de *G. shiedeanum* produjo un efecto hepatoprotector en un modelo de daño

inducido por tioacetamida (91). Ahora bien, la finalidad de este estudio es comparar la actividad del extracto *vs* los compuestos activos y determinar cuál de estos metabolitos es más activo y capaz de generar el mayor efecto protector ante la lesión hepática inducida por TAA a través de la medición de biomarcadores de daño. De esta manera, se pretende con dicho estudio brindar las bases científicas para proponer una alternativa natural en el tratamiento de las enfermedades hepáticas que resulte ser eficaz y económicamente accesible para la población.

IV. HIPÓTESIS

Los estudios reportados en otras partes del mundo con algunas especies de geranio en la reducción de los marcadores de lesión hepática después de ser tratados con algún tóxico como TAA o CCl₄ han resultado positivos. De ellos se han identificado químicamente sus elementos más abundantes y activos a los que son atribuidos los efectos benéficos, entre estos compuestos destacan, taninos hidrolizables y flavonoides.

Previamente a este trabajo del grupo, se ha detectado actividad hepatoprotectora en ratas que han recibido pretratamiento con el extracto de *G. shiedeanum* mismas que fueron intoxicadas con una dosis subletal de TAA. Sin embargo, aunque se han identificado los compuestos activos más importantes no se había comparado la actividad entre ellos y el extracto. Por otro lado, tampoco se han reportado estudios de inducción enzimática del sistema de defensa antioxidante para valorar si el extracto puede generar cambios a nivel molecular, lo cuál complementa el estudio desde el punto de vista biológico.

Por tanto la hipótesis de este estudio plantea que el extracto *Geranium shiedeanum* y sus principios activos acetoniil geraniina, 3-O- α -L-arabinofuranosido-7-O- β -D-ramnosido de Kaemferol y ácido elágico ejercen un efecto hepatoprotector y promueven la inducción enzimática del sistema de defensa antioxidante endógeno frente al daño inducido por tioacetamida en ratas.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto hepatoprotector antioxidante del extracto de *G. shiedeanum* y de sus principios activos acetnil geraniina y 3-O- α -L-arabinofuranosido-7-O- β -D-ramnosido de kaemferol y ácido elágico en el modelo de daño hepático inducido por tioacetamida (TAA) en ratas a través de la medición de biomarcadores de lesión.

5.2 Objetivos específicos

- 5.2.1 Determinar las concentraciones enzimáticas del sistema de defensa antioxidante endógeno (SDAE) en tejido hepático (SOD, CAT, GPx, GR) por la técnica Western blot para valorar el impacto de la administración del extracto de *G. shiedeanum* sobre la producción de enzimas antioxidantes después de sufrir situación de estrés oxidativo.
- 5.2.2 Determinar el Índice de Reducción (IR) de glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) para evaluar la capacidad de regeneración del GSH inducida por intoxicación con TAA y el efecto del extracto en la regeneración del GSH.
- 5.2.3 Evaluar la capacidad antioxidante del extracto de *G. shiedeanum* a través de la técnica de DPPH.
- 5.2.4 Aislar los metabolitos acetnil geraniina y 3-O- α -L-arabinofuranosido-7-O- β -D-ramnosido de Kaemferol a partir del extracto de *G. shiedeanum*, realizar el tratamiento con el extracto y los principios activos en ratas e inducir lesión hepática con TAA.
- 5.2.5 Diagnosticar la intensidad de la lesión hepática inducida por TAA y la disminución del daño mediante la determinación de parámetros séricos: Aspartato aminotransferasa (AST) Alanino aminotransferasa (ALT) bilirrubina total (BILT) y comparar el efecto en la reducción del daño entre el extracto y los compuestos activos.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Animales y tratamiento con extracto de *Geranium shiedeanum*

En el estudio se utilizaron 10 ratas macho de la cepa Wistar de 10 semanas de edad (237 a 265 g) divididas en 5 grupos. Todas fueron habituadas en cajas de polipropileno y alimentadas con alimento comercial y agua *ad libitum* con ciclos de 12 h de luz y control de temperatura durante una semana. Los grupos 3 y 5 fueron tratados 4 días consecutivos con extracto de *G. shiedeanum* (100mg/Kg) vía intragástrica. Al cuarto día se administró una dosis de 6.6 mmol/Kg de peso de TAA disuelta en 1 ml NaCl (9%) por vía intraperitoneal a los grupos 2 al 5. A las 24 h de la administración de TAA se sacrificaron los grupos 2 y 3, y a las 48 h se sacrificaron los grupos 1, 4 y 5 (**Figura 10**).

Se extrajo el hígado (**Figura 11**), fue cortado en pequeños fragmentos los cuales se envolvieron en papel aluminio dentro de bolsas de plástico y se almacenaron en ultracongelado a -80°C para preservar su integridad. El tratamiento de los animales se realizó de acuerdo a los términos de la NOM-062-ZOO-1999. Especificación para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (123). El manejo de los desechos biológicos fue realizado de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo (124).



Figura 10. Apertura de cavidad abdominal **Figura 11. Extracción del hígado**

6.2 Determinación de enzimas antioxidantes por Western blot

Homogenado y medición de proteínas. Se pesaron 100 mg de cada muestra de hígado se resuspendieron en 1 ml de buffer de lisis y se homogenizó con pistilo de teflón y se agitaron las muestras durante 30 minutos en cámara fría, después se centrifugaron a 13 000 rpm durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante y se midió la concentración de proteínas en una dilución 1:10 es decir 10 μ L más 200 μ L de solución Bradford y se leyó en espectrofotómetro a 620 nm. Después se añadió buffer de lisis hasta obtener una concentración de 1 μ g/ μ L en todas las muestras y se congeló a -20° .

Gel de acrilamida. El gel se hizo con una concentración de 20 μ de proteína en 20 μ L, 3x para dos geles y 2x para 1 gel. Se montó el aparato, se agregó el gel de poliacrilamida hasta 2 cm antes del borde, se rellenó con agua para q solidificara el gel, después se retiró el agua y se agregó la solución de Stachking y se colocaron los peines hasta que solidificara. Se retiraron los peines y se agregaron las muestras en los pocillos y el marcador se colocó la tapa y se programó a 100 voltios por 80-90 minutos en una caja (**Figura 12**). Por otro lado, las membranas de PVDF son activadas durante 1 minuto con metanol y se hace un sándwich con las esponjas y el papel Whatman impregnado de tampón de transferencia dentro de una bandeja. Después sacados los geles se dejaron 5-10 minutos en agitación en tampón de transferencia y de ahí se colocaron el papel Whatman del sándwich, se cerró y se colocó en el soporte del sándwich en la cubeta se cubre con un 1 litro de tampón de transferencia y hielo se programó a 250 vatios constantes durante 240 minutos. Terminada la electroforesis se desconectó y se sacaron los geles y las membranas. Las membranas se sacaron a una cajita y se ponen con 15 ml de leche para bloquear la membrana durante 1 hora en agitación suave. Mientras tanto, los geles se pasan a otras bandejas donde se tiñen durante 10 minutos con una solución de Coomassie y después se destiñen con una solución de 30% de metanol más 10% de ácido acético cada 5 minutos (**Figura 13**).



Figura 12. Electroforesis en gel



Figura 13. Bloqueo de membranas

Después del bloqueo de las membranas se pasó a una cajita con 15 ml de PBS en el que va diluido el anticuerpo primario, se cerró y se dejó en agitación en la nevera durante toda la noche. Después se lavaron las membranas con solución de PBS-TWEEN 1:1000 durante media hora cada 10 minutos; a continuación se agregó el anticuerpo secundario diluido en 15 ml de PBS y se dejó en agitación suave durante 2 horas, se retiró el anticuerpo y se realizaron lavados nuevamente con sol de PBS-TWEEN 1:1000 durante 30 minutos cada 10 minutos. Posteriormente se colocó la solución de ECL-PLUS para el revelado durante un minuto, se pasó a una bolsa de plástico y después se leyó en la cámara oscura, en la cual aparecen las imágenes donde se ven las bandas correspondientes para cada proteína.

6.3 Determinación de glutatión reducido GSH y oxidado GSSG

Homogenizado. En tubo de centrifuga se añadió 100 mg de tejido hepático con 1 ml de tampón fosfato-EDTA 0.005 M (Ácido etilentríaminopentacético) más 10 μ l de HClO₄, se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos a 4°C, se recogió el sobrenadante y se mantuvo en frío hasta su lectura.

Determinación de GSH. Se preparó la solución de o-ftadialdehido (OPT) sonda fluorescente (Sigma-Aldrich) diluida en metanol a 1 mg/ml. En una placa de 96 pocillos se puso en cada pocillo 10 μ l de muestra + 190 μ l de tampón fosfato EDTA, se añadió 20 μ l

de solución OPT, se mezcló e incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos en oscuridad (**Figura 14**). Por último se midió fluorescencia a $\lambda \text{ exc} = 340 \text{ nm}$ y $\lambda \text{ em} = 420 \text{ nm}$



Figura 14. Lectura en placa para la determinación de GSH

Determinación de GSSG. En un tubo eppendorf se colocaron 500 μl de muestra más 200 μl de solución NEM (n-etilmaleimida) (Sigma-Aldrich) 0.04 M y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Por otro lado, en cada pocillo de la placa se pusieron 100 μl de la mezcla anterior (corresponde a 10 μl de la muestra), se añadió 100 μl de solución de NaOH 0.1 N y 20 μl de solución OPT, se mezcló e incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos a oscuridad. Se leyó fluorescencia a $\lambda \text{ exc} = 340 \text{ nm}$ y $\lambda \text{ em} = 420 \text{ nm}$.

Se calculó el índice de reducción (IR): $\text{GSH}/(\text{GSH}+\text{GSSG})$ para cada muestra

6.4 Determinación de actividad antioxidante DPPH

Esta técnica se basa en la capacidad de una sustancia para neutralizar el radical 2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenilo) hidrazyl (DPPH). Se prepararon las soluciones de trabajo. 2 mg de DPPH en 100 ml de Metanol, 5 mg de BHT en 100 ml de metanol y 5 mg de extracto *G. shiedeanum* en 100 ml de metanol. Posteriormente se añadió en una celda de

cuarzo a 1 cm de paso de luz 900 µl de solución DPPH + 100 µl de metanol considerado como el control negativo; se midió Absorbancia a 517 nm en el minuto 0 y hasta los 30 min, con intervalos de medición de 5 minutos. Después se realizó lo mismo con BHT y con el extracto. Las mediciones fueron realizadas por triplicado para cada condición. Se calculó el % de inhibición:

$$\% \text{ de inhibición} = (1 - \text{Absorbancia min 0} / \text{Absorbancia min 30}) * 100$$

6.5 Purificación de los principios activos de *G. shiedeana*

Acetonil geraniina. La purificación de acetonil geraniina realizó por cromatografía en columna y capa fina. Para ello se pasó en columna de vidrio con Sephadex LH-20 15 g del extracto de actenona-agua de *G. shiedeana* en fracciones aproximadamente 300 ml, iniciando con H₂O, H₂O:MeOH y finalizando con MeOH en polaridad decreciente y se obtuvieron 11 fracciones de ellas se identificaron por cromatografía en capa fina las que contenían en mayor proporción el compuesto (**Figura 15**). Después se pasó de nuevo por columna de vidrio de un 1 cm de diámetro por 50 cm de largo con sílica 18 de polaridad inversa con 11 fracciones de volumen 20 ml con polaridad decreciente iniciando con H₂O, H₂O:MeOH y finalizando con MeOH. El compuesto puro se obtuvo en las dos primeras fracciones lo cual se confirmó a través del estudio RMN.



Figura 15. Obtención de acetonil geraniina por cromatografía en columna

3-O- α -L-arabinofuranosido-7-O- β -D-ramnosido de Kaemferol. Se tomaron las fracciones antes obtenidas a partir del extracto de *G. shiedeanum* en las que fue identificado por cromatografía en capa fina. Se hizo cromatografía en columna de vidrio de 1 cm de diámetro con gel de sílice pasando un sistema de elución de cloroformo metanol y agua con volúmenes de 100 ml obteniendo 97 fracciones (**Figura 16**). El flavonoide fue identificado en las fracciones 77 a 97; para purificar el compuesto dichas fracciones se mezclaron y se pasaron de nuevo por columna en gel de sílice con un sistema de Acetato de etilo y metanol en volúmenes de 25 ml obteniendo 76 fracciones en las que el flavonoide puro fue identificado en las fracciones 22 a la 29 lo cual fue comprobado a través del estudio de RMN.

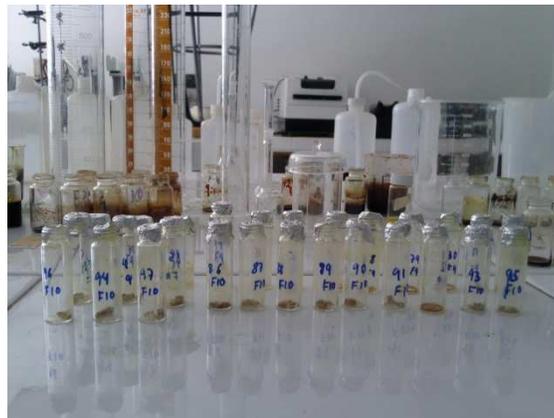


Figura 16. Obtención de *3-O- α -L-arabinofuranosido-7-O- β -D-ramnosido de Kaemferol* por cromatografía en columna

Ácido elágico. Por razones de tiempo y disponibilidad este compuesto fue adquirido comercialmente de la casa Sigma Aldrich.

6.6 Animales y tratamiento con extracto y principios activos de *G. shiedeanum*

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 8 a 10 semanas de edad. Los animales fueron habituados en caja de polipropileno alimentados con alimento comercial y agua *ad libitum* con ciclos de 12 hrs de luz y control de temperatura. Los animales fueron

divididos en 6 grupos: 1) Control, 2) TAA, 3) Extracto+TAA, 4) Geraniina+TAA, 5) Kaemferol+TAA y 6) Ácido elágico. El grupo 1 no recibió ningún tipo de tratamiento, el 2 recibió una dosis única de TAA (6.6 Mmol/Kg) vía intraperitoneal, los grupos 3, 4, y 6 recibieron un pretratamiento de 4 días con extracto de *G. shiedeanum*, geraniina, kaemferol y ácido elágico respectivamente (100, 25, 2.5 y 12.5 mg/Kg) vía intragástrica y en el cuarto día fueron administradas con dosis única de TAA (6.6 Mmol/Kg) vía intraperitoneal (**Tabla 3**).

Tabla 3. Plan de tratamiento del extracto y compuestos de *G. shiedeanum*

Grupo	Administración	Dosis
Grupo 1 Control	-	-
Grupo 2	TAA [*]	6.6 mmol/Kg+ NaCl (0.9%)
Grupo 3	TAA + Ext ^{**}	100 mg/Kg
Grupo 4	TAA+AG ^{**}	6.6 mmol/Kg+ 25 mg/Kg
Grupo 5	TAA+K ^{***}	6.6 mmol/Kg+ 2.5 mg/Kg
Grupo 6	TAA+ AE ^{****}	6.6 mmol/Kg+ 12.5 mg/Kg

TAA^{*}: Tioacetamida

Ext^{**}: Extracto

AG^{**}: Acetonil geraniina

K^{***}: 3-O- α -L-arabinofuranosido-7-O- β -
D-ramnosido de Kaemferol

AE^{****}: Acido Elágico

Todos los animales fueron sacrificados a las 24 h, se hizo apertura de cavidad abdominal y se obtuvieron muestras de sangre portal (**Figura 17**) en tubos heparinizados que se centrifugaron a 4 000 rpm por 15 minutos a 16° C para obtener el suero en tubos eppendof los cuales se almacenaron en ultracongelado a -80 °C. Adicionalmente, se extrajo el hígado que fue cortado en pequeños fragmentos y se envolvieron en papel aluminio

dentro de bolsas de plástico para ser almacenados en ultracongelado a -80°C para preservar su integridad. El tratamiento de los animales se realizó de acuerdo a los términos de la NOM-062-ZOO-1999. Especificación para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (123). El manejo de los desechos biológicos fue realizado de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo (124).



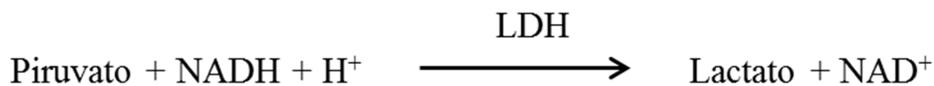
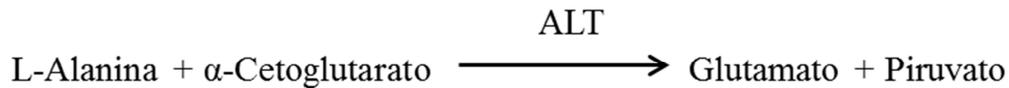
Figura 17. Apertura de cavidad abdominal y obtención de sangre portal

6.7 Determinación en suero de Alanina aminotransferasa

La determinación cuantitativa de la enzima ALT se realizó con el kit GTP (ALT)-LQ de SPINREACT. Se añadió en celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz 1 ml de reactivo de trabajo (RT) preparado previamente de acuerdo a las condiciones del fabricante con 100 μl de muestra, se mezcló e incubó por 1 minuto a 25°C , se leyó la Absorbancia (A) inicial de la muestra en espectrofotómetro a 340 nm y a cada minuto durante 3 minutos. Se midió la disminución de la absorbancia producida por la oxidación de NADH a NAD^{+} en la reacción acoplada de reducción de piruvato a lactato, catalizada por lactato deshidrogenasa (**Esquema 1**). Se calculó el promedio del incremento de Absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$) con la siguiente formula:

$$\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{U/L de ALT}$$

Unidades: La unidad Internacional (UI) es la cantidad de enzima que convierte 1 μmol de sustrato por minuto en condiciones estándar. La concentración se expresa en unidades por litro (U/L). Se obtuvieron medidas por triplicado de cada muestra.



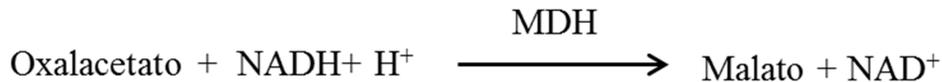
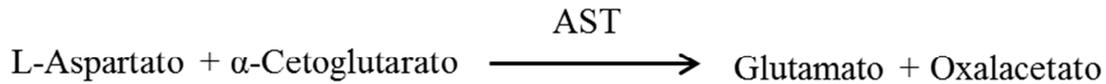
Esquema 1. La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinada fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de ALT en la muestra.

6.8 Aspartato aminotransferasa

La determinación cuantitativa de la enzima ALT se realizó con el kit GOT (AST)-LQ de SPINREACT. Se añadió en celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz 1 ml de reactivo de trabajo (RT) preparado previamente de acuerdo a las condiciones del fabricante con 100 μl de muestra, se mezcló e incubó por 1 minuto a 25° C, se leyó la Absorbancia (A) inicial de la muestra en espectrofotómetro a 340 nm y a cada minuto durante 3 minutos. Se midió la disminución de la absorbancia producida por la oxidación de NADH a NAD^+ en la reacción acoplada de reducción de oxalacetato a malato, catalizada por malato deshidrogenasa (**Esquema 2**). Se calculó el promedio del incremento de Absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$) con la siguiente fórmula:

$$\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{U/L de ALT}$$

Unidades: La unidad Internacional (UI) es la cantidad de enzima que convierte 1 μmol de sustrato por minuto en condiciones estándar. La concentración se expresa en unidades por litro (U/L). Se obtuvieron medidas por triplicado de cada muestra.



Esquema 2. La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinada fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de AST en la muestra.

6.9 Determinación en suero de Bilirrubina total

La determinación cuantitativa de BILT se realizó con el kit BILIRRUBIN T-DMSO de SPINREACT. Se agregó en una celda de cuarzo de 1 cm del paso de luz 1.5 ml del reactivo R1 (ác. sulfanílico 30 mmol/L; HCl 50 mmol/L; DMSO mol/L) más 50 μl del reactivo R2 (Sodio nitrito 229 mmol/L) y 100 μL de la muestra de suero. Para el blanco solo se agregó en la cubeta el R1 y la muestra. Se mezcló e incubó 5 minutos a 25°C y se leyó la absorbancia (A) a 555 nm en espectrofotómetro. El método se basa en la conversión de la bilirrubina en azobilirrubina mediante el ácido sulfanílico diazotado midiéndose fotométricamente. De las dos fracciones presentes en suero, bilirrubin-glucurónido y bilirrubina libre ligada a albumina, solo la primera reacciona en medio acuoso (bilirrubina directa precisando la segunda la solubilización con DMSO para que reacciones (bilirrubina indirecta). En la determinación de la bilirrubina indirecta, también se determina la directa, correspondiendo el resultado a la bilirrubina total. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de bilirrubina presente en la muestra (125, 126).

Se calculó el valor de BILT con la siguiente formula:

$$(\text{A}) \text{ Muestra} - (\text{A}) \text{ Blanco} \times \text{Factor teórico (19.1)} = \text{mg/dL de bilirrubina en la muestra}$$

El manejo de los residuos peligrosos biológico infecciosos (RPBI) se realizó de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 (124).

6.10 Análisis estadístico

Los datos fueron expresados en la media \pm desviación estándar (\pm SD) sometidos a análisis de varianza (ANOVA de una vía) en cuatro animales para cada condición en un número variable de experimentos especificados en cada caso. El análisis para evaluar diferencias significativas entre grupos se realizó con la prueba de Tukey. Se consideró diferencias significativas a valor $p < 0.05$.

VII. RESULTADOS

Es de gran importancia que el uso correcto de plantas como parte de la CAM esté fundamentado en estudios fitoquímicos y biológicos que permitan explicar los fenómenos de interacción ente los compuestos de las plantas y las respuestas fisiológicas en los sistemas vivos. Por ello, el estudio de la especie *G. shiedeana* en esta investigación se llevó a cabo en dos partes, la primera abarcó la evaluación del extracto sobre algunos parámetros de daño como respuesta del hígado frente a un agente de toxicidad conocida (Tioacetamida) incluidos el efecto sobre las concentraciones de enzimas antioxidantes, el índice de reducción de glutatión reducido sobre el óxidado (IR GSH/GSSG) en tejido hepático y el ensayo de actividad antioxidante por el método DPPH. La segunda parte contempla la extracción de los principios activos del extracto de *G. shiedeana* (acetoniil geraniina y 3-O- α -L-arabinofuranosido-7-O- β -D-ramnosido de Kaemferol) y la evaluación del efecto hepatoprotector del extracto y los principios activos sobre los marcadores de lesión Alanina aminotransferasa, Aspartato aminotransferasa y bilirrubina total con la finalidad de valorar el grado de protección y comparar la eficacia entre los compuestos y el extracto. En ambas partes de la investigación se obtuvieron resultados muy fructíferos en relación a los objetivos planteados.

7.1 Efecto del pretratamiento con extracto de G. shiedeana sobre los niveles de enzimas del sistema antioxidante endógeno en hígado de ratas después de la intoxicación con TAA

La evaluación sobre los niveles de enzimas del sistema antioxidante en homogenados de hígados de ratas mediante el análisis por Western blot mostró un daño evidente por intoxicación con una dosis subletal de TAA (6.6 mmol/Kg) al observarse alteraciones en los niveles de estas proteínas en las muestras obtenidas a las 0, 24 y 48 h. Los resultados están expresados en relación a la presencia de β -actina la cuál se utilizó como control de medición de los niveles de enzimas y fue tomada como punto de referencia.

7.1.1 Catalasa

Después de la intoxicación con TAA no se observó inmediatamente un cambio significativo en los niveles de Cat, sin embargo, pasadas las primeras 24 h se mostró disminución importante de la enzima en el grupo administrado únicamente con el hepatotóxico, en tanto, el grupo que recibió el pretratamiento con extracto aumentó los niveles de Cat y aunque no se alcanzó el nivel que presentaron los controles este resultado se mantuvo a las 48 h pero con un ligero aumento en el grupo del extracto (**Figura 18**).

7.1.2 Superóxido Dismutasa

Los niveles de SOD a las 0 h después de la intoxicación con TAA fueron estables en ambos grupos, a las 24 h el grupo tratado con el tóxico experimentó un aumento no tan significativo, en cambio el grupo pretratado con el extracto aumentó significativamente muy por encima de los valores de los controles. A las 48 h el nivel de SOD disminuyó por debajo de los niveles basales y también se apreció leve disminución en el grupo con el extracto pero aún así los valores se mantuvieron muy por encima de los controles (**Figura 19**).

7.1.3 Glutación Peroxidasa

Los niveles de GPx a las 0 h se mantuvieron estables después de la administración de TAA, hacia las 24 h el grupo intoxicado con TAA mostró una leve reducción y aumento significativamente diferente de los valores encontrados con respecto a los controles. Posteriormente, a las 48 h se mantuvieron estables los valores en el grupo administrado con TAA, en tanto que el grupo del extracto incrementó 2.3 veces los niveles de GPx comparado con los controles (**Figura 20**).

7.1.4 Glutación reductasa

Se expresaron niveles basales elevados de GR a las 0 h de la intoxicación con TAA, después de las primeras 24 h se percibió el descenso significativo de los valores de GR y el grupo que recibió el extracto experimentó un aumento. En seguida, hacia las 48 h se notó mayor reducción de los valores pero el aumento en el grupo pretratado con el extracto fue notablemente mayor, aunque no se alcanzó los niveles de los controles (**Figura 21**).

Catalasa

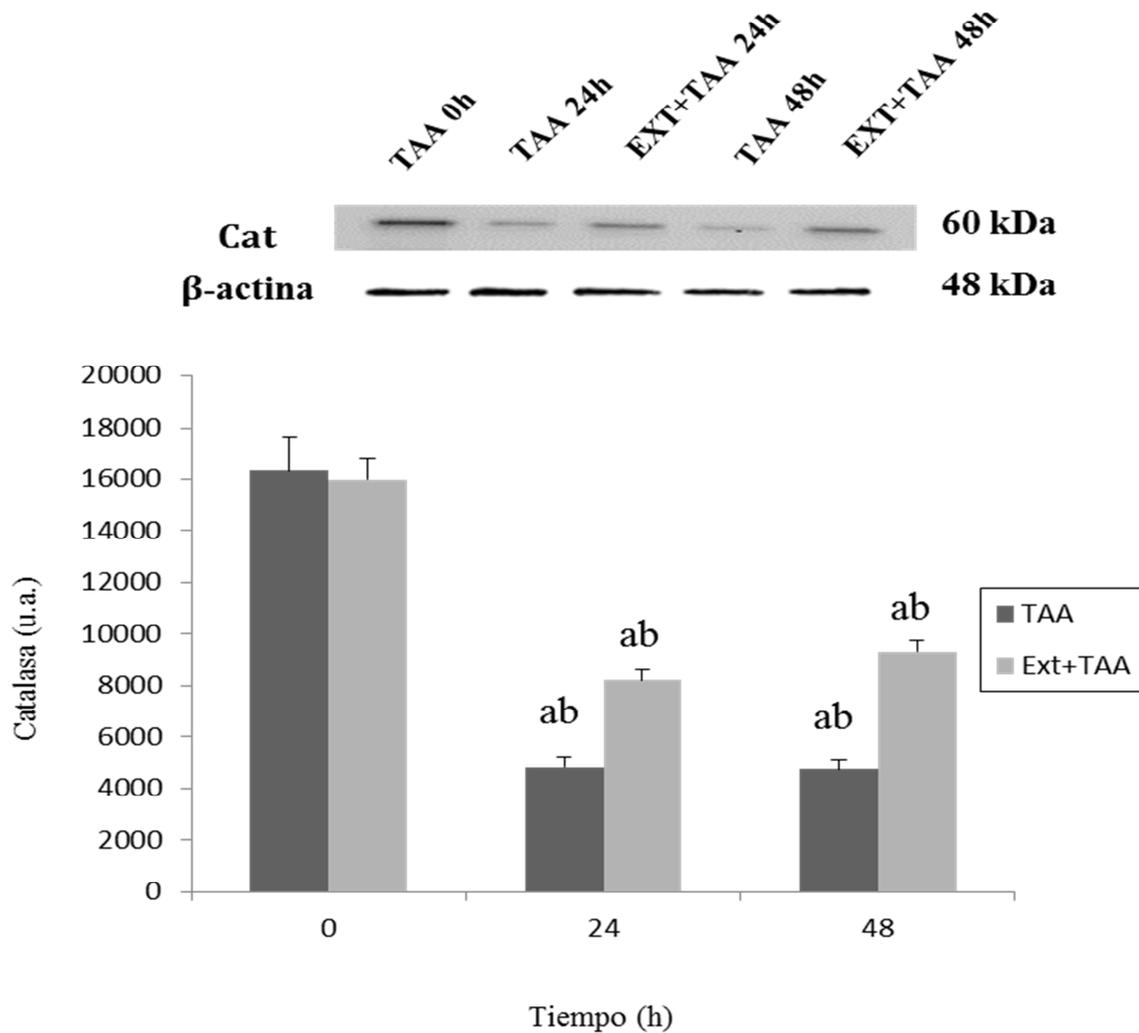


Figura 18. Efecto del pretratamiento con extracto de *G. shiideanum* en los niveles de Catalasa (Cat) analizados por Western blot en homogenados de hígado de ratas intoxicadas con una dosis subletal de tioacetamida (TAA). Las muestras fueron obtenidas a las 0, 24, 48 h después de administrada la TAA. Los resultados expresados en unidades arbitrarias (u.a.) fueron la media \pm SD de los valores obtenidos por duplicado en homogenados de hígados de 4 animales diferentes para cada condición. Las diferencias frente a los respectivos controles están representadas como (a) y las diferencias debidas al extracto como (b) $p < 0.05$

Superóxido Dismutasa

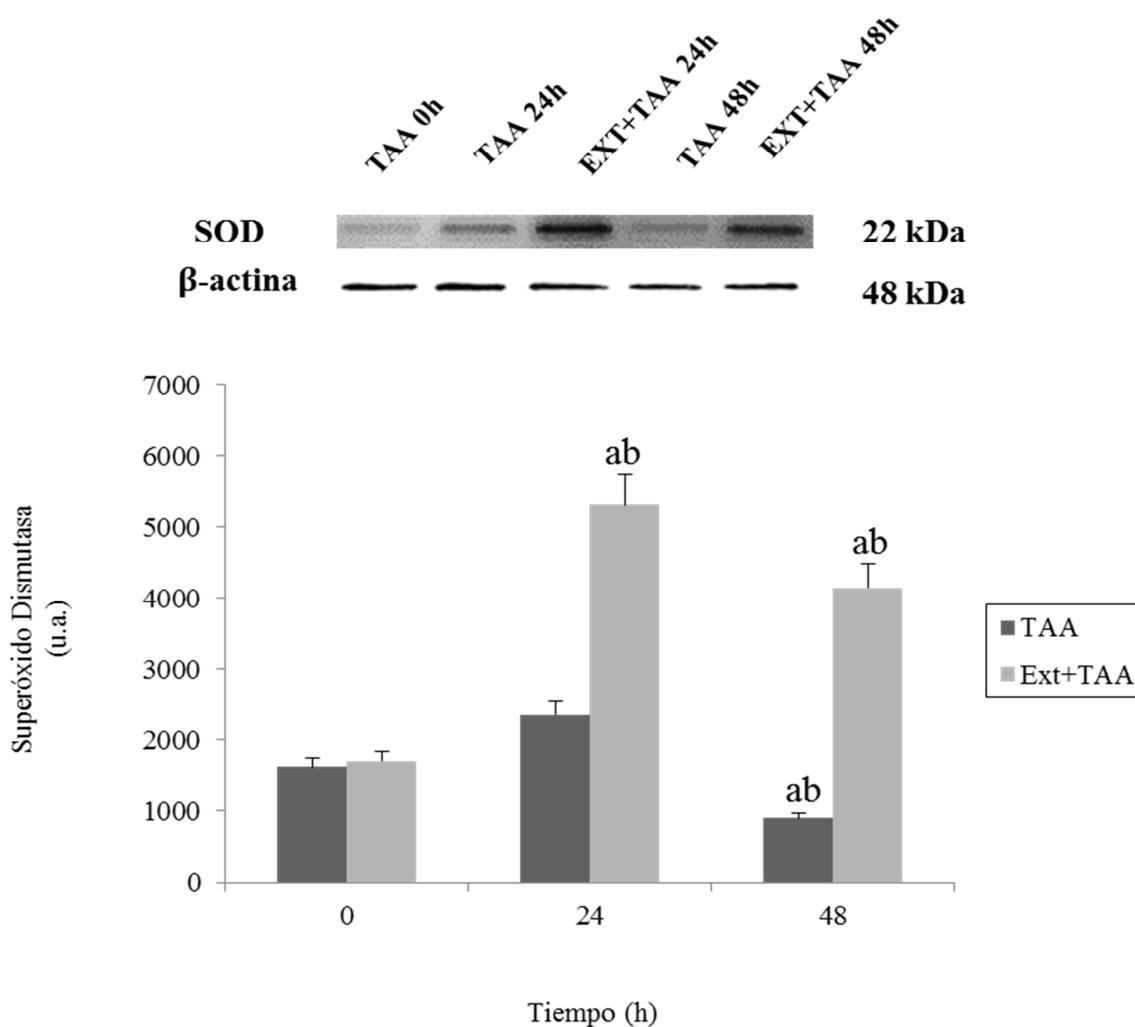


Figura 19. Efecto del pretratamiento con extracto de *G. shiideanum* en los niveles de Superóxido Dismutasa (SOD) analizados por Western blot en homogenados de hígado de ratas intoxicadas con una dosis subletal de tioacetamida (TAA). Las muestras fueron obtenidas a las 0, 24, 48 h después de administrada la TAA. Los resultados expresados en unidades arbitrarias (u.a.) fueron la media \pm SD de los valores obtenidos por duplicado en homogenados de hígados de 4 animales diferentes para cada condición. Las diferencias frente a los respectivos controles están representadas como (a) y las diferencias debidas al extracto como (b) $p < 0.05$.

Glutación Peroxidasa

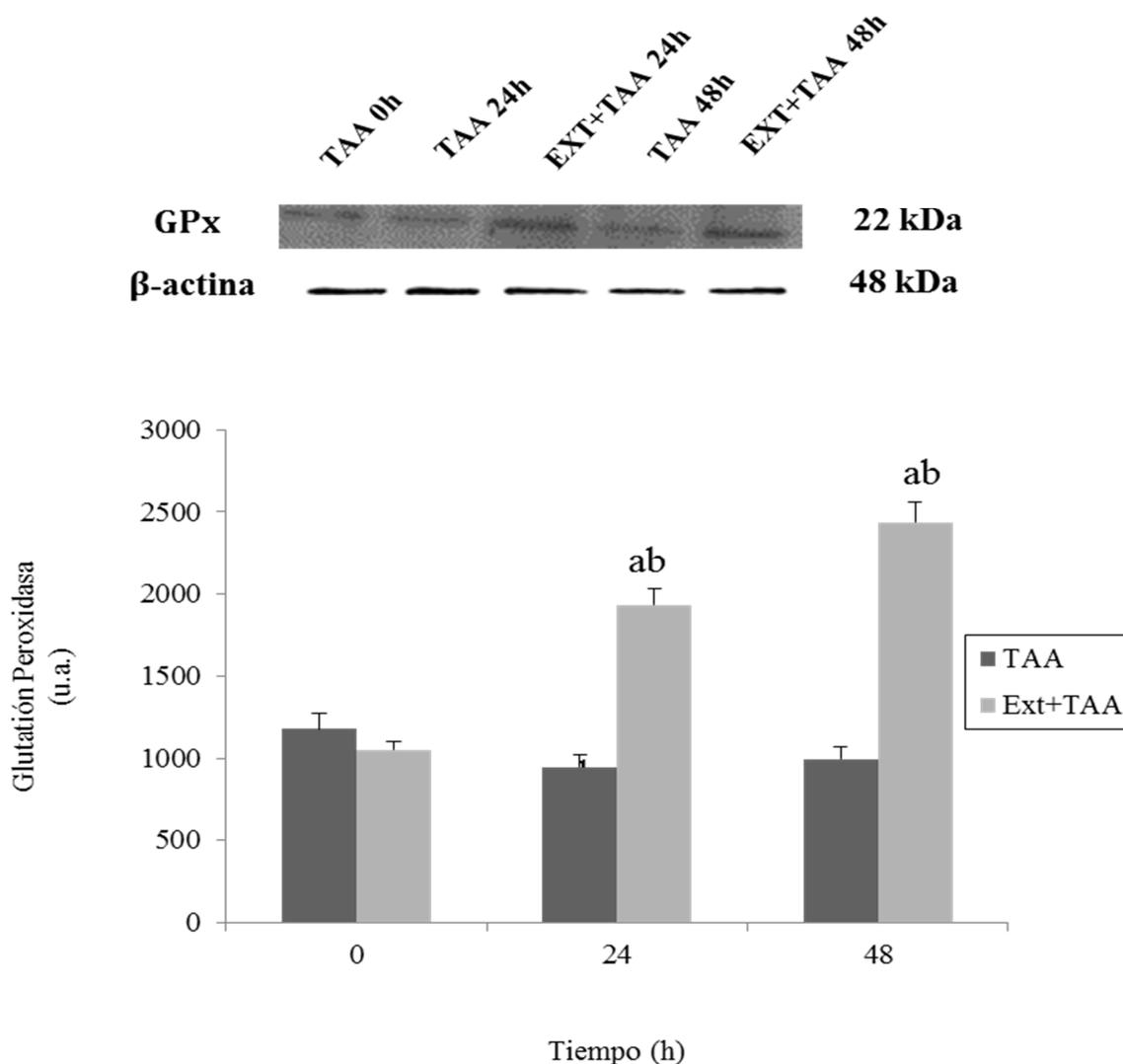


Figura 20. Efecto del pretratamiento con extracto de *G. shiideanum* en los niveles de Glutación Peroxidasa (GPx) analizados por Western blot en homogenados de hígado de ratas intoxicadas con una dosis subletal de tioacetamida (TAA). Las muestras fueron obtenidas a las 0, 24, 48 h después de administrada la TAA. Los resultados expresados en unidades arbitrarias (u.a.) fueron la media \pm SD de los valores obtenidos por duplicado en homogenados de hígados de 4 animales diferentes para cada condición. Las diferencias frente a los respectivos controles están representadas como (a) y las diferencias debidas al extracto como (b) $p < 0.05$

Glutación Reductasa

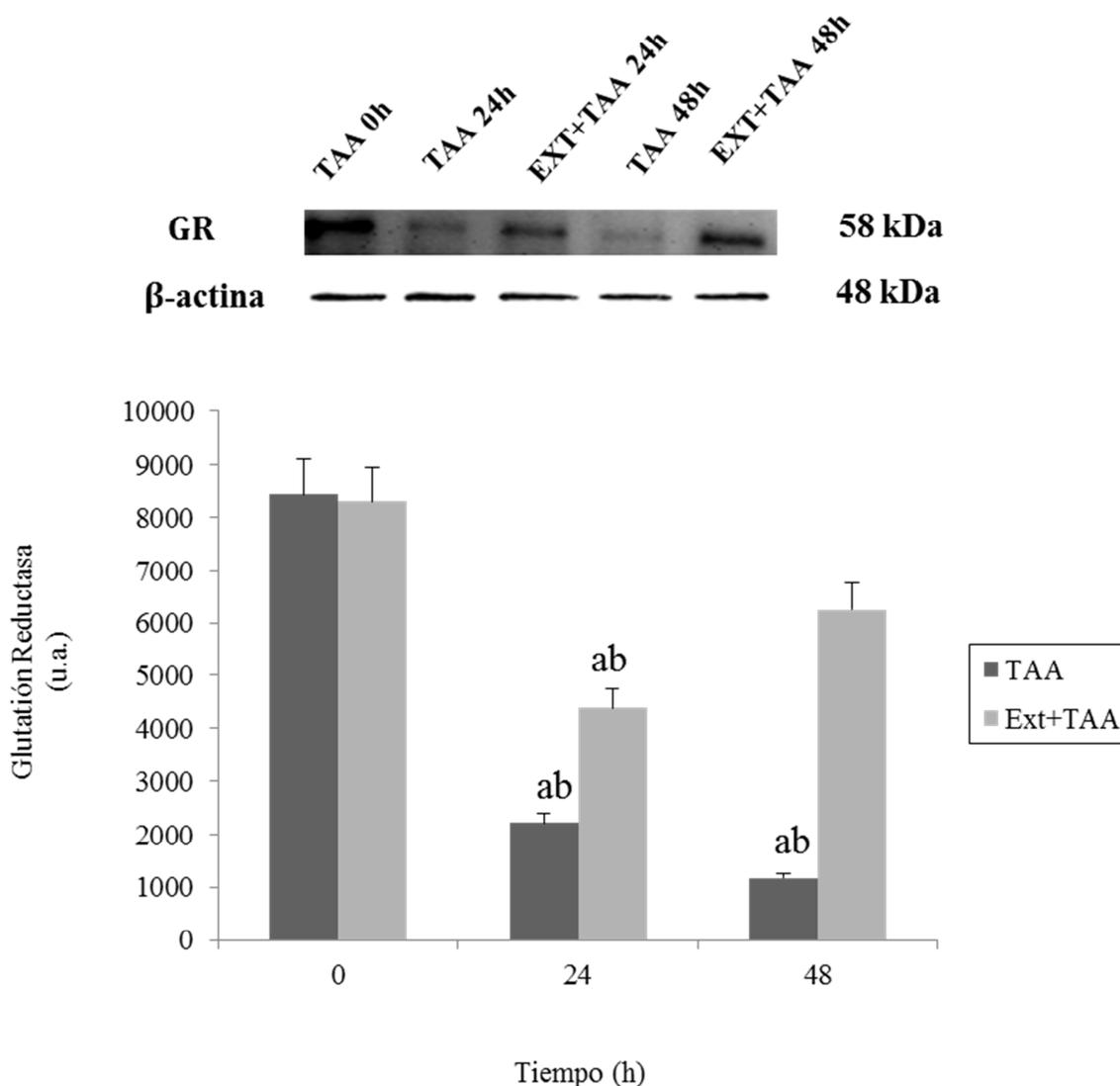


Figura 21. Efecto del pretratamiento con extracto de *G. shiideanum* en los niveles de Glutación Reductasa (GR) analizados por Western blot en homogenados de hígado de ratas intoxicadas con una dosis subletal de tioacetamida (TAA). Las muestras fueron obtenidas a las 0, 24, 48 h después de administrada la TAA. Los resultados expresados en unidades arbitrarias (u.a.) fueron la media \pm SD de los valores obtenidos por duplicado en homogenados de hígados de 4 animales diferentes para cada condición. Las diferencias frente a los respectivos controles están representadas como (a) y las diferencias debidas al extracto como (b) $p < 0.05$.

7.2 Efecto del pretratamiento con el extracto de *G. shiadenum* sobre el índice de reducción (IR) GSH/GSSG en ratas intoxicadas con TAA

El efecto del pretratamiento con el extracto de *G. shiadeanum* sobre el IR GSH/GSSG analizado por emisión de fluorescencia expuso reducción en la concentración de GSH y consecuente aumento de GSSG en el grupo que recibió únicamente la dosis subletal de TAA a las 24 h como muestra de la situación de estrés por los procesos de biotransformación del tóxico, en cambio el grupo tratado con el extracto experimentó un incremento incluso por arriba de los niveles encontrados en los controles, no obstante, dicha situación no se mantuvo a las 48 h porque el IR GSH/GSSG disminuyó en ambos grupos (**Figura 22**).

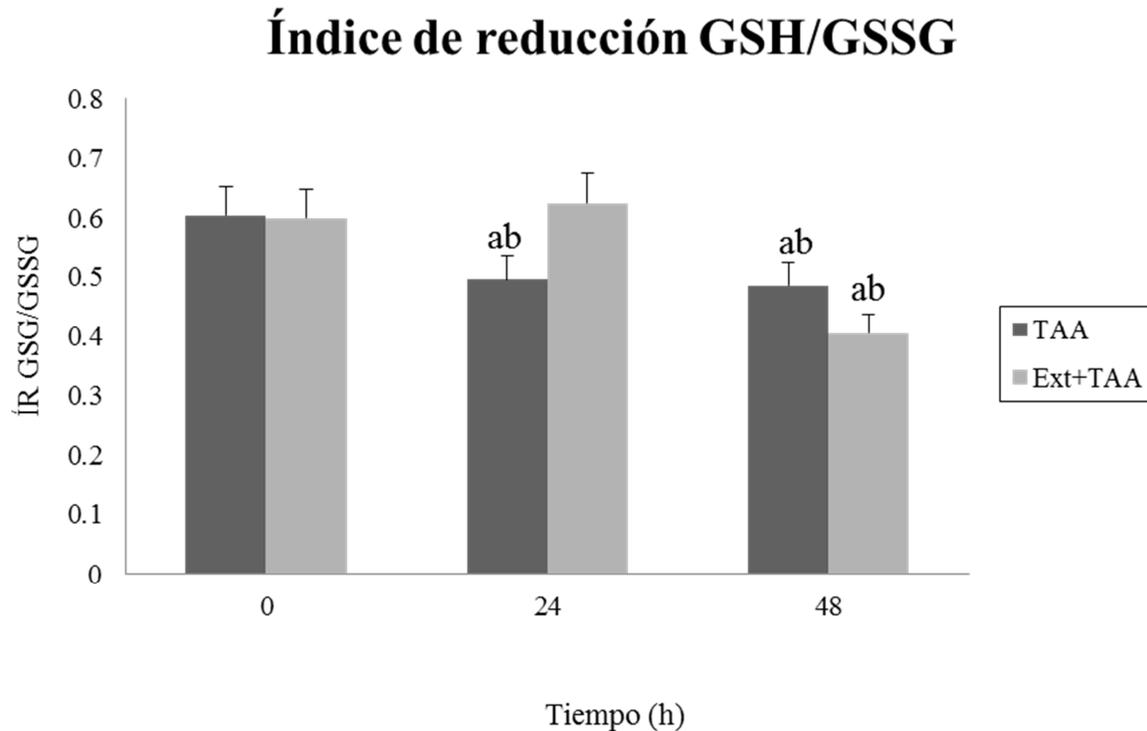


Figura 22. Efecto del pretratamiento con extracto de *G. shiideanum* en los niveles de en el índice de reducción (IR) Glutación reducido/oxidado (GSH/GSSG) analizados por a través de la medición de fluorescencia en homogenados de hígado de ratas intoxicadas con una dosis subletal de tioacetamida (TAA). Las muestras fueron obtenidas a las 0, 24, 48 h después de administrada la TAA. Los resultados expresados fueron la media \pm SD de los valores obtenidos por duplicado en homogenados de hígados de 4 animales diferentes para cada condición. Las diferencias frente a los respectivos controles están representadas como (a) y las diferencias debidas al extracto como (b) $p < 0.05$.

7.3 Evaluación de la capacidad antioxidante del extracto de G. shiedeanum por el método DPPH

Se determinó la capacidad antioxidante del extracto de *G. shiedeanum* a través del índice de inhibición del radical DPPH. Los resultados muestran que el porcentaje de inhibición del extracto es significativamente alto comparado con el antioxidante BHT de actividad conocida (55.53 ± 1.37 y 86.91 ± 7.93 respectivamente) el cuál fue utilizado como control positivo (**Figura 23**)

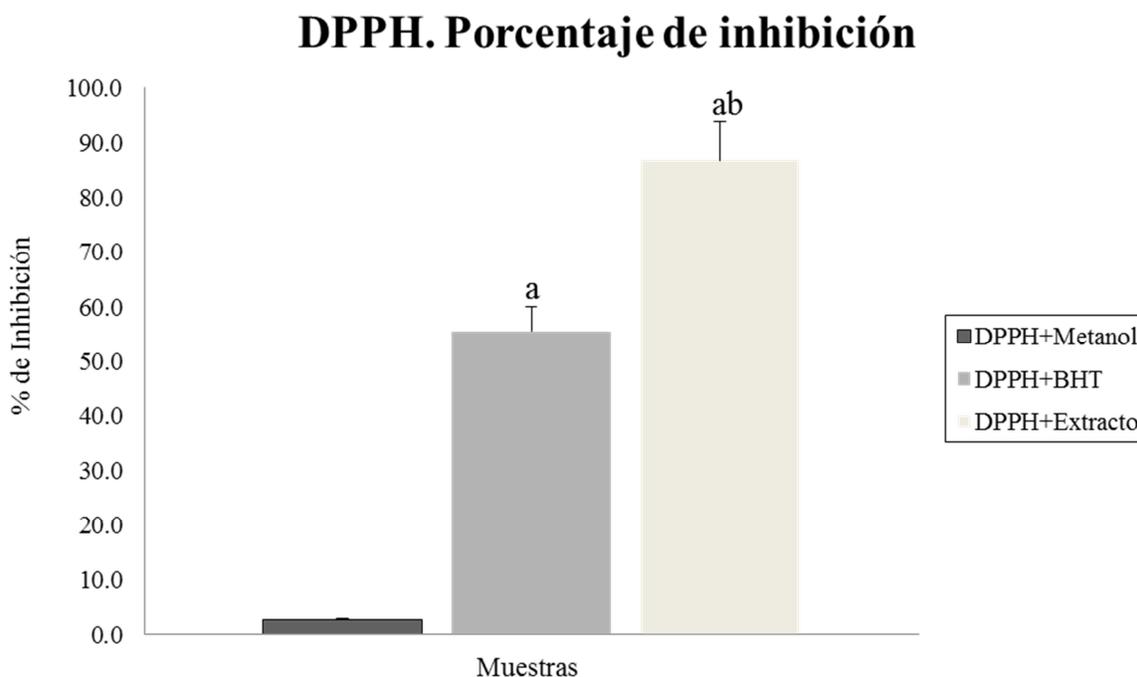


Figura 23. Evaluación de la capacidad antioxidante del extracto de *G. shideanum* por la técnica DPPH. Los resultados expresados como el porcentaje de inhibición (PI) fueron la media \pm SD calculados por triplicado para cada muestra. Las diferencias contra el control negativo DPPH+MeOH son expresadas como (a), las diferencias contra el control positivo DPPH+BHT son expresadas como (b) con valor $p < 0.05$.

7.4 Efecto del pretratamiento con extracto de y los principios activos de *G. shiedeanum* sobre los marcadores de lesión hepática inducida por TAA.

El daño al hígado y en todo caso las patologías hepáticas se caracterizan por la aparición de altos niveles de enzimas producto de la ruptura de los hepatocitos asociados a necrosis, el contenido hepatocitario se vierte en el torrente circulatorio y la elevación de las enzimas hepáticas en suero es proporcional al nivel de daño ocasionado. Para efectos de este estudio se tomó en cuenta algunos de los marcadores más utilizados experimentalmente las enzimas Alanina aminotransferasa y Aspartato aminotransferasa, para determinar el daño inducido por TAA en ratas pretratadas y no con el extracto y compuestos activos aislados de *G. shiedeanum*, así mismo se evaluó su grado de eficacia para reducir la lesión.

7.4.1 Alanina aminotransferasa

Se midió la actividad de la enzima Alanina aminotransferasa (ALT) en suero de ratas como indicador de daño hepático después de la intoxicación con una dosis subletal de TAA (6.6 mmol/Kg) y en animales pretratados con extracto de *G. shiedeanum* (100 mg/Kg) y sus principales compuestos activos acetoniil geraniina (25 mg/Kg), 3-O- α -L-arabinofuranosido-7-O- β -D-ramnosido de Kaempferol (2.5 mg/Kg) y ácido elágico (12.5 mg/Kg) por vía intragástrica. Las muestras de sangre fueron obtenidas por apertura de la cavidad abdominal y punción de la vena porta a las 24 h después de la administración intraperitoneal de TAA. El análisis de los datos revela el incremento máximo de los niveles de ALT a las 24 h de intoxicación (**Figura 24**) con niveles 3.6 veces mayores a los basales respecto al control. Por su parte, el tratamiento con el extracto redujo 3.5 veces los niveles de ALT lo que significa que el daño fue disminuido en un 72.06%. Por su parte, los compuestos activos expusieron mayor actividad al reducir aún más estos valores. La geraniina disminuyó el valor de ALT al 83.96%, el kaempferol redujo a 80.18% y el ácido elágico a 92.93%. El análisis estadístico entre grupos reveló que solo existe diferencia significativa entre el grupo que recibió Ác. Elágico-TAA y el control, los demás compuestos y el extracto se aprecian muy similares. Es decir, el Ác. Elágico aminoró más

significativamente el parámetro analizado al confrontarlo con el efecto del extracto y los otros dos compuestos.

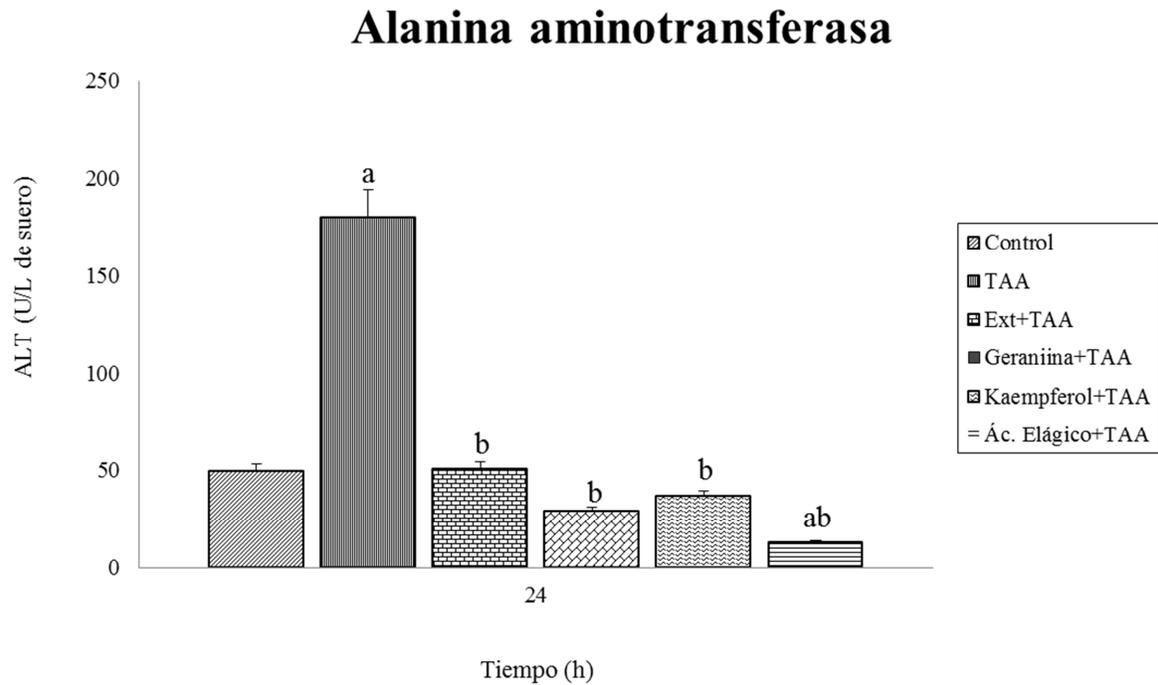


Figura 24. Efecto del pretratamiento de extracto y principios activos obtenidos de *G. shiideanum* en la actividad de Aspartato aminotransferasa (ALT) en suero intoxicadas con una dosis subletal de Tioacetamida (TAA). Los resultados expresados en Unidades por litro de suero (U/L de suero) fueron la media \pm SD de tres mediciones por cada muestra ($n = 5$). Las diferencias significativas contra el control son expresadas como (a) y las diferencias contra TAA se expresan como (b) $p < 0.05$.

7.4.2 Aspartato aminotransferasa

Se midió la actividad de la enzima Aspartato aminotransferasa (AST) en suero de ratas para evaluar el grado de daño hepático después de la intoxicación con una dosis subletal de TAA (6.6 mmol/Kg) y en animales pretratados con extracto de *G. shideanum* (100 mg/Kg) y sus principales compuestos activos acetnil geraniina (25 mg/Kg), 3-O- α -L-arabinofuranosido-7-O- β -D-ramnosido de Kaemferol (2.5 mg/Kg) y ácido elágico (12.5 mg/Kg) por vía intragástrica. Las muestras de sangre fueron obtenidas por apertura de la cavidad abdominal y punción de la vena porta a las 24 h después de la administración intraperitoneal de TAA. El análisis de los datos revela el incremento máximo de los niveles de AST a las 24 h de intoxicación aumentando 4 veces sobre los valores basales correspondientes al control (**Figura 25**). La actividad del extracto reporta la reducción de 6.4 veces el nivel de AST en suero, lo que sugiere que el daño fue aminorado en un 84.49%. En tanto, los resultados arrojados por parte de los principios activos es todavía más notable. La geraniina redujo el daño a 93.34%, el kaempferol a 94.29% y el ácido elágico a 94.29%. La comparación entre grupos revela que existe diferencia significativa entre los grupos Geraniina-TAA, Kaemferol-TAA y Ác. Elágico-TAA contrastados con el grupo que recibió el extracto, es decir, los compuestos reducen notablemente los niveles de AST muy por debajo del control y del extracto.

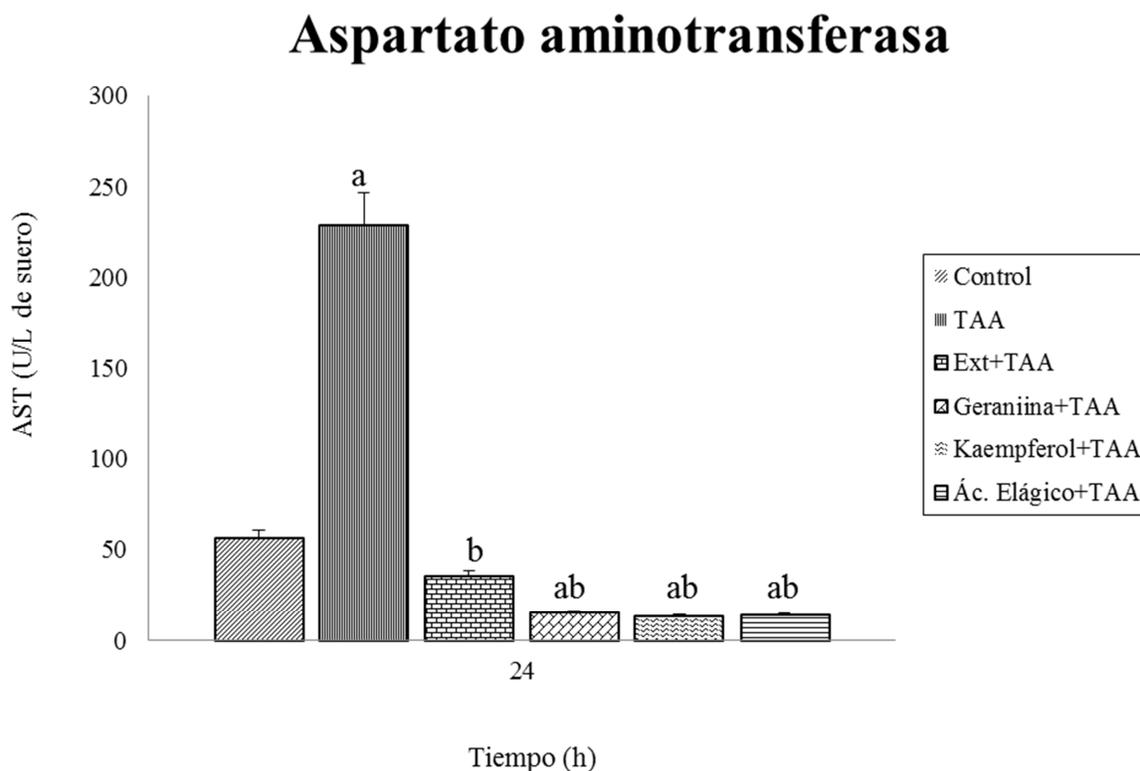


Figura 25. Efecto del pretratamiento de extracto y principios activos obtenidos de *G. shiideanum* en la actividad de Aspartato aminotransferasa (AST) en suero intoxicadas con una dosis subletal de Tioacetamida (TAA). Las muestras fueron obtenidas a las 24 h después de administrada la TAA. Los resultados expresados en Unidades por litro de suero (U/L de suero) fueron la media \pm SD de tres mediciones por cada muestra ($n = 5$). Las diferencias significativas contra el control son expresadas como (a) y las diferencias contra TAA se expresan como (b) $p < 0.05$.

7.4.3 Bilirrubinas totales

La bilirrubina es considerada en la investigación experimental y práctica clínica un importante parámetro relacionado con el diagnóstico de enfermedades hepáticas o lesión inducida. La hiperbilirrubinemia es producida por alteraciones en el balance entre la síntesis y excreción hepatobiliar de pigmentos conjugados. En este estudio se midió la actividad de bilirrubinas totales (BILT) suero de ratas para evaluar el grado de daño hepático después de la intoxicación con una dosis subletal de TAA (6.6 mmol/Kg) y en animales pretratados con extracto de *G. shiideanum* (100 mg/Kg) y sus principales compuestos activos acetoni geraniina (25 mg/Kg), 3-O- α -L-arabinofuranosido-7-O- β -D-ramnosido de Kaemferol (2.5 mg/Kg) y ácido elágico (12.5 mg/Kg) por vía intragástrica. Las muestras de sangre fueron obtenidas por apertura de la cavidad abdominal y punción de la vena porta a las 24 h después de la administración intraperitoneal de TAA. Los resultados indican un daño evidente en el grupo que recibió el tóxico (**Figura 26**), por el contrario los grupos que recibieron el extracto y los principios activos de *G. shiideanum* experimentaron un descenso significativo con valores cercanos a los controles, lo cual indica una considerable reducción del daño. Cabe mencionar que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre el extracto y los metabolitos, es decir, no se observa un mayor efecto de por parte de alguno de ellos al realizar la comparación entre grupos.

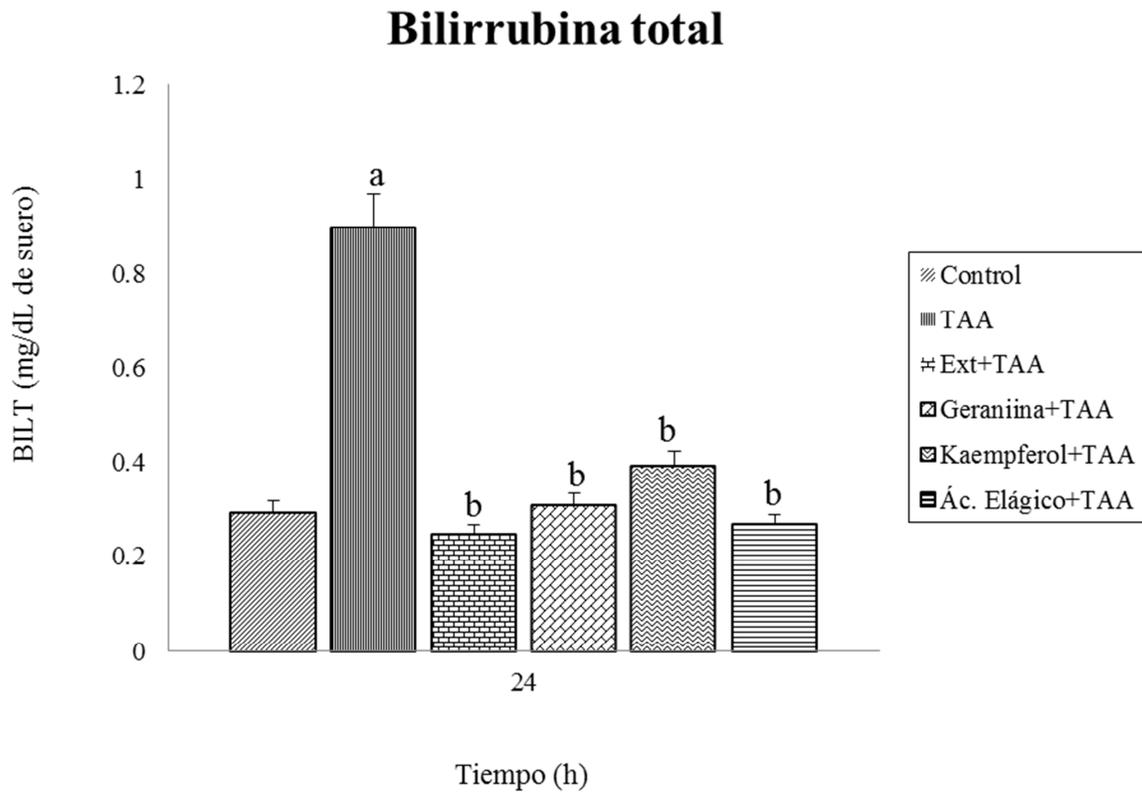


Figura 26. Efecto del pretratamiento de extracto y principios activos obtenidos de *G. shiideanum* en los valores de Bilirrubina total (BILT) en suero de ratas intoxicadas con una dosis subletal de Tioacetamida (TAA). Las muestras fueron obtenidas a las 24 h después de administrada la TAA. Los resultados expresados en miligramos por decilitro de suero (mg/dL de suero) fueron la media \pm SD de tres mediciones por cada muestra (n = 5). Las diferencias significativas contra el control son expresadas como (a) y las diferencias contra TAA se expresan como (b) $p < 0.05$.

VIII. DISCUSIÓN

La Tioacetamida es un potente hepatotóxico utilizado ampliamente como modelo de lesión hepática porque causa daño a nivel centrilobular o perivenoso. Este compuesto es bioactivado por el hígado en dos pasos primero a Tioacetamida sulfóxido (TASO) a través del CYP2E1 microsomal y posteriormente al metabolito altamente reactivo Tioacetamida disulfóxido (TASO₂) el cual se une covalentemente con sustratos subcelulares iniciando necrosis celular (19, 33, 34). La exposición aguda a TAA provoca alteraciones bioquímicas elevando los niveles séricos de AST, ALT, Bilirrubina directa y total, células blancas, amonio, albumina, γ -glutamil transpeptidasa y las citosinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α . Se ha observado el nivel máximo de alteración a las 24 y 48 h después de la administración de una dosis única TAA por lo cual su uso se considera un modelo de daño hepático agudo confiable (36). Por otro lado, la exposición prolongada produce cirrosis, nódulos hiperplásicos, adenomas y hepatocarcinomas (127).

*8.1 Efecto del pretratamiento con extracto de *G. shiideanum* sobre los niveles de enzimas del sistema antioxidante endógeno en hígado de ratas después de la intoxicación con TAA*

El sistema de defensa antioxidante endógeno (SDAE) ha sido producto de una larga evolución en los seres vivos ante el incesante daño al que se han confrontado en el medio ambiente y tal como su nombre lo dice este sistema funciona como protector contra los agentes tóxicos que generan estrés oxidativo en respuesta metabólica. El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre la producción de ROS y las defensas antioxidantes en contra de estas moléculas. En consecuencia, este sistema sufre fluctuaciones proporcionales a la dosis y el tiempo de contacto con el tóxico y son precisamente estas variaciones las que al ser medidas nos brindan un esquema sobre daño ocasionado y, a su vez, de la capacidad del organismo mismo para recuperarse. Para fines de esta investigación se evaluó el efecto del pretratamiento con extracto de *G. shiideanum* sobre los niveles de algunas de las enzimas más importantes que constituyen el SDAE (Cat, SOD, GPx y GR) en hígado de ratas intoxicadas con una dosis subletal de TAA. Las muestras tomadas a las 0, 24 y 48 h

después de la intoxicación fueron analizadas por el método de Western blot. Esta técnica se basa en el análisis del producto de expresión de los genes, eso significa el análisis de proteínas. Los resultados indicaron alteraciones a distintos niveles sobre la concentración de dichas enzimas en tejido hepático. Cabe mencionar la importancia de la funcionalidad individual que aporta cada enzima al SDAE haciendo notar que no trabajan separadamente sino que por el contrario, llevan un trabajo en equipo perfectamente coordinado. Por ejemplo, uno de los sistemas más importantes de protección celular en contra de los efectos tóxicos del oxígeno molecular es el que realizan en conjunto las enzimas SOD y Cat. La enzima SOD se encarga de catalizar la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ que en consecuencia genera H_2O_2 , esta sustancia es transformada a H_2O por la Cat. Se sabe de la acción moduladora que tienen para protegerse una a la otra, cuando se produce el $O_2^{\cdot-}$ se inactiva a la Cat y la producción de H_2O_2 inhibe a la SOD. Por otro lado, la GPx, la GR y el GSH concretan actividades en conjunto. La GPx cataliza la reacción de oxidación del GSH convirtiéndolo a GSSG tomando como sustrato H_2O_2 u otros peróxidos orgánicos. Paralelamente la GR participa en la restauración del glutatión a su forma reducida GSH con la ayuda de agentes reductores, en este caso gracias a la presencia de NADPH por acción de G6P deshidrogenasa que a su vez es proporcionado través la vía de las pentosas fosfato. Todo ello habla de una super familia de componentes encargados de la protección frente a un constante deterioro al que se exponen los sistemas celulares.

Actualmente no existen suficientes estudios que expliquen los mecanismos moleculares por los cuáles ocurre la interacción entre los componentes de las plantas medicinales y los sistemas celulares que ayuden a comprender de mejor forma los efectos observados en la experimentación científica. Específicamente los fenómenos de expresión génica de enzimas antioxidantes se consideran procesos difícilmente dilucidables por la enorme variación genética entre individuos y los factores ambientales que intervienen. No obstante, en este estudio se pudo observar diferentes respuestas en cada una de las enzimas del SDAE. La Cat experimentó descenso significativo a las 24 h en respuesta al estrés oxidativo generado por la intoxicación con TAA. Sin embargo, el grupo que recibió el extracto logra acrecentar el nivel de Cat aunque no se llega a los valores basales pero el aumento es significativo; a las 48 h el valor desciende aún más en los animales tratados con TAA, mientras que el grupo del extracto intenta aproximarse a los controles. La SOD, por

su parte, presenta un comportamiento ciertamente distinto, de inicio los valores de los controles se tornan un tanto bajos y a medida que pasan las primeras 24 aumentan ligeramente en el grupo al que se inyectó TAA, en cambio el que recibe el extracto incrementó significativamente el valor de SOD. A las 48 h en el grupo con TAA desciende todavía más el nivel de SOD y el grupo pretratado con extracto de igual manera aminora ligeramente su valor, si bien la diferencia sigue siendo extraordinariamente significativa. Lo anterior confirma la hipótesis que postula la interacción mutua entre la SOD y Cat.

La GPx presentó valores levemente reducidos a las 24 h de intoxicación con TAA, pero el grupo que recibió el extracto aumentó considerablemente y el ascenso es aún más notorio a las 48 h. La enzima GR presenta valores altos desde el inicio a las 0 h, a las 24 el grupo intoxicado con TAA sufrió un dramático descenso y el grupo del extracto trata de aminorar el daño elevando su valor, a pesar de eso, a las 48 h el grupo intoxicado redujo todavía más el valor de GR al contrario del extracto que intentó alcanzar el valor de los controles al no detectarse diferencia estadísticamente significativa entre los datos arrojados por los controles y el extracto. Al contrastar los resultados con los del índice de reducción del GSH/GSSG se puede confirmar que el extracto interviene directamente en la reciclación del tripéptido gracias a la activación de la GR.

Estos resultados sugieren que el extracto de *G. shiideanum* funciona perfectamente como protector al hígado cuando el daño ha sido inducido por la exposición a un agente altamente tóxico (TAA) al mejorar el perfil de las enzimas del SDAE; todas ellas experimentaron depleción significativa pasadas las primeras 24 h después de la intoxicación esto se traduce en aumento del estrés oxidativo hepático en respuesta al proceso de biotransformación al que sometió la TAA con la inevitable formación de moléculas altamente electrofílicas que interactúan actúan disminuyendo los componentes del SDAE. En cambio, cuando se administró el extracto la totalidad de las enzimas, a distintos niveles, aumentaron de forma significativa su concentración en el tejido hepático.

Estos resultados concuerdan con los encontrados por Rodrigues, y sus colaboradores donde se probó la atenuación del estrés oxidativo hepático que produjo la administración del extracto acuoso de *Croton cajucara Benth* (1.5 ml i.g.) en ratas diabetizadas con estreptozotocina; lo que se observó fue aumento en la actividad de las enzimas SOD, Cat y

GPx, así como disminución de la activación del factor nuclear NF- κ B el cual es un factor de transcripción asociado a la expresión de genes que tienen que ver con las múltiples complicaciones de la diabetes (128). El tratamiento con el extracto de aceite esencial de Ginseng rojo probó participar en la protección celular no únicamente como una estructura molecular antioxidante sino también porque estimuló la actividad y expresión de las enzimas del SDAE Cat, SOD y GPx en cultivo de células hepáticas HepG2 tratadas con H₂O₂ (1 mM) (129). También se ha probado que el extracto de *Ganoderma lucidum*, un hongo de amplia utilidad medicinal, del cuál se obtuvo metil linoleato considerado el componente más importante de la fracción estimula la expresión de catalasa y el nivel de transcripción en ratones (130).

8.2 Efecto del pretratamiento con el extracto de *G. shiidenum* sobre el índice de reducción (IR) GSH/GSSG en ratas intoxicadas con TAA

El glutatión compuesto tiolico no proteico más abundante en las células, está constituido por los aminoácidos L-glutamina, L-cisteina y L-glicina se ha asociado a diferentes procesos fisiológicos entre los que destaca la eliminación de xenobióticos, señalización celular y también como antioxidante y agente reductor al interactuar y neutralizar compuestos electrofílicos y ROS. Quizá sea la razón por la cual el hígado es el órgano donde se encuentra en mayor proporción. Es importante mantener elevado el índice redox de glutatión reducido sobre el oxidado (GSH/GSSG) en los sistemas celulares porque la disminución de éste índice implica aumento en la producción de GSSG y disminución de grupos tiol vinculados con la desestabilización de proteínas por la formación de enlaces disulfuro mixto, peroxidación lipídica, protuberancias en la membrana celular, aumento de calcio intracelular e inducción de apoptosis por activación de las caspasas (señales de muerte) y por la apertura de los poros de permeabilidad transitoria mitocondriales. La evaluación del índice redox GSH/GSSG en homogenados de hígado de rata por efecto de la intoxicación con TAA mostró la reducción evidente de GSH a las 24 y 48 h, por el contrario, el pretratamiento con extracto de *G. shiideanum* mostró recuperación del índice al incrementar la concentración de GSH aún por encima del grupo control a las 24 h de recibir el hepatotóxico. No se observó el mismo efecto en el grupo de las 48 h también

tratado con el extracto. Muy probablemente el metabolito TASO₂ el cuál es altamente electrofílico interacciona con el GSH hepático formando conjugados por acción de las GSTs para después ser hidrolizados en cada una de sus partes y eliminarse a través de la bilis; este fenómeno es apreciado por la disminución del GSH en nuestro experimento. La menor depleción de GSH hepático posiblemente se deba a la interacción molecular entre los compuestos antioxidantes contenidos en el extracto con TASO₂ y ROS generados durante la intoxicación con TAA.

La exposición de las células hepáticas a TAA exhibe una profunda disminución del contenido de GSH precedido por fuerte aumento de la producción endógena de ROS. La producción de ROS se correlaciona con incremento de lipoperoxidación (131). Al mismo tiempo el análisis proteómico revela que la administración de TAA genera alteración bilateral en la función proteica, por un lado desregula enzimas de rutas metabólicas primarias como la β -oxidación de ácidos grasos, metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada y metabolismo de la metionina. Este fenómeno es representativo de la disminución de Acetil CoA. Por otra parte, regula proteínas involucradas con el aumento del estrés oxidativo y peroxidación lipídica (132).

Al igual que este proyecto en varios centros de investigación de diferentes partes del mundo se han evaluado extractos y compuestos de plantas que prometen reducir los marcadores de lesión en tejido hepático. El extracto etanólico de *Frutus Piperis Longi*, una planta de uso común en China, probó reducir de manera significativa los signos de fibrosis hepática expresados por disminución de la actividad de la gamma glutamiltransferasa y el contenido de colágeno al mejorar normalizar los valores de GSH, AST, ALT, ALP Y gGT. Se han atribuido estos efectos al elevado contenido de polifenoles en la planta los cuales pueden actuar en contra de los radicales libres reduciendo el estrés oxidativo y en consecuencia optimizando el sistema antioxidante (75). El experimento con la fracción metanólica de *Amomun xhantoides*, una especie utilizada para tratar desórdenes digestivos en Asia, a dosis de 25, 50 y 100 mg/Kg ha mostrado reducir significativamente los marcadores de daño entre ellos GSH en la inducción de fibrosis hepática por TAA en ratas, por lo que ha sido propuesto como potente antifibrotico (133). El uso de resveratrol a dosis de 100 y 200 mg/Kg durante 8 semanas ha probado reducir significativamente el daño

inducido por CCl₄ (0.4 g/Kg peso/día) en ratas aumentando los valores de GSH a niveles muy parecidos a los controles (134).

8.3 Evaluación de la capacidad antioxidante del extracto de *G. shiedeanum* por el método DPPH

La evaluación del extracto de *G. shiedeanum* por el método DPPH (1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) expresada como el porcentaje de inhibición mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) con relación al control negativo metanol y al control positivo BHT. El porcentaje de inhibición del extracto se encuentra por arriba del 80% comparado con el del BHT alrededor del 55 %. Este método desarrollado por Brand-Williams (Brand-Williams, *et al.* 1995) se basa en la reducción de la absorbancia del radical DPPH, este radical de coloración violeta es orgánicamente estable. La medición de actividad antioxidante se hace espectrofotométricamente siguiendo la reducción de absorbancia a 517 nm con el inherente cambio de coloración. La reacción de estabilización se considera que transcurre fundamentalmente por la transferencia de electrones con aporte marginal de transferencia de átomos de hidrógeno. De acuerdo con esto, se sugiere que la elevada actividad antioxidante del extracto de *G. shiedeanum* se debe al contenido de polifenoles descritos previamente cuya capacidad antioxidante está basada su habilidad para donar electrones y detener reacciones en cadena. En el caso de los flavonoides esta habilidad se debe a los grupos hidroxilo, específicamente al 3',4'-OH del anillo B y a la doble ligadura 2, 3- del anillo C. La actividad aumenta con el número de grupos -OH en el anillo A y B (105, 106). En elagitaninos la capacidad estabilizadora del radical DPPH está relacionada con el peso molecular y la tasa de galolilación, se ha visto que elagitaninos de mayor peso molecular atrapan más eficientemente el radical DPPH (135) y la actividad antioxidante de taninos hidrolizables se debe a la quelación de hierro más que a la captación de radicales hidroxilo (136).

Los resultados encontrados en esta investigación concuerdan con los hallados en el estudio de *Geranium sibricum* en el cuál se reportó un elevado contenido de polifenoles en extracto de acetato de etilo (AcEtO) representados como equivalentes de ácido gálico por

gramo de extracto (425 mg GAE/g extracto) al compararse con extractos acuoso, etanólico y las fracciones de éter petróleo, n-butanol y acuosa (169.46, 218.39, 130.78, 327.17 y 68.03 GAE/g extracto respectivamente). La evaluación de la capacidad antioxidante con diferentes métodos entre los que se encuentra DPPH de manera general demostró que la fracción de AcEtO mostró mejor actividad antioxidante. Por los resultados encontrados se sometió la fracción de AcEtO a pruebas fitoquímicas para identificar los compuestos mayoritarios de los que destacaron los elagitaninos geraniina, ácido gálico y corilagina. A dichos compuestos se les midió la capacidad antioxidante por los mismos métodos y se encontró que la geraniina fue el compuesto con mayor actividad antioxidante, en cambio el ácido gálico fue el que inhibió más eficientemente a la xantina oxidasa una enzima que participa en la síntesis de ácido úrico (86).

*8.4 Efecto del pretratamiento con extracto y principios activos de *G. shiideanum* sobre los marcadores de lesión hepática inducida por TAA*

En este estudio se evaluó el efecto hepatoprotector y antioxidante del extracto y los principios activos de *G. shiideanum* en un modelo de daño hepático inducido por la intoxicación con una dosis única de TAA en ratas con la medición de marcadores de lesión claramente conocidos las enzimas AST, ALT y BILT; se observó el aumento significativo ($p < 0.001$) del grupo que recibió el tóxico contra el control lo cual confirma el daño inherente producido por la exposición aguda a TAA. Este compuesto es una de las hepatotoxinas más frecuentemente estudiadas por tener la capacidad de generar fibrosis, cirrosis y cáncer en modelos experimentales con ratas. A dosis elevadas de 500 mg/Kg genera necrosis hepática perivenosa producto de la intoxicación aguda (19). En este experimento el pretratamiento con el extracto de *G. shiideanum* redujo los niveles de AST y ALT con valores cercanos a los controles y en el caso de los compuestos los niveles caen aún por debajo del grupo control. Uno de los objetivos planteados fue precisamente el de comparar los efectos entre grupos, las variaciones y sobretodo determinar cuál de los compuestos tuvo el efecto más significativo. De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que el ácido elágico fue el compuesto que redujo más significativamente ($p < 0.05$) los niveles de AST y ALT en comparación con la geraniina y el kaemferol. Los valores de

BILT en suero indudablemente aumentan en el grupo sacrificado a las 24 h después de recibir el tóxico, sin embargo, los niveles que alcanza aún son considerados normales ya que de acuerdo a las referencias el máximo daño se observa hasta las 48 h de intoxicación. Los grupos pretratados con el extracto de *G. shiedeanum* y sus metabolitos experimentan disminución en la concentración de BILT con resultados muy similares al control ($p < 0.05$); no se identificó diferencia estadísticamente significativa en la capacidad de disminución de la lesión entre el extracto y los principios activos de la planta.

La biodisponibilidad es un factor determinante para que los compuestos evaluados logren el efecto deseado y al parecer el uso combinado de flavonoides aumenta la biodisponibilidad por las interacciones que realizan en el transporte (137). Después de la administración oral de kaemferol el tiempo de absorción es relativamente rápido (t_{max} 1-2 h), el aumento en los niveles plasmáticos es dosis dependiente (100 y 250 mg/Kg). Por el contrario la biodisponibilidad es de alrededor del 2%; el análisis de sangre portal revela moderado a bajo nivel de absorción. Esto se debe probablemente al extenso primer paso del metabolismo por glucuronidación y otras rutas llevadas a cabo en intestino e hígado (138).

Existe información limitada sobre el proceso de biotransformación que experimentan los flavonoides en humanos. Por el estudio de algunos flavonoides en microsomas hepáticos de humanos se sabe que son metabolizados por el CYP1A2 y CYP2C9 (139), particularmente el kaemferol es transformado a quercetina por el CYP1A1 (140). La velocidad en que son oxidados depende del grado de metilación que presenten, es decir, los compuestos que se encuentran parcialmente metilados son oxidados más rápidamente que los que están completamente metilados (141).

La información sobre biodisponibilidad y metabolismo de elagitaninos aun es limitada por lo que estos procesos aún no son completamente comprendidos, a pesar de ello, el estudio de los metabolitos encontrados en suero, orina y heces de rata a partir de la administración de geraniina y corilagina aislada de *Geranium Thunbergi*, especie utilizada como antidiarreico en Japón, indica elevada actividad antioxidante con los métodos DPPH y ORAC, incluso con el segundo método se observa mayor actividad en los metabolitos que en los compuestos intactos; el análisis en suero indica aumento de la actividad antioxidante en ORAC al incrementarse los niveles plasmáticos tras la administración oral de geraniina,

tales hallazgos sugieren que los metabolitos de elagitaninos, pueden contribuir benéficamente a la salud actuando como antioxidantes (102). Esta información coincide con los resultados encontrados en nuestro estudio, proponiendo que los principios activos acetnil geraniina, 3-O- α -L-arabinofuranosido-7-O- β -D-ramnosido de Kaemferol y ácido elágico siguen una cinética similar desde la absorción a nivel intestinal y probablemente en colon por acción de la microflora con tiempos de absorción relativamente rápidos de entre 1 y 2 h. Particularmente los elagitaninos (acetnil geraniina y ácido elágico) son transformados a urolitinas por la microflora intestinal para poder absorberse (117, 118) y el flavonoide puede ser hidrolizado por la phloridizin hidrolasa para liberarse de los azúcares arabinofuranosa y ramnosa volviéndolo más lipofílico y afín a la membrana de las células epiteliales del intestino para ser absorbido, o también por acción de la β -glucosidasa citosólica a través del receptor celular GLUT-1 dependiente de sodio como segunda opción (29); una vez en la circulación sistémica son metabolizados por acción de sulfatasas, UDP-glucuronosiltransferasas y catecol-O-metiltransferasas y posteriormente se someten a reacciones de fase II en el hígado. Al ser metabolizados en hígado, se sugiere que estos metabolitos son los responsables de actuar directamente para disminuir el estrés oxidativo ocasionado por el metabolito TASSO₂ producto de la biotransformación hepática de la TAA el cual es altamente reactivo y es capaz de adherirse a sustratos subcelulares ocasionando lesión hepática (21). Esto se refleja en la disminución significativa de los marcadores de daño ALT, AST y BILT tanto por el grupo que recibe el extracto como los grupos que reciben los principios activos. Se conoce que algunos polifenoles como el trans-resveratrol y el ácido tánico pueden modular el CYP2E1 interviniendo en la transformación de xenobióticos reduciendo su toxicidad (142).

Los resultados experimentales exponen mayor efecto en la reducción de los niveles de ALT y AST por parte del ácido elágico, es el único compuesto significativamente diferente del extracto. La razón probablemente se deba al efecto de la hidrólisis que sufre la geraniina por acción de la microflora intestinal para liberar las dos moléculas de ácido elágico que se encuentran unidas a su estructura, esto quizá implica mayor tiempo de transformación mientras que el ácido elágico es directamente transformado a urolitinas para entrar a la circulación sanguínea por lo tanto el tiempo es menor, esto posiblemente influya en el efecto que alcanza el compuesto.

Se han realizado gran variedad de investigaciones para probar los efectos en la mayoría de los casos benéficos del extracto de plantas, no obstante, en varias de estas no se llega a incluir el estudio con los principios activos aislados. Las plantas contienen infinidad de compuestos que forman parte de su metabolismo, algunos de ellos se encuentran en mayor proporción dependiendo de su función. En la medicina tradicional se tiene el conocimiento empírico sobre el uso de las plantas para tratar algunos síntomas o enfermedades como tal, sin embargo, son los estudios fitoquímicos los que brindan un escaneo completo sobre la composición de la planta; teniendo el conocimiento sobre estructura y propiedades químicas de los componentes es posible atribuirles propiedades benéficas por lo menos hasta que se hagan las pruebas *in vitro* e *in vivo* pertinentes.

Siendo el hígado un órgano muy susceptible de daño debido a la enorme cantidad de sustancias a las que está expuesto, se han llevado a cabo distintos trabajos de investigación con extractos de plantas propuestos como modelos de protección. El trabajo realizado por Qureshi en 2009 (76) con el extracto de las hojas de *Cordia macleodii* en el modelo de daño hepático inducido por tetracloruro de carbono (CCl₄) mostró la reducción significativa ($p < 0.001$) de los niveles de AST, ALT, ALP y BILT; tal efecto se atribuyó al contenido de flavonoides y triterpenoides a los cuales se les ha encontrado actividad antioxidante (42, 109) y hepatoprotectora (111).

En otro experimento realizado con el extracto acuoso y metanólico de *Phyllanthus niruri* utilizando también CCl₄ como agente hepatotóxico se observó un efecto hepatoprotector al disminuir los niveles de ALT y AST ($p < 0.05$) (143). Los estudios fitoquímicos de esta planta reportan la presencia de filantinas e hipofilantinas que pueden actuar en contra del efecto citotóxico ocasionado por el CCl₄ (144). Un estudio más reciente (80) con esta misma especie mostró reducir considerablemente el daño causado a hígado de ratas intoxicadas con TAA; se reportó la reducción de los niveles de ALT, AST, ALP y BILT comparando los resultados con el control y silimarina una sustancia aislada de las hojas de *Silybum maritimum* cuyo efecto hepatoprotector ha sido previamente estudiado. El aumento de la actividad de las enzimas ALT, AST y ALP en ratas intoxicadas comparadas con los controles indica la presencia de necrosis de los hepatocitos que resulta en la deficiencia de transaminasa y constante liberación de ALP causando colestasis

probablemente atribuida a las alteraciones estructurales y de la integridad de los hepatocitos.

El daño oxidativo causado por tóxicos como el CCl_4 dañan la membrana plasmática de los hepatocitos, esto provoca que las enzimas AST y ALT que normalmente se encuentran en el citosol sean liberadas al torrente circulatorio. El tratamiento con picroliv, curcumina y ácido elálgico logró disminuir el daño ocasionado por CCl_4 con valores cercanos al control. El efecto protector resulta por la preservación en la integridad celular debido a la estabilización de la membrana plasmática (145).

El tratamiento con el extracto de algunos hongos medicinales ha probado ser efectivo para atenuar el daño al hígado causado por TAA entre ellos se encuentra *Orthosiphon stamineus* (79) y *Panus giganteus* (Berk) (42) que disminuyeron los marcadores de lesión hepática (AST, ALT, ALP, bilirrubinas, MDA, albumina y proteínas totales) después de un tratamiento crónico con TAA.

IX. CONCLUSIONES

El uso de plantas medicinales es aceptado en todas partes del mundo gracias al conocimiento ancestral que se tiene sobre los beneficios a la salud ya sea como medida preventiva o terapéutica en infinidad de patologías. Sin embargo, son necesarios los estudios fitoquímicos y biológicos pertinentes para validar su utilización reconociendo las dosis letales que permitan con seguridad implementarlas en los tratamientos médicos. En países de oriente es muy común el estudio científico de muchas de las especies que tradicionalmente son utilizadas por la población, caso contrario a nuestro país. En México, a pesar la colosal variedad florística y de la herencia milenaria de las culturas precolombinas la utilización de plantas medicinales ha estado relegada de manera popular e informal en algunos estratos sociales únicamente como una alternativa económica y accesible que no ha merecido aún el interés suficiente para estudiarse formalmente.

La importancia del estudio realizado radica en realizar una propuesta sobre el uso de la especie *G. shiedeanum* como alternativa para aminonar la lesión hepática originada por la exposición a sustancias tóxicas durante ciertos periodos y dosis que probablemente a un tiempo concluyan en alguna enfermedad severa. Siendo la TAA una hepatotoxina de actividad conocida, en esta investigación fue utilizada como modelo de daño hepático para probar el efecto protector y antioxidante del extracto y los principios activos de *G. shiedeanum*, una especie endémica del estado de Hidalgo, México, al que se le ha descrito tradicionalmente actividad antipirética y antiséptica. En nuestro estudio el extracto a una dosis ponderada favoreció los niveles de enzimas del SDAE incluyendo Cat, SOD, GPx y GR, así como el IR GSH/GSSG en homogenados de hígado de rata. La evaluación de la actividad antioxidante del extracto expresada como porcentaje de reducción brindó resultados muy valiosos. En una segunda parte, el ensayo con el extracto y sus compuestos activos probó reducir significativamente los marcadores de daño AST, ALT y BILT en suero, notando mayor diferencia en los compuestos que en el extracto. Cabe mencionar que los efectos mencionados se obtuvieron a dosis muy bajas de extracto con respecto a la DL₅₀ estimada. De manera tal, se sugiere que esta especie posee elevada actividad antioxidante y

hepatoprotectora probablemente atribuidas al contenido de taninos y flavonoides aislados de la misma.

Por último, se hace alusión para continuar con el estudio molecular de los principios activos a fin de intentar dilucidar interacciones y mecanismos de acción que aun no son completamente explicables. Se sugiere también profundizar en la parte fitoquímica del extracto para la identificación y purificación de los otros constituyentes de esta especie. De esta manera generar propuestas de modelos de investigación evaluando efectos *in vitro* o *in vivo*.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2011;61:69-90.
2. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Defunciones generales totales por principales causas de mortalidad, 2010. In: INEGI, editor. INEGI. Estadísticas de Mortalidad. México; 2012.
3. Mc Phee J, Ganong W, Lange J, Lingappa V. Fisiopatología médica: una introducción a la medicina clínica. 4 ed. México, 2001.
4. Geneser F: Digestive system. In: Histology. 3 ed: Panamericana, 2000; 518-519.
5. Riehle KJ DY, Campbell JS, Fausto N. New concepts in liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26::203-212.
6. Calleja E: El hígado. In: Hidlago UAdEd, ed. Alcohol, alcoholismo y cirrosis. 1 ed. Pachuca, Hgo. México. 2007; 71-82.
7. Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2006;364:33-60.
8. Vera M NN. Hepatic stellate cells and alcoholic liver disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2006;98:674-684.
9. Bian Z, Ma X. Liver fibrogenesis in non-alcoholic steatohepatitis. *Front Physiol* 2012;3:248.
10. Urtasun R, Nieto N. [Hepatic stellate cells and oxidative stress]. *Rev Esp Enferm Dig* 2007;99:223-230.
11. Nakatani K KK, Seki S, Nakajima Y. Pit cells as liver-associated natural killer cells: morphology and function. *Med Electron Microsc.* 2004;37::29-36.

12. Kasper CB. Biochemical distinctions between the nuclear and microsomal membranes from rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1971;246:577-581.
13. Roach J, Benyon, S. : Metabolismo de las proteínas. In: *Lo esencial del metabolismo y nutrición*. Madrid, España: Elsevier, 2004; 83-106.
14. Roach J, Benyon, S.: Metabolismo energético de los hidratos de carbono In: *Lo esencial del metabolismo y nutrición*. Madrid, España: Elsevier, 2004; 7-45.
15. Roach J, Benyon, S.: Metabolismo y transporte de lípidos. In: *Lo esencial del metabolismo y nutrición*. Madrid, España: Elsevier, 2004; 55-82.
16. Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol* 2011;54:795-809.
17. Malhi H, Guicciardi ME, Gores GJ. Hepatocyte death: a clear and present danger. *Physiol Rev* 2010;90:1165-1194.
18. Grattagliano I, Bonfrate L, Diogo CV, Wang HH, Wang DQ, Portincasa P. Biochemical mechanisms in drug-induced liver injury: certainties and doubts. *World J Gastroenterol* 2009;15:4865-4876.
19. Cascales M: Vulnerabilidad del hígado a la lesión tóxica. In: *Mecanismos de hepatotoxicidad*. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid, 2001; 43-71.
20. Diez-Fernandez C, Sanz N, Alvarez AM, Wolf A, Cascales M. The effect of non-genotoxic carcinogens, phenobarbital and clofibrate, on the relationship between reactive oxygen species, antioxidant enzyme expression and apoptosis. *Carcinogenesis* 1998;19:1715-1722.
21. Zhao B, Waterman MR. Moonlighting cytochrome P450 monooxygenases. *IUBMB Life* 2011;63:473-477.
22. Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* 2000;1:REVIEWS3003.

23. Werck-Reichhart D, Hehn A, Didierjean L. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends Plant Sci* 2000;5:116-123.
24. Leung L, Kalgutkar AS, Obach RS. Metabolic activation in drug-induced liver injury. *Drug Metab Rev* 2012;44:18-33.
25. Carini R, Autelli R, Bellomo G, Albano E. Alterations of cell volume regulation in the development of hepatocyte necrosis. *Exp Cell Res* 1999;248:280-293.
26. Diez-Fernandez C, Sanz N, Cascales M. Intracellular calcium concentration impairment in hepatocytes from thioacetamide-treated rats. Implications for the activity of Ca⁽²⁺⁾-dependent enzymes. *J Hepatol* 1996;24:460-467.
27. Lauterburg BH. Early disturbance of calcium translocation across the plasma membrane in toxic liver injury. *Hepatology* 1987;7:1179-1183.
28. Grattagliano I, Russmann S, Diogo C, Bonfrate L, Oliveira PJ, Wang DQ, Portincasa P. Mitochondria in chronic liver disease. *Curr Drug Targets* 2011;12:879-893.
29. Grattagliano I, Ubaldi E, Portincasa P, Palasciano G. Liver disease: early signs you may be missing. *J Fam Pract* 2009;58:514-521.
30. Stransky J, Ryzlova M, Stritesky J, Horak J. [Aspartate aminotransferase (AST) more than alanine aminotransferase (ALT) levels predict the progression of liver fibrosis in chronic HCV infection]. *Vnitr Lek* 2002;48:924-928.
31. Limdi JK, Hyde GM. Evaluation of abnormal liver function tests. *Postgrad Med J* 2003;79:307-312.
32. Grattagliano I, Ubaldi E, Bonfrate L, Portincasa P. Management of liver cirrhosis between primary care and specialists. *World J Gastroenterol* 2011;17:2273-2282.
33. Chilakapati J, Korrapati MC, Shankar K, Hill RA, Warbritton A, Latendresse JR, Mehendale HM. Role of CYP2E1 and saturation kinetics in the bioactivation of

thioacetamide: Effects of diet restriction and phenobarbital. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;219:72-84.

34. Chilakapati J, Korrapati MC, Hill RA, Warbritton A, Latendresse JR, Mehendale HM. Toxicokinetics and toxicity of thioacetamide sulfoxide: a metabolite of thioacetamide. *Toxicology* 2007;230:105-116.

35. Chilakapati J, Shankar K, Korrapati MC, Hill RA, Mehendale HM. Saturation toxicokinetics of thioacetamide: role in initiation of liver injury. *Drug Metab Dispos* 2005;33:1877-1885.

36. Chen TM, Subeq YM, Lee RP, Chiou TW, Hsu BG. Single dose intravenous thioacetamide administration as a model of acute liver damage in rats. *Int J Exp Pathol* 2008;89:223-231.

37. Sanz N, Diez-Fernandez C, Fernandez-Simon L, Alvarez A, Cascales M. Necrogenic and regenerative responses of liver of newly weaned rats against a sublethal dose of thioacetamide. *Biochim Biophys Acta* 1998;1384:66-78.

38. Sanz N, Diez-Fernandez C, Andres D, Cascales M. Hepatotoxicity and aging: endogenous antioxidant systems in hepatocytes from 2-, 6-, 12-, 18- and 30-month-old rats following a necrogenic dose of thioacetamide. *Biochim Biophys Acta* 2002;1587:12-20.

39. Tsukamoto H, Matsuoka M, French SW. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Semin Liver Dis* 1990;10:56-65.

40. Cascales M, Martin-Sanz P, Alvarez A, Sanchez-Perez M, Diez Fernandez C, Bosca L. Isoenzymes of carbohydrate metabolism in primary cultures of hepatocytes from thioacetamide-induced rat liver necrosis: responses to growth factors. *Hepatology* 1992;16:232-240.

41. Diez-Fernandez C, Sanz N, Bosca L, Hortelano S, Cascales M. Involvement of nitric oxide synthesis in hepatic perturbations induced in rats by a necrogenic dose of thioacetamide. *Br J Pharmacol* 1997;121:820-826.

42. Wong WL, Abdulla MA, Chua KH, Kuppusamy UR, Tan YS, Sabaratnam V. Hepatoprotective Effects of *Panus giganteus* (Berk.) Corner against Thioacetamide- (TAA-) Induced Liver Injury in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012;2012:170303.
43. Basaga HS. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 1990;68:989-998.
44. Camacho-Luis A, Mendoza-Pérez, J.: La naturaleza efímera de los radicales libres. Química y Bioquímica de los radicales libres. In: Los antioxidantes y las enfermedades crónico degenerativas. Volume 1. Pachuca Hidalgo, México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 2009; 27-76.
45. Sanz N, Diez-Fernandez C, Alvarez A, Cascales M. Age-dependent modifications in rat hepatocyte antioxidant defense systems. *J Hepatol* 1997;27:525-534.
46. Cascales M: Mecanismos de defensa hepatocelular. In: Mecanismos de hepatotoxicidad. Madrid, España: Universida Complutense de Madrid, 2001; 99-123.
47. Huang JY, Hirschey MD, Shimazu T, Ho L, Verdin E. Mitochondrial sirtuins. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804:1645-1651.
48. Ahn BH, Kim HS, Song S, Lee IH, Liu J, Vassilopoulos A, Deng CX, et al. A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:14447-14452.
49. Hirschey MD, Shimazu T, Goetzman E, Jing E, Schwer B, Lombard DB, Grueter CA, et al. SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature* 2010;464:121-125.
50. Ozden O, Park SH, Kim HS, Jiang H, Coleman MC, Spitz DR, Gius D. Acetylation of MnSOD directs enzymatic activity responding to cellular nutrient status or oxidative stress. *Aging (Albany NY)* 2011;3:102-107.

51. Tao R, Coleman MC, Pennington JD, Ozden O, Park SH, Jiang H, Kim HS, et al. Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress. *Mol Cell* 2010;40:893-904.
52. Mills GC. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem* 1957;229:189-197.
53. Day BJ. Catalase and glutathione peroxidase mimics. *Biochem Pharmacol* 2009;77:285-296.
54. Rhee SG, Chae HZ, Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 2005;38:1543-1552.
55. Kim HS, Manevich Y, Feinstein SI, Pak JH, Ho YS, Fisher AB. Induction of 1-cys peroxiredoxin expression by oxidative stress in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L363-369.
56. Mari M, Morales A, Colell A, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Signal* 2009;11:2685-2700.
57. Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J* 1999;13:1169-1183.
58. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 2009;30:42-59.
59. Tarver H, Schmidt CL. The urinary sulfur partition in normal and cystinuric dogs fed labeled methionine. *J Biol Chem* 1947;167:387-394.
60. Mato JM, Corrales FJ, Lu SC, Avila MA. S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. *FASEB J* 2002;16:15-26.

61. Dalton TP, Chen Y, Schneider SN, Nebert DW, Shertzer HG. Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1511-1526.
62. Grant CM, MacIver FH, Dawes IW. Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide gamma-glutamylcysteine. *Mol Biol Cell* 1997;8:1699-1707.
63. Shi ZZ, Habib GM, Rhead WJ, Gahl WA, He X, Sazer S, Lieberman MW. Mutations in the glutathione synthetase gene cause 5-oxoprolinuria. *Nat Genet* 1996;14:361-365.
64. DeLeve LD, Kaplowitz N. Importance and regulation of hepatic glutathione. *Semin Liver Dis* 1990;10:251-266.
65. Bodeker G, Kronenberg F. A public health agenda for traditional, complementary, and alternative medicine. *Am J Public Health* 2002;92:1582-1591.
66. Organization WH. *Traditional Medicine World Health Organization*; 1996.
67. Nicolau K, Montagnon, T. . *Molecules that changed the world*. In. Alemania: Wiley-VCH; 2008.
68. Chin YW, Balunas MJ, Chai HB, Kinghorn AD. Drug discovery from natural sources. *AAPS J* 2006;8:E239-253.
69. Newman DJ. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? *J Med Chem* 2008;51:2589-2599.
70. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 2007;70:461-477.
71. Harvey AL. Natural products in drug discovery. *Drug Discov Today* 2008;13:894-901.

72. Paterson I, Anderson EA. Chemistry. The renaissance of natural products as drug candidates. *Science* 2005;310:451-453.
73. Gullo VP, McAlpine J, Lam KS, Baker D, Petersen F. Drug discovery from natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2006;33:523-531.
74. Pramyothin P, Ngamtin C, Pongshompoo S, Chaichantipyuth C. Hepatoprotective activity of *Phyllanthus amarus* Schum. et. Thonn. extract in ethanol treated rats: in vitro and in vivo studies. *J Ethnopharmacol* 2007;114:169-173.
75. Mansour SZ, El-Kabany H. Effects of *Fructus Piperis Longi* extract on fibrotic liver of gamma-irradiated rats. *Chin Med* 2009;4:2.
76. Qureshi N, Kuchekar, B., Logade, N., Haleem, M. . Antioxidant and hepatoprotective activity of *Cordia macleodii* Leaves. *Saudi Pharmaceutical Journal* 2009;17:299-302.
77. Gao J, Sun CR, Yang JH, Shi JM, Du YG, Zhang YY, Li JH, et al. Evaluation of the hepatoprotective and antioxidant activities of *Rubus parvifolius* L. *J Zhejiang Univ Sci B* 2011;12:135-142.
78. Sahreen S, Khan MR, Khan RA. Hepatoprotective effects of methanol extract of *Carissa opaca* leaves on CCl₄-induced damage in rat. *BMC Complement Altern Med* 2011;11:48.
79. Alshawsh MA, Abdulla MA, Ismail S, Amin ZA. Hepatoprotective Effects of *Orthosiphon stamineus* Extract on Thioacetamide-Induced Liver Cirrhosis in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011;2011:103039.
80. Amin ZA, Bilgen M, Alshawsh MA, Ali HM, Hadi AH, Abdulla MA. Protective Role of *Phyllanthus niruri* Extract against Thioacetamide-Induced Liver Cirrhosis in Rat Model. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012;2012:241583.

81. Miliauskas G, Mulder E, Linssen JP, Houben JH, van Beek TA, Venskutonis PR. Evaluation of antioxidative properties of *Geranium macrorrhizum* and *Potentilla fruticosa* extracts in Dutch style fermented sausages. *Meat Sci* 2007;77:703-708.
82. Miguel OG, Calixto JB, Santos AR, Messana I, Ferrari F, Cechinel Filho V, Pizzolatti MG, et al. Chemical and preliminary analgesic evaluation of geraniin and furosin isolated from *Phyllanthus sellowianus*. *Planta Med* 1996;62:146-149.
83. Toshkova R, Nikolova N, Ivanova E, Ivancheva S, Serkedjieva J. In vitro investigation on the effect of a plant preparation with antiviral activity on the functions of mice phagocyte cells. *Pharmazie* 2004;59:150-154.
84. Kuklinski C. *Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona, España: Omega, 2000.
85. Maldonado PD, Rivero-Cruz I, Mata R, Pedraza-Chaverri J. Antioxidant activity of A-type proanthocyanidins from *Geranium niveum* (Geraniaceae). *J Agric Food Chem* 2005;53:1996-2001.
86. Wu N, Zu Y, Fu Y, Kong Y, Zhao J, Li X, Li J, et al. Antioxidant activities and xanthine oxidase inhibitory effects of extracts and main polyphenolic compounds obtained from *Geranium sibiricum* L. *J Agric Food Chem* 2010;58:4737-4743.
87. Shim JU, Oh PS, Lim KT. Anti-inflammatory activity of ethanol extract from *Geranium sibiricum* Linne. *J Ethnopharmacol* 2009;126:90-95.
88. Shim JU, Lim KT. Antioxidative activity of glycoprotein isolated from *Geranium sibiricum* Linne. *Nat Prod Res* 2009;23:375-387.
89. Gayosso-De-Lucio J, Torres-Valencia M, Rojo-Dominguez A, Najera-Pena H, Aguirre-Lopez B, Salas-Pacheco J, Avitia-Dominguez C, et al. Selective inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by brevifolin carboxylate derivatives isolated from *Geranium bellum* Rose. *Bioorg Med Chem Lett* 2009;19:5936-5939.

90. Villavicencio N. M. A. P-EBE, Ramírez A. A. Plantas Útiles del Estado de Hidalgo II. 1ª ed. Pachuca Hidalgo, México Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 2002.
91. Vargas-Picazo MT. Evaluación del efecto hepatoprotector de la especie *Geranium shiedeianum* en un modelo de daño hepático inducido por tioacetamida en ratas. Pachuca, Hidalgo, México: Universad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2011.
92. Corao-Méndez G, García, M., Rondón M., Borges L., Cova JA. . Cambios histológicos en la piel de ratones expuestos al pericarpio de la granada. Rev Fac Farm 2009; 51 15-19.
93. Okuda T, Mori K, Terayama K, Higuchi K, Hatano T. [Isolation of geraniin from plants of Geranium and Euphorbiaceae (author's transl)]. Yakugaku Zasshi 1979;99:543-545.
94. Lin SY, Wang CC, Lu YL, Wu WC, Hou WC. Antioxidant, anti-semicarbazide-sensitive amine oxidase, and anti-hypertensive activities of geraniin isolated from *Phyllanthus urinaria*. Food Chem Toxicol 2008;46:2485-2492.
95. Okabe S, Suganuma M, Imayoshi Y, Taniguchi S, Yoshida T, Fujiki H. New TNF-alpha releasing inhibitors, geraniin and corilagin, in leaves of *Acer nikoense*, Megusurino-ki. Biol Pharm Bull 2001;24:1145-1148.
96. Yang Y, Zhang L, Fan X, Qin C, Liu J. Antiviral effect of geraniin on human enterovirus 71 in vitro and in vivo. Bioorg Med Chem Lett 2012;22:2209-2211.
97. Agyare C, Lechtenberg M, Deters A, Petereit F, Hensel A. Ellagitannins from *Phyllanthus muellerianus* (Kuntze) Exell.: Geraniin and furosin stimulate cellular activity, differentiation and collagen synthesis of human skin keratinocytes and dermal fibroblasts. Phytomedicine 2011;18:617-624.
98. Londhe JS, Devasagayam TP, Foo LY, Ghaskadbi SS. Radioprotective properties of polyphenols from *Phyllanthus amarus* Linn. J Radiat Res 2009;50:303-309.

99. Ushio Y, Fang T, Okuda T, Abe H. Modificational changes in function and morphology of cultured macrophages by geraniin. *Jpn J Pharmacol* 1991;57:187-196.
100. R. BH. Antioxidative Role of Geraniin in lipid peroxidation of human LDL. *J Life Sci* 2004;14:180-187.
101. Ishimoto H, Tai A, Yoshimura M, Amakura Y, Yoshida T, Hatano T, Ito H. Antioxidative properties of functional polyphenols and their metabolites assessed by an ORAC assay. *Biosci Biotechnol Biochem* 2012;76:395-399.
102. Ito H. Metabolites of the ellagitannin geraniin and their antioxidant activities. *Planta Med* 2011;77:1110-1115.
103. Sueishi Y, Ishikawa M, Yoshioka D, Endoh N, Oowada S, Shimmei M, Fujii H, et al. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of cyclodextrin-solubilized flavonoids, resveratrol and astaxanthin as measured with the ORAC-EPR method. *J Clin Biochem Nutr* 2012;50:127-132.
104. Hasan A, Sadiq A, Abbas A, Mughal E, Khan KM, Ali M. Isolation and synthesis of flavonols and comparison of their antioxidant activity. *Nat Prod Res* 2010;24:995-1003.
105. Tiwari AK, Srinivas PV, Kumar SP, Rao JM. Free radical scavenging active components from *Cedrus deodara*. *J Agric Food Chem* 2001;49:4642-4645.
106. Frankel EN. Antioxidant activity by headspace gas chromatography of volatile oxidation products of omega-6 and omega-3 polyunsaturated lipids. *Methods Enzymol* 1999;299:190-201.
107. Stief TW. The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Med Hypotheses* 2003;60:567-572.
108. Morales J, Gunther G, Zanocco AL, Lemp E. Singlet oxygen reactions with flavonoids. A theoretical-experimental study. *PLoS One* 2012;7:e40548.

109. Tatsimo SJ, Tamokou Jde D, Havyarimana L, Csupor D, Forgo P, Hohmann J, Kuate JR, et al. Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. *BMC Res Notes* 2012;5:158.
110. Puppala D, Gairola CG, Swanson HI. Identification of kaempferol as an inhibitor of cigarette smoke-induced activation of the aryl hydrocarbon receptor and cell transformation. *Carcinogenesis* 2007;28:639-647.
111. Aniya Y, Koyama T, Miyagi C, Miyahira M, Inomata C, Kinoshita S, Ichiba T. Free radical scavenging and hepatoprotective actions of the medicinal herb, *Crassocephalum crepidioides* from the Okinawa Islands. *Biol Pharm Bull* 2005;28:19-23.
112. Chen CY, Milbury PE, Lapsley K, Blumberg JB. Flavonoids from almond skins are bioavailable and act synergistically with vitamins C and E to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation. *J Nutr* 2005;135:1366-1373.
113. Rao V, Balachandran B, Shen H, Logan A, Rao L. In vitro and in vivo antioxidant properties of the plant-based supplement greens+. *Int J Mol Sci* 2011;12:4896-4908.
114. Del Rio D, Borges G, Crozier A. Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *Br J Nutr* 2010;104 Suppl 3:S67-90.
115. Del Rio D, Calani L, Cordero C, Salvatore S, Pellegrini N, Brighenti F. Bioavailability and catabolism of green tea flavan-3-ols in humans. *Nutrition* 2010;26:1110-1116.
116. Crozier A, Del Rio D, Clifford MN. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Mol Aspects Med* 2010;31:446-467.
117. Seeram NP, Henning SM, Zhang Y, Suchard M, Li Z, Heber D. Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *J Nutr* 2006;136:2481-2485.

118. Gonzalez-Barrio R, Edwards CA, Crozier A. Colonic catabolism of ellagitannins, ellagic acid, and raspberry anthocyanins: in vivo and in vitro studies. *Drug Metab Dispos* 2011;39:1680-1688.
119. Thomson P. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. In; 2008. p. http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo_gbc.php?bib_vv=6
120. Huerta C. La Herbolaria: Mito o realidad. *CONAVBIO. Biodiversitas* 1997;12:1-7.
121. Seguí P, Olivares, H. Plantas medicinales: Posible riesgo preoperatorio. *Anales Médicos* 2005;50:80-84.
122. Taddei BG SM, Romero CJ, Romero TM. . Aceptación y uso de herbolaria en medicina familiar. *Sal Pub Mex* 1999; 41: 216-220.
123. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 Etplp, cuidado , laboratorio. yudlad. In.
124. NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 Pa-Sa-Rpb-i-Cyedm. In.
125. T. MH. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. . *J. Biol Chem* 1937;112:481-491.
126. Martinek RG. Improved micro-method for determination of serum bilirubin. *Clin Chim Acta* 1966;13:161-170.
127. Yeh CN, Maitra A, Lee KF, Jan YY, Chen MF. Thioacetamide-induced intestinal-type cholangiocarcinoma in rat: an animal model recapitulating the multi-stage progression of human cholangiocarcinoma. *Carcinogenesis* 2004;25:631-636.
128. Rodrigues GR, Di Naso FC, Porawski M, Marcolin E, Kretzmann NA, Ferraz Ade B, Richter MF, et al. Treatment with aqueous extract from *Croton cajucara* Benth reduces hepatic oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. *J Biomed Biotechnol* 2012;2012:902351.

129. Bak MJ, Jun M, Jeong WS. Antioxidant and Hepatoprotective Effects of the Red Ginseng Essential Oil in H₂O₂-Treated HepG2 Cells and CCl₄-Treated Mice. *Int J Mol Sci* 2012;13:2314-2330.
130. Lee HY, Eum WS, Kim DW, Lee BR, Yoon CS, Jang SH, Choi HS, et al. Isolation and identification of an antioxidant enzyme catalase stimulatory compound from *Ganoderma lucidum*. *J Biochem Mol Biol* 2003;36:450-455.
131. Stankova P, Kucera O, Lotkova H, Rousar T, Endlicher R, Cervinkova Z. The toxic effect of thioacetamide on rat liver in vitro. *Toxicol In Vitro* 2010;24:2097-2103.
132. Low TY, Leow CK, Salto-Tellez M, Chung MC. A proteomic analysis of thioacetamide-induced hepatotoxicity and cirrhosis in rat livers. *Proteomics* 2004;4:3960-3974.
133. Wang JH, Shin JW, Choi MK, Kim HG, Son CG. An herbal fruit, *Amomum xanthoides*, ameliorates thioacetamide-induced hepatic fibrosis in rat via antioxidative system. *J Ethnopharmacol* 2011;135:344-350.
134. Roy S, Sannigrahi S, Majumdar S, Ghosh B, Sarkar B. Resveratrol regulates antioxidant status, inhibits cytokine expression and restricts apoptosis in carbon tetrachloride induced rat hepatic injury. *Oxid Med Cell Longev* 2011;2011:703676.
135. Park YS, Ham KS, Kang SG, Park YK, Namiesnik J, Leontowicz H, Leontowicz M, et al. Organic and conventional kiwifruit, myths versus reality: antioxidant, antiproliferative, and health effects. *J Agric Food Chem* 2012;60:6984-6993.
136. Lopes GK, Schulman HM, Hermes-Lima M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim Biophys Acta* 1999;1472:142-152.
137. An G, Gallegos J, Morris ME. The bioflavonoid kaempferol is an Abcg2 substrate and inhibits Abcg2-mediated quercetin efflux. *Drug Metab Dispos* 2011;39:426-432.

138. Barve A, Chen C, Hebbar V, Desiderio J, Saw CL, Kong AN. Metabolism, oral bioavailability and pharmacokinetics of chemopreventive kaempferol in rats. *Biopharm Drug Dispos* 2009;30:356-365.
139. Otake Y, Walle T. Oxidation of the flavonoids galangin and kaempferide by human liver microsomes and CYP1A1, CYP1A2, and CYP2C9. *Drug Metab Dispos* 2002;30:103-105.
140. Silva ID, Rodrigues AS, Gaspar J, Maia R, Laires A, Rueff J. Involvement of rat cytochrome 1A1 in the biotransformation of kaempferol to quercetin: relevance to the genotoxicity of kaempferol. *Mutagenesis* 1997;12:383-390.
141. Walle UK, Walle T. Bioavailable flavonoids: cytochrome P450-mediated metabolism of methoxyflavones. *Drug Metab Dispos* 2007;35:1985-1989.
142. Mikstacka R, Gnojowski J, Baer-Dubowska W. Effect of natural phenols on the catalytic activity of cytochrome P450 2E1. *Acta Biochim Pol* 2002;49:917-925.
143. Harish R, Shivanandappa, T. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*. *Food Chemistry* 2006;95:180-185.
144. Syamasundar KV, Singh B, Thakur RS, Husain A, Kiso Y, Hikino H. Antihepatotoxic principles of *Phyllanthus niruri* herbs. *J Ethnopharmacol* 1985;14:41-44.
145. Girish C, Pradhan SC. Hepatoprotective activities of picroliv, curcumin, and ellagic acid compared to silymarin on carbon-tetrachloride-induced liver toxicity in mice. *J Pharmacol Pharmacother* 2012;3:149-155.