



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD



ÁREA ACADÉMICA DE FARMACIA

“Evaluación del efecto hepatoprotector de la especie *Geranium shiedeanum* en un modelo de daño hepático inducido por tioacetamida en ratas.”

Tesis

Que para obtener el título de Licenciada en Farmacia

Presenta:

P.L.F. María Teresa Vargas Picazo

Directores de Tesis

Dra. Mirandeli Bautista Ávila

Dr. Juan Antonio Gayosso de Lucio

Pachuca de Soto, Hgo. 2011.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE FARMACIA**

Oficio No. 02/2011

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE CONTROL ESCOLAR DE LA UAEH
P R E S E N T E

Por este conducto, le informo que el Jurado asignado a la Pasante de la Licenciatura en Farmacia **María Teresa Vargas Picazo** con número de cuenta 097984, quien presenta el trabajo de tesis denominado **"Evaluación del efecto hepatoprotector de la especie *Geranium shiideanum* en un modelo de daño hepático inducido por tioacetamida en ratas"**, después de revisar el documento preliminar, ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

	Nombre	Firma
Presidente	Dra. Minarda De la O Arciniega	
1er Vocal	Dr. Juan Antonio Gayosso De Lucio	
2o Vocal	Dra. Mirandeli Bautista Ávila	
3er Vocal	Dr. José Antonio Morales González	
Secretario	M. en C. Georgina Almaguer Vargas	
1er Suplente	Dra. Reyna Erika Moreno Martínez	
2o Suplente	Dra. Claudia Velázquez González	

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"
PACHUCA DE SOTO, HGO., A 2 DE SEPTIEMBRE DE 2011

M.C. ESP. JOSÉ MARÍA BUSTO VILLARREAL
DIRECTOR DEL ICsA

M. EN C. ANA MARÍA TELLEZ LÓPEZ
JEFA DEL ÁREA ACADÉMICA DE FARMACIA



En el cincuentenario de la Autonomía Universitaria, ICsA educa en valores:
VALOR: Tolerancia ANTIVALOR: Prejuicio

*"Entender que cada persona se encuentra en diferente nivel en el desarrollo de su carácter.
Reconocer y aceptar las diferencias"*

Ex - Hacienda la Concepción, Tilcuautla, Hgo. C.P. 42160.
Tel: (01771) 71 72000 Ext. 5106, Fax: (01771) 71 72000 Ext. 5111.
Correos electrónicos farmacia@uaeh.edu.mx, jefatura_farmacia@hotmail.com.



Agradecimientos

Primeramente doy gracias a Dios por todo lo que me ha permitido vivir y en esta ocasión por permitirme llegar a la meta deseada.

A mis hijos amados: Antonio Javier y Teresa Raquel, ser mamá es algo hermoso y cada día con ustedes, es maravilloso. Hijos gracias por darme todo su cariño y apoyo para cumplir este objetivo, los amo hijos.

A mi esposo, Juanelo gracias mi vida por todo tu cariño y apoyo. La convivencia diaria es una experiencia verdaderamente interesante, gracias por todos los momentos juntos que se nos han concedido.

**A mis padres, gracias por darme la vida, las primeras enseñanzas y su cariño.
A mi padre por las cosas buenas que me ha enseñado, a estudiar, gracias papá.**

En especial a mi madre, Marytey por apoyarme siempre, por todo tu cariño y consejos que incansablemente me has dado, te quiero mucho mamá.

A mis hermanas: Cuquis y Jean, gracias por su cariño y apoyo y sé que siempre contaré con ustedes. Las quiero en las buenas y en las regulares... seguiremos unidas.

A mi asesora, Dra. Mirandely, gracias por todas sus enseñanzas, apoyos y amistad.

A mis amigas Magda, Ana y Yanet y mis amigos Jos, Chalío y Mario por sus momentos agradables en la escuela y sus palabras de aliento para conmigo siempre.

A todos mis profesores, profesoras y amigos del ICSa, que me hay apoyado siempre, a todos, Ana María Téllez, Jose Reynoso, Maricela López, Mini de la O, Ana Luisa Robles, Silvia Escobar, Carmen, Teacher José García, Ramón Montejano, Gyna Almaguer, Claudia Velázquez, Elena y Chehue Olvera compañeros de los diferentes semestres, gracias por su amistad y apoyo.

Parte del presente trabajo se presentó en el siguiente congreso.

- “Estudio químico y actividad hepatoprotectora de *Geranium shiedeanum*”, 45° Congreso Mexicano de Química y 29° Congreso Nacional de Educación Química, del 18 al 22 de Septiembre de 2010. Riviera Maya, Quintana Roo, México.

ÍNDICE

	RESUMEN	iii
	ÍNDICE DE ABREVIATURAS	v
	ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	vii
	ÍNDICE DE GRÁFICAS Y ESQUEMAS	ix
I	INTRODUCCIÓN	1
II	ANTECEDENTES	4
2.1	HÍGADO	4
2.1.1	Estructura	5
2.1.1.1	Sistema portal hepático	6
2.1.1.2	Lobulillos hepáticos	7
2.1.1.3	Circulación enterohepática	9
2.1.2	Funciones	12
2.2	MARCADORES BIOQUÍMICOS DE DAÑO HEPÁTICO	13
2.2.1	Alanino-aminotransferasa (ALT/ TGP)	14
2.2.2	Aspartato-aminotransferasa (AST/TGO)	14
2.2.3	Bilirrubina total y directa	16
2.3	MECANISMOS DE HEPATOTOXICIDAD	16
2.3.1	Metabolismo hepático de la tioacetamida	19
2.4	Formación de especies químicas reactivas	21
2.4.1	Sistemas de defensa antioxidante	22
2.4.1.1	Endógenos	22
2.4.1.2	Exógenos	24
2.4.1.2.1	Fármacos	24
2.4.1.2.2	Plantas medicinales	26
2.5	GÉNERO GERANIUM	29
III	JUSTIFICACIÓN	32
IIV	HIPÓTESIS	34

V	OBJETIVOS	35
VI	METODOLOGÍA	36
7.1	Productos y reactivos	36
7.2	Equipo	36
7.3	Obtención e identificación del material vegetal	37
7.3.1	Obtención del extracto crudo	37
7.3.2	Fraccionamiento del extracto crudo	37
7.4	Ensayo de toxicidad aguda.	38
7.5	Evaluación Hepatoprotectora	40
7.5.1	Animales y tratamiento	40
7.5.2	Obtención del suero	42
7.5.3	Determinaciones en suero	43
7.5.3.1	Aspartato aminotransferasa (AST)	43
7.5.3.2	Alanina aminotransferasa (ALT)	43
7.5.3.3	Bilirrubina total (TBIL) y directa (DBIL)	44
7.6	Análisis estadístico	45
VII	RESULTADOS	46
7.7	Aislamiento de los compuestos de <i>Geranium shiedeanum</i>	46
7.8	Ensayo de toxicidad aguda DL ₅₀	49
7.9	Evaluación Hepatoprotectora	50
7.9.1	Determinación sérica de Aspartato aminotrasferasa	50
7.9.2	Determinación sérica de Alanina aminotrasferasa	53
7.9.3	Determinación sérica de Bilirrubina total	54
7.9.4	Determinación sérica de Bilirrubina directa	57
VIII	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	59
IX	CONCLUSIONES	62
X	BIBLIOGRAFÍA	63
XII	ANEXOS	75

RESUMEN

El género *Geranium* comprende alrededor de 300 especies que en la medicina tradicional se usan como antipiréticos, purgantes y antidiarréicos. Sin embargo, a la fecha no existe suficiente evidencia científica que corrobore estas propiedades terapéuticas. En el presente trabajo, se evaluó el efecto hepatoprotector del extracto de la especie *G. shiedeantum* en un modelo de daño hepático inducido por tioacetamida en ratas. Así mismo, se determinó la dosis letal media (DL₅₀). Después de la obtención del extracto se aislaron los compuestos mayoritarios. Posteriormente, ratas Wistar de aprox. 200g fueron pre-tratadas o no con una dosis del EGs (100mg/kg) cada 24h por tres días, y en el último día, fueron administradas con una dosis única IP, de TA (100mg/ml). Se obtuvieron muestras séricas a las 0, 24, 48, 72 y 96 h después de la TA. Se cuantificaron distintas enzimas marcadoras de daño hepático como la AST, ALT y la bilirrubina total y directa. Los resultados encontrados evidenciaron una significativa disminución del daño hepático en el grupo pre-tratado con el extracto crudo con una disminución significativa de la lesión para la AST y la ALT a las 24 h, pico máximo de regeneración, así como para los niveles de bilirrubina total y directa. La DL₅₀ obtenida es >5000 mg/kg. Los resultados obtenidos indican que el EGs demostró actividad hepatoprotectora, sin embargo, es necesario realizar más pruebas de diferentes marcadores bioquímicos que nos ayuden a esclarecer el mecanismo de hepatoprotección.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
ALT	Alanino aminotrasferasa
AST	Aspartato aminotrasferasa
ASTM	American Standard meditation
CAM	Uso de tratamientos complementarios y alternativos
CCF	Cromatografía en capa fina
CCF	Cromatografía en capa fina
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CH ₃ -CSNH ₂	Fórmula química de la tioacetamida
CHCl ₃	Cloroformo
cm	centímetros
CYP 450 2E1	Citocromo P 450 2E1
DL ₅₀	Dosis letal media
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGs	Extracto de <i>Geranium shiedeatum</i>
<i>et al.</i>	<i>Abreviatura del Latin "et al.ii" y otros colaboradores</i>
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FeCl ₃	Cloruro férrico
g	Gramos
G.	<i>Geranium</i>
GHS	Glutati3n reducido
GPx	Glutati3n peroxidasa
H	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido
INH	Isoniazida
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IP	Intraperitoneal
Kg	Kilogramo
L	Litro
LDH	Lactato deshidrogenasa
MeOH	Alcohol metílico
Mg	Miligramo
MHz	mega Hertz
ml	Militros
mm	milímetros
mmol	milimol
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato reducido
nm	Nanómetros
NO	Óxido nítrico
NOM	Norma oficial mexicana

OMS	Organización Mundial de la Salud
P450	Citocromo P450
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RPBI	Residuos peligrosos biológico infecciosos
rpm	Revoluciones por minuto
SD	Desviación estándar
Se-GPx	Glutación peroxidasa selenio dependiente
Sílica 60 F ²⁵⁴	Sílica gel malla 60 con indicador de fluorescencia 254nm
SOD	Superóxido dismutasa
TA	Tioacetamida
TASO	Tioacetamida-sulfóxido
TASO ₂	Tioacetamida-S, S-óxido
TBIL	Bilirrubina total
TGO	Transaminasa glutámico oxaloacética
TGP	Transaminasa glutámico pirúvica
UV	Ultravioleta

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1.	Compuestos que excreta el hígado a los conductos biliares.	11
Tabla 2.	Principales funciones hepáticas.	13
Tabla 3.	Fármacos hepatoprotectores.	26
Tabla 4	Especies con actividad Hepatoprotectora.	28
Tabla 5.	Estimación de la DL ₅₀ para el extracto de <i>Geranium shiedeanum</i> de acuerdo al método de Lorke.	50

FIGURAS

Figura 1.	Estructura microscópica del hígado.	5
Figura 2.	Flujo de sangre y de bilis en un lobulillo hepático.	8
Figura 3.	Circulación enterohepática.	12
Figura 4.	Estructura química de la tioacetamida.	20
Figura 5.	Administración intraperitoneal de TA.	43
Figura 6.	Administración intragástrica de <i>G. shiedeanum</i> .	43
Figura 7.	Compuesto I.	50
Figura 8.	Compuesto II.	50
Figura 9.	Compuesto III.	50
Figura 10.	Compuesto IV.	50

ÍNDICE DE GRÁFICAS Y ESQUEMAS

GRÁFICAS

- Gráfica 1.** Efecto del pretratamiento con EGs (100mg/Kg de peso) sobre la actividad de la AST en suero de ratas intoxicadas con una dosis subletal de TA (100mg/ml). Las muestras fueron obtenidas a las 0, 24, 48, 72 y 96 h de la administración de TA. Los resultados, expresados en U/L, fueron la media \pm SD de los valores obtenidos por duplicado en suero de cuatro animales diferentes para cada condición. Las diferencias frente a los respectivos controles están representadas como (a) y las diferencias debidas al extracto como (b) $p < 0.05$. 54
- Gráfica 2.** Efecto del pretratamiento con EGs (100mg/Kg de peso) sobre la actividad de la ALT en suero de ratas intoxicadas con una dosis subletal de TA (100mg/ml). Las muestras fueron obtenidas a las 0, 24, 48, 72 y 96 h de la administración de TA. Los resultados, expresados en U/L, fueron la media \pm SD de los valores obtenidos por duplicado en suero de cuatro animales diferentes para cada condición. Las diferencias frente a los respectivos controles están representadas como (a) y las diferencias debidas al extracto como (b) $p < 0.05$. 56
- Gráfica 3.** Efecto del pretratamiento con EGs (100mg/Kg de peso) sobre la actividad de la Bilirrubina total en suero de ratas intoxicadas con una dosis subletal de TA (100mg/ml). Las muestras fueron obtenidas a las 0, 24, 48, 72 y 96 h de la administración de TA. Los resultados, expresados en mg/dL, fueron la media \pm SD de los valores obtenidos por duplicado en suero de cuatro animales diferentes para cada condición. Las diferencias frente a los respectivos controles están representadas como (a) y las diferencias debidas al extracto como (b) $p < 0.05$. 58
- Gráfica 4.** Efecto del pretratamiento con EGs (100mg/Kg de peso) sobre la cuantificación de la Bilirrubina directa (DBIL) en suero de ratas intoxicadas con una dosis subletal de TA (100mg/ml). Las muestras fueron obtenidas a las 0, 24, 48, 72 y 96 h de la administración de TA. Los resultados, expresados en mg/dL, fueron la media \pm SD de los valores obtenidos por duplicado en suero de cuatro animales diferentes para cada condición. Las diferencias frente a los respectivos controles están representadas como (a) y las diferencias debidas al extracto como (b) $p < 0.05$. 60

ESQUEMAS

Esquema 1.	Obtención de suero a distintos intervalos de tiempo (0, 24, 48, 72 y 96 h).	44
Esquema 2.	La oxidación del NADH en el medio es directamente proporcional a la concentración catalítica de AST en suero.	45
Esquema 3.	La oxidación del NADH en el medio es directamente proporcional a la concentración catalítica de ALT en suero.	45
Esquema 4.	Ácido gálico I , 3-O- α -L-arabinofuranósido-7-O- β -D-ramnósido de Kaemferol II , acetnil geraniina III y ácido elágico IV .	49

I. INTRODUCCIÓN

La cirrosis es una enfermedad del hígado y es la causa más importante y común de mortalidad humana en muchos países occidentales, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2004 México ocupaba el doceavo lugar de ciento noventa y dos países, por cada 100,000 personas, 27 mueren por ésta causa (OMS, 2004).

En nuestro país, en el 2008 las enfermedades hepáticas constituyen la quinta causa de mortalidad general y representan el 5.3% del total de las defunciones; que es la etapa final de las patologías hepáticas de diferentes etiologías y conduce a la disfunción crónica del hígado, acompañado por importantes alteraciones metabólicas por lo que supone un alto costo para la sociedad (Secretaría de Salud, 2008). Además también se diagnosticaron 11,990 casos de enfermedad hepática de los cuales en el estado de Hidalgo se diagnosticaron 906 casos (Córdova *et al*, 2011) Hasta la fecha, ningún tratamiento ha demostrado ser eficaz para prevenir o evitar el avance de la cirrosis y, en la mayoría de los casos, la enfermedad hepática terminal sugiere el trasplante de hígado que está limitado por la escasez de órganos donantes. Por lo que independientemente de su etiología (alcohol, virus, fármacos, tóxicos, patología biliar, enfermedades genéticas, etc.), el desarrollo de alternativas

terapéuticas es un objetivo fundamental de la investigación actual para atenuar el sufrimiento de muchos enfermos (Galisteo *et al*, 2006).

Al día de hoy, el uso de medicamentos en el tratamiento de las enfermedades del hígado, es en muchos de los casos inadecuado sin contar que puede tener efectos adversos graves. La hepatotoxicidad inducida por fármacos se considera un efecto adverso potencialmente grave en tratamientos antituberculosos actuales que contienen: isoniazida, pirazinamida y aflatoxina (Sharmila *et al*, 2009). Por tal motivo, existe una tendencia mundial de regresar al uso tradicional de plantas medicinales, ya que muchos productos naturales a base de plantas se utilizan para el tratamiento de estas y otras enfermedades.

El uso de tratamientos complementarios y alternativos (CAM) es una práctica común en México y el mundo, se estima que el 80% de las personas usan un método alternativo de tratamiento para aliviar sus problemas de salud sin que su médico esté enterado (Shaikh *et al*, 2008) (Barnes *et al*, 2008).

Y se puede decir, que al menos un 70 % de estos tratamientos alternos son hechos a base de plantas medicinales (Gómez-Martínez y Tlacuilo-Parra, 2007). En general, estos remedios no cuentan con el respaldo de estudios químicos y/o farmacológicos que demuestren su eficacia y seguridad (Cassileth B. y Deng G., 2004). Por otro lado, el 57 % de los fármacos que actualmente se usan en el mercado, son directamente

un producto natural o derivados de estos (Newman D., 2008), de ahí la importancia del estudiar la actividad biológica de estos.

En este estudio se evaluó el efecto de protección hepática de la parte aérea de *Geranium shiedeanum*, el cual no ha sido estudiado desde el punto de vista farmacológico.

II. ANTECEDENTES

2.1 HÍGADO

El hígado está localizado en el cuadrante superior derecho del abdomen, en el espacio peritoneal justo por debajo del diafragma, y bajo la parrilla costal y en la cavidad abdominal, se extiende a través del lado izquierdo del cuerpo por encima del borde superior del estómago, de color marrón rojizo, pesa aproximadamente 1.3 kg en los varones adultos y tiene el tamaño de una pelota de fútbol americano. Se divide en dos lóbulos predominantes, izquierdo y derecho. El lóbulo derecho tiene dos segmentos de menor tamaño: lóbulo caudado posterior y cuadrado inferior y el lóbulo izquierdo, el medio y el caudado. Aunque el hígado es considerado el mayor órgano interno; en cierto sentido su espesor es sólo de una o dos células. Los lóbulos hepáticos se encuentran formados por unidades más pequeñas llamadas lobulillos aproximadamente de 50.000 a 100.000 lobulillos, que se conectan con pequeños conductos que, finalmente forman el conducto hepático, el cual transporta la bilis producida por las células del hígado hacia la vesícula biliar y el duodeno (Mc Phee, 2011).

2.1.1 Estructura

El hígado tiene un espesor de sólo una a dos células. Esto se debe a que las células hepáticas, o hepatocitos, forman láminas, éstas están separadas entre sí por grandes espacios capilares denominados sinusoides como se puede observar en la **Figura 1**.

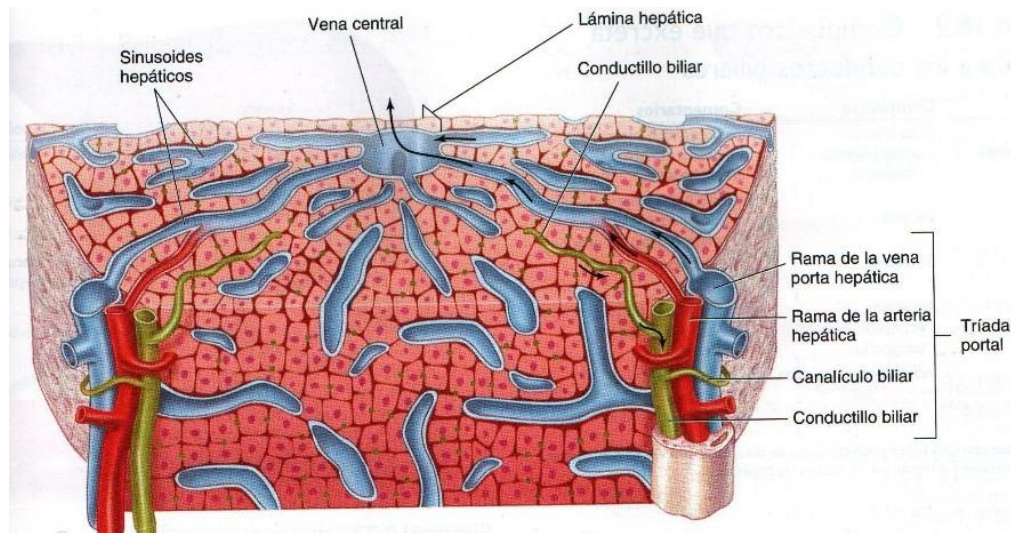


Figura 1. Estructura microscópica del hígado. La sangre penetra en el lobulillo hepático a través de los vasos de la triada portal, pasa por los sinusoides hepáticos y abandona el lobulillo a través de la vena central. Las venas centrales convergen y forman las venas hepáticas que transportan la sangre venosa desde el hígado.

Los sinusoides poseen poros extremadamente grandes, denominados fenestras y, a diferencia de otros capilares, carecen de membrana basal. Esto hace que los sinusoides hepáticos sean mucho más permeables que otros capilares, permitiendo incluso el paso de proteínas plasmáticas con moléculas apolares unidas a las proteínas, como el colesterol. Los sinusoides contienen también células de Kupffer, que forman parte del sistema reticuloendotelial. Las fenestras, la falta de membrana

basal y la estructura laminar del hígado proporcionan un contacto íntimo entre los hepatocitos y el contenido de la sangre.

El hígado posee una asombrosa capacidad de regeneración, debida a la división mitótica de los hepatocitos existentes. Cuando dicho órgano sufre una lesión debida a toxinas o infecciones se produce la muerte de los hepatocitos y entonces comienza la división celular para regenerarse hasta restablecer la masa original y en este punto cesa la división celular. Estas lesiones pueden producir fibrosis hepática, donde hay una acumulación de fibras de colágeno y matriz extracelular y conducir a cirrosis, muerte del tejido hepático normal el cual es sustituido por un tejido fibroso o cicatricial. Los hepatocitos pierden su arquitectura normal y el lobulillo hepático se convierte en un conglomerado de células y tejido fibroso. Esta pérdida de estructura del lobulillo lo incapacita para realizar sus funciones.

2.1.1.1 Sistema portal hepático

El hígado recibe un doble aporte de sangre, la arterial con elevada presión, a través de la arteria hepática y la venosa con menor presión, a través de la vena porta, procedente del drenaje venoso esplénico. La arteria hepática aporta oxígeno mientras que la vena porta transfiere sustancias nutritivas absorbidas por el tracto gastrointestinal para su metabolismo y eliminación. El eflujo de la sangre se verifica a través de una vena común, la vena hepática.

Los productos de la digestión que se absorben a los capilares sanguíneos del intestino no penetran directamente en la circulación general. En lugar de ello, esta sangre se transporta primero al hígado. Los capilares del tubo digestivo descargan en la vena porta hepática, que transporta esta sangre a los capilares del hígado. No es hasta después de haber pasado a través de este segundo lecho capilar cuando penetra en la circulación general a través de la vena hepática que descarga en el hígado.

El término sistema portal se emplea para describir este patrón triangular de circulación: capilares ➡ vena ➡ capilares ➡ vena. Además de recibir sangre venosa del intestino, el hígado recibe también sangre arterial a través de la arteria hepática.

2.1.1.2 Lobulillos hepáticos

Las láminas hepáticas están dispuestas en unidades funcionales denominadas lobulillos hepáticos. En el centro de cada lobulillo existe una vena central, y en la periferia de cada lobulillo hay ramas de la vena porta hepática y de la arteria hepática, que se abren a los sinusoides que existen entre las láminas hepáticas.

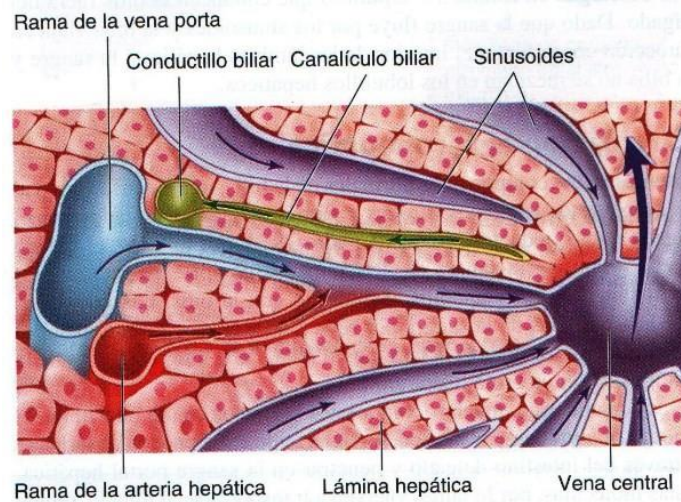


Figura 2. Flujo de sangre y de bilis en un lobulillo hepático.

La sangre arterial y la sangre venosa portal, que contiene moléculas absorbidas en el tubo digestivo, se mezclan cuando la sangre fluye por los sinusoides desde la periferia del lobulillo a la vena central **Figura 2**. Las venas centrales de diferentes lobulillos hepáticos convergen para formar la vena hepática, que transporta la sangre desde el hígado a la vena cava inferior. La sangre fluye en el interior de los sinusoides desde una vena porta a la vena central. La bilis fluye en el interior de las láminas hepáticas desde el centro a los conductillos biliares de la periferia de un lobulillo.

La bilis se produce en los hepatocitos y se segrega a unos finos conductos denominados canalículos biliares, situados en el interior de cada lámina hepática. Estos canalículos biliares descargan en la periferia de cada lobulillo a los conductos biliares, que a su vez descargan en conductos hepáticos que conducen la bilis fuera

del hígado. Dado que la sangre fluye por los sinusoides y la bilis viaja en dirección contraria en el interior de las láminas hepáticas, la sangre y la bilis no se mezclan en los lobulillos hepáticos.

2.1.1.3 Circulación enterohepática

El suministro de sangre del hígado es exclusivo, proviene tanto del corazón a través de la arteria hepática por la cual recibe sangre rica en oxígeno como del tracto digestivo en forma directa a través de un gran vaso sanguíneo llamado la vena porta que le suministra sangre que transporta nutrientes, toxinas y otras sustancias absorbidas desde el intestino.

El hígado filtra esta sangre y después la envía al corazón mediante la vena hepática. La mayoría de los hígados tienen lobulillos que constan de una vena rodeada por minúsculas células hepáticas llamadas hepatocitos. Estas células purifican la sangre, eliminan los desechos y toxinas y almacenan nutrientes saludables para que el cuerpo los utilice cuando sea necesario.

La circulación y la excreción biliar están compartimentalizadas para facilitar el intercambio entre la sangre y los hepatocitos. La arteria hepática asciende directamente del eje celíaco y se divide en dos ramales: gástrico y gastroduodenal

siguiendo, a través del ligamento hepatoduodenal, como propia arteria hepática, antes de bifurcarse e introducirse en los segmentos del hígado. La vena porta drena el efluente venoso del tracto digestivo y del bazo. En los mamíferos, la vena porta representa el único canal venoso que atraviesa otro órgano, el hígado, antes de retornar al corazón. Al igual que la arteria hepática, la vena porta se bifurca en ramales que se distribuyen en los segmentos hepáticos. Por último, la sangre arterial y venosa portal confluyen en la sinusoides, capilar recubierto por células endoteliales que posee poros o fenestras a través de los cuales circula el plasma sanguíneo, y de ahí drenan, vía vena hepática, en el interior de la vena cava inferior.

Observaciones directas de las oscilaciones en el flujo de la circulación sinusoidal sugieren que el intercambio (entrada y salida) del flujo sanguíneo sinusoidal se regula mediante esfínteres. En algunas especies, las paredes de las venas hepáticas poseen esfínteres musculares potentes, pero en humanos las paredes de estos canales vasculares son muy finas (Ira Fox S, 2008)..

Además de los componentes normales de la bilis, una extensa variedad de compuestos exógenos (fármacos) son segregados por el hígado a los conductos biliares **Tabla 1.**

TIPO	COMPUESTO	COMENTARIO
ENDÓGENOS	Sales biliares,	Alto porcentaje reabsorbido

(Condiciones normales)	urobilinógeno y colesterol.	y sujeto a circulación enterohepática.
	Lecitina	Pequeño porcentaje reabsorbido y sujeto a circulación enterohepática.
	Bilirrubina	Sin circulación enterohepática.
EXÓGENOS (Fármacos)	Ampicilina, estreptomina, tetraciclina,	Alto porcentaje reabsorbido y sujeto a circulación enterohepática.
	Sulfonamidas y penicilinas.	Pequeño porcentaje reabsorbido y sujeto a circulación enterohepática.

Tabla 1. Compuestos que excreta el hígado a los conductos biliares.

Por lo tanto, el hígado puede limpiar la sangre de determinados compuestos retirándolos de la sangre y excretándolos al intestino con la bilis. Las moléculas que son retiradas de la sangre por secreción a la bilis se eliminan por las heces; esto es igual al aclaramiento renal de la sangre a través de la eliminación en la orina.

Sin embargo, muchos compuestos liberados con la bilis al intestino no se eliminan por las heces. Algunos de ellos pueden absorberse a través del intestino delgado y penetrar en la sangre portal hepática. Estas moléculas, por lo tanto, vuelven a transportarse al hígado, donde de nuevo se segregan por los hepatocitos a los conductos biliares. Se dice que los compuestos que recirculan de esta manera entre el hígado y el intestino tienen una circulación entero hepática (Ira Fox S, 2008).

Figura 3.

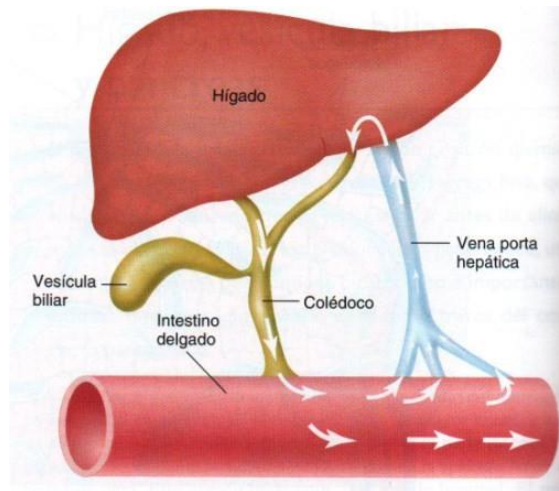


Figura 3. Circulación enterohepática.

2.1.2 Funciones

Como resultado de su gran y variado contenido enzimático y su estructura peculiar, y dado que recibe sangre venosa del intestino, el hígado posee una variedad de funciones mayor que la de cualquier otro órgano del cuerpo. Las principales funciones hepáticas se enlistan en la **Tabla 2**.

Funciones	Acciones
Destoxificación de la sangre	<ul style="list-style-type: none"> • Fagocitosis por la células de Kupffer • Alteración química de moléculas biológicamente activas (hormonas y fármacos) • Producción de urea, ácido úrico y otras moléculas menos tóxicas que los compuestos de partida. • Excreción de moléculas a la bilis
Metabolismo de hidratos de carbono	<ul style="list-style-type: none"> • Conversión de la glucosa sanguínea en glucógeno y grasa • Producción de glucosa a partir del glucógeno hepático y de otras moléculas (aminoácidos, ácido láctico) por gluconeogénesis • Secreción de glucosa a la sangre
Metabolismo lipídico	<ul style="list-style-type: none"> • Síntesis de triglicéridos y colesterol

	<ul style="list-style-type: none"> • Excreción de colesterol en la bilis • Producción de cuerpos cetónicos a partir de ácidos grasos
Síntesis proteica	<ul style="list-style-type: none"> • Producción de albúmina • Producción de proteínas plasmáticas de transporte • Producción de factores de la coagulación (fibrinógeno, protrombina y otros)
Secreción de bilis	<ul style="list-style-type: none"> • Síntesis de sales biliares. • Conjugación y excreción de pigmento biliar (bilirrubina)

Tabla 2. Principales funciones hepáticas.

2.2 MARCADORES BIOQUÍMICOS DE DAÑO HEPÁTICO

Debido a que el hígado es tan complejo, es susceptible a una amplia variedad de trastornos, algunos causados por exceso de alcohol o medicamentos, otros por infecciones como la hepatitis vírica, el cáncer y otros trastornos metabólicos.

Pero el hígado también es resistente, tiene una notable capacidad para regenerarse después de una lesión o inflamación y posee reservas de nutrientes a las cuales puede recurrir cuando es lesionado.

Cuando el hígado está asediado por la hepatitis vírica, sus células hepáticas son destruidas. Inicialmente puede tolerar y resistir este tipo de lesión, debido a la capacidad del hígado para regenerarse y compensar el daño. Esta fase de la enfermedad hepática se denomina enfermedad hepática compensada porque el hígado puede continuar todas sus funciones.

Cuando el hígado ya no puede regenerar el tejido hepático y sus capacidades para filtrar y almacenar nutrientes se ven afectadas por el tejido cicatricial es decir la

fibrosis, esa fase terminal de la enfermedad hepática se denomina enfermedad hepática descompensada, porque el hígado no puede compensar la lesión que se está produciendo.

2.2.1 Alanino-aminotransferasa (ALT/ TGP)

La alanino aminotransferasa o también llamada transaminasa glutámico-pirúvica es una enzima producida por las células hepáticas y tiene ahí su sitio de acción. Interviene en el metabolismo general en las reacciones de transaminación (transferencia del grupo amino de un aminoácido dador en un cetoácido y el cetoácido aceptor en un aminoácido) dando lugar a aminoácidos y cetoácidos distintos de los originales. En todas las enfermedades hepáticas que cursan con necrosis celular existe la elevación de esta enzima (hipertransaminasemia), y es más intensa cuanto más aguda sea la lesión. Las concentraciones de ALT aumentan cuando las células hepáticas están dañadas o se están muriendo. A concentraciones de ALT más elevadas, mayor muerte celular o inflamación del hígado.

2.2.2 Aspartato-aminotransferasa (AST/TGO)

Tal como la enzima ALT, la AST es una enzima producida por las células hepáticas, anteriormente llamada transaminasa glutámico oxaloacética. Esta enzima también es producida por los músculos y puede estar elevada por enfermedades diferentes a

la enfermedad hepática. Por ejemplo, a menudo la AST es alta durante un infarto del miocardio.

En casos de inflamación del hígado, los valores de las transaminasas ALT y AST están elevados. En algunas enfermedades, como la hepatitis alcohólica, las concentraciones de AST pueden ser más altas que las de ALT. Las concentraciones de AST pueden ser normales, y de todas maneras se puede estar presentando daño hepático.

Las concentraciones más altas de AST y ALT se encuentran cuando mueren numerosas células hepáticas. Esto ocurre en enfermedades como la hepatitis B vírica aguda, el pronunciado daño hepático infligido por las toxinas, así como por una sobredosis de paracetamol o un prolongado síncope del sistema circulatorio (choque) cuando el hígado es privado de sangre fresca que trae oxígeno y nutrientes.

Muchos medicamentos también pueden causar concentraciones anómalas de enzimas hepáticas, como: anticonvulsivantes (fenitoína, ácido valproico, carbamacepina y fenobarbital), paracetamol, antibióticos (tetraciclinas, sulfonamidas, isoniacida (INH), sulfametoxazol, trimetoprima, nitrofurantoína, etc), hipocolesterolémicos (estatinas y la niacina), antiarrítmico (amiodarona) y los antidepresivos tricíclicos.

Por lo general, cuando las anomalías de las enzimas hepáticas están relacionadas con medicamentos, se normalizan en el término de semanas o meses después de suspender esos medicamentos.

2.2.3 Bilirrubina total y directa

Pigmento amarillo rojizo formado por la descomposición de la hemoglobina de los glóbulos rojos viejos. Normalmente, el hígado conjuga la bilirrubina, que es excretada en la bilis y pasa por el duodeno para ser eliminada.

Las concentraciones de bilirrubina en la sangre pueden subir debido a sobreproducción, disminución de la absorción por parte del hígado, disminución de la conjugación, disminución de la secreción del hígado o bloqueo de las vías biliares.

En caso de aumento de producción, disminución de absorción del hígado o disminución de la conjugación, la bilirrubina no conjugada, denominada bilirrubina indirecta, estará básicamente elevada.

En casos de disminución de secreción del hígado u obstrucción de las vías biliares, la bilirrubina conjugada o bilirrubina indirecta, estará básicamente elevada.

En caso de enfermedad hepática crónica, por lo general las concentraciones de bilirrubina son estables hasta que haya ocurrido daño hepático considerable y la cirrosis esté presente. En la enfermedad hepática aguda, por lo general la bilirrubina aumenta en relación con la gravedad del proceso agudo.

2.3 MECANISMOS DE HEPATOTOXICIDAD

El hígado es el órgano principalmente encargado del metabolismo de los xenobióticos, y esa es la causa de que sea el hígado el órgano más vulnerable a la lesión tóxica. Las sustancias extrañas son destoxificadas por oxidación, reducción o hidrólisis y posterior conjugación. La oxidación está, en su mayoría catalizada por las monooxigenasas dependientes del NADPH ubicadas en el retículo endoplásmico liso. Este retículo predomina en la región perivenosa, (Waxman y Azaroff, 1992), por ello, no sólo las enzimas generadores de NADPH, sino también las enzimas consumidoras de NADPH como la citocromo P-450 NADPH reductasa y la glutatión reductasa predominan en las inmediaciones del terminal venoso. Por tanto, la biotransformación de los xenobióticos es una función preferencial del espacio venoso, y los hepatocitos ubicados en esta zona muestran una susceptibilidad mayor frente a la agresión electrofílica de los metabolitos reactivos formados a través de las monooxigenasas microsómicas dependientes del citocromo P-450 o de la FAD. Entre las causas más corrientes de lesión hepática se encuentran aquellas producidas en este órgano por efecto de los xenobióticos. Una porción considerable de fármacos y agentes que contaminan el medio ambiente se encuentran clasificados entre los xenobióticos hepatotóxicos, los cuales originan daño hepático de tipo muy diverso: necrosis en su triple aspecto, zonal, masiva o difusa; esteatosis, colestasis, cirrosis, carcinoma hepatocelular y colangiocelular y alteraciones circulatorias intrahepáticas.

La agresión tóxica en el hígado se produce, principalmente a través de la formación de especies químicas reactivas que se generan en el proceso de biotransformación del agente tóxico. Estas especies químicas se clasifican en: compuestos electrofílicos, y radicales libres. Los compuestos electrofílicos tienen la capacidad para reaccionar covalentemente con las macromoléculas celulares. Los radicales libres tienen la capacidad para iniciar la peroxidación lipídica. Estos, al encontrarse en exceso en el interior del hepatocito, reaccionan con el grupo SH del glutatión haciendo disminuir con ello la concentración intracelular de este tripéptido. Estos eventos encadenados con otros, conducen a alteraciones que ocasionan lesiones de tipo funcional y/o estructural, que en casos de intoxicación masiva o de naturaleza idiosincrásica conducen inexorablemente a la muerte celular.

Ante el incesante aumento de agentes químicos a los que se encuentra continuamente sometido el hombre y cualquier ser vivo, la susceptibilidad del hígado a ser lesionado por estos agentes es consecuencia del destacado papel que juega este órgano en el proceso de su biotransformación.

Existen diversas razones que contribuyen a potenciar la vulnerabilidad del hígado frente a la agresión de los xenobióticos. Entre ellas, cabe citar como las más directas aquellas que se derivan de la elevada concentración que alcanzan los tóxicos de naturaleza liposoluble en el interior del órgano, de las transformaciones metabólicas que sufren las sustancias tóxicas en el interior del hepatocito y de la posición del hígado como puerta de entrada hacia los tejidos (Cascales, 1987).

Para abordar el estudio de las disfunciones hepáticas producidas por sustancias tóxicas, se cuenta en la actualidad con una serie de modelos de hepatotoxicidad inducida experimentalmente. Estos modelos proporcionan sistemas in vivo e in vitro de una gran utilidad para profundizar en el conocimiento de los mecanismos responsables de las alteraciones moleculares, funcionales y estructurales y de los mecanismos de defensa que posee el hígado para prevenir o reparar la lesión tóxica (Cascales, 1987).

2.3.1 Metabolismo hepático de la tioacetamida

El xenobiótico Tioacetamida (TA) es un compuesto orgánico que tiene un grupo tioamida similar a los derivados de tiourea, polvo de color blanco, cristalino, con un olor ligero y fácilmente soluble en agua (Gupta D, 1956). Su fórmula química $\text{CH}_3\text{-CSNH}_2$ y su dosis letal media (DL_{50}), es 200mg/Kg de peso (Zimmerman *et al*, 1987) (Kishore *et al*, 1998) (Liapi, *et al* 2009). Al principio se utilizó como fungicida de naranjos, pero en 1943 se detectó su presencia en el zumo con el consiguiente riesgo de salud.

La tioacetamida ha sido utilizada ya varios años en un modelo en ratas para inducir daño hepático. La mayoría de los estudios aceptan que la cirrosis producida por TA es similar a la enfermedad humana. Obviamente, esta aceptación no incluye el agente etiológico pero existe bastante similitud en los cambios histológicos y bioquímicos entre ambos tipos de cirrosis (Zimmerman *et al*, 1987).

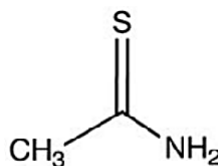


Figura 4. Estructura química de la tioacetamida.

Este hepatotóxico centrilobular potente sufre una bioactivación de dos pasos: a tioacetamida-sulfóxido (TASO) mediado por CYP2E1 microsomal y tioacetamida-S, S-óxido (TASO2) que es el metabolito reactivo. Esto libera óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y del factor nuclear KB, lo que lleva a la necrosis centrilobular (Chen *et al*, 2008). Se metaboliza rápidamente en microsomas de hígado de rata dando lugar a la tioacetamida S-óxido, que se considera el compuesto electrofílico capaz de formar aductos N-ε-acetil lisina con las proteínas y ejercer así sus efectos necrogénicos (Dyroff y Neal, 1981), cirrogénicos y carcinogénicos. El sistema monooxigenasa microsómico, dependiente de flavina, el N, N-dimetil anilina N-oxidante, es el sistema enzimático principalmente responsable del metabolismo de la tioacetamida transformándola a tioacetamida-S-óxido.

La lesión hepática aguda inducida por una dosis necrogénica de tioacetamida se caracteriza por una severa necrosis perivenosa. La necrosis se desarrolla como consecuencia de la biotransformación del compuesto a través de los microsomas

dependiente de flavina monooxigenasa. Los metabolitos reactivos responsables de hepatotoxicidad son los radicales derivados de óxido de tioacetamida y las especies reactivas de oxígeno derivados de subproductos en el proceso de oxidación microsomal, los cuales pueden reducir glutatión reducido que conduce a estrés oxidativo (Andrés, *et al.* 2003) (Mansour, *et al.* 2009). Estas especies electrofílicas tienen capacidad de unirse covalentemente a las macromoléculas celulares, existiendo una estrecha correlación entre la cantidad de estas uniones covalentes y la necrosis celular.

En general se puede afirmar que la cirrosis producida por TA reproduce las alteraciones morfológicas y bioquímicas de la cirrosis humana: hipertensión portal, disminución en el flujo sanguíneo portal, en la excreción hepática, en los contenidos del citocromo P450 y en el glucógeno hepático y elevación de la fosfatasa alcalina sérica.

2.4 Formación de especies químicas reactivas

Muchos compuestos muestran su toxicidad a través de metabolitos reactivos, o como resultado de la generación de especies químicas reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés: Reactive Oxygen Species) o también llamados radicales libres. Estas especies químicas poseen un electrón desapareado en su última capa, lo que les permite reaccionar con un elevado número de moléculas de todo tipo, primero oxidándolas y después atacando sus estructuras (Rodríguez *et al.*, 2001). La

mayoría de los xenobióticos que son transformados por el citocromo P-450 hepático a metabolitos reactivos, causan necrosis perivenosa, debido a que la mayor concentración de citocromo P-450, se encuentra a este nivel. La región periportal, con alto contenido en oxígeno, contiene así mismo la mayor parte de las enzimas del metabolismo intermediario para la síntesis de las proteínas plasmáticas y para el metabolismo de carbohidratos y lípidos. La necrosis de la región periportal se suele asociar con una acción directa de hepatotoxinas, que penetran en el hígado por la vena porta y no requieren bioactivación.

El ritmo mediante el cual el citocromo P-450 se une a los diferentes sustratos para que sean metabolizados, puede ser elevado mediante agentes inductores (Ayrton *et al.*, 1991). La respuesta adaptada a estos agentes, da lugar a un incremento del retículo endoplásmico liso y de la actividad monooxigenasa dependiente del citocromo P-450.

2.4.1 Sistemas de defensa antioxidante

2.4.1.1 Endógenos

Normalmente, el organismo desarrolla moléculas llamadas antioxidantes para eliminar los radicales libres de oxígeno localizados en el hígado (Spalholz *et al.*, 1998). Un antioxidante es aquella molécula capaz de secuestrar un radical libre e incapacitarlo al colisionar con éste, le cede un electrón oxidándose a su vez y

transformándose en una especie reactiva de oxígeno débil no tóxico (Rodríguez *et al*, 2001).

Los sistemas antioxidantes se dividen en tres clases: 1) Sistemas enzimáticos: Catalasa, superóxido dismutasa (SOD) y el glutatión peroxidasa (GPx); 2) Sustancias secuestradoras o atrapadoras o “Scavenger”, que son pequeñas moléculas que limpian el plasma de oxiradicales y 3) Sustancias proteicas que son capaces de secuestrar metales de transición (Torres, 2001).

La SOD se integra de una familia de metaloproteínas presentes en todas las células, representa la primera línea de defensa acelerando la reacción del anión O_2^- a H_2O_2 (Devlin, 2002).

La catalasa se encuentra principalmente en los peroxisomas, los cuales sirven para eliminar el H_2O_2 catalizando una reacción entre dos moléculas de éste radical, resultando en la formación de agua y oxígeno (Nanji y French, 2003).

La GPx juega importante en la detoxificación del H_2O_2 y los peróxidos que se generan en las células, esta convierte los radicales libres en moléculas menos dañinas o impide su formación. Existen dos tipos de glutatión peroxidasa, una Selenio dependiente (Se-GPx) y otra que no contiene selenio (GPx), la Se-GPx es una proteína capaz de catalizar tanto la reducción del peróxido de hidrógeno como de peróxidos orgánicos, mientras que la glutatión peroxidasa no selenio dependiente, solo tiene actividad frente a peróxidos orgánicos (Borrás, 2003).

La GSH es un citoprotector contra los compuesto tóxicos originados por el estrés oxidativo, así mismo la disminución de este antioxidante predispone a esa condición, la cual puede resultar en la lipoperoxidación o en el daño directo a la proteínas de los ácidos nucleicos (Newman, 2008). La disminución mitocondrial del GSH predispone al daño hepático ocasionado por el consumo de etanol dado como resultado una disminución de los niveles celulares del ATP, lo cual puede contribuir en la transición de la permeabilidad mitocondrial; lo que ha sido implicada en el mecanismo primario que contribuye a la apoptosis o necrosis (Lee y Farrell, 2001) Diversas enzimas han emergido a los largo de la evolución, cuya función primaria es disminuir los niveles intracelulares de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en el organismo y por tanto, proporcionar una función protectora frente a los oxidantes biológicos. Entre estos sistemas se encuentran los enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa y glutathion peroxidasa) y los no enzimáticos entre los que ocupa un lugar preeminente el glutathion.

2.4.1.2 Exógenos

2.4.1.2.1 Fármacos

El arsenal farmacológico utilizado para tratar la fibrosis hepática no es muy amplio. De hecho, hoy en día no existe ningún tratamiento específico y los pacientes sólo reciben terapia para las complicaciones (Sáez-Lara, *et al.* 2006).

Fármacos que proveen protección hepática

Silimarina
Vitamina E

Mecanismo de acción

Estabiliza las membranas del hepatocito.
Antioxidante

Vitamina A (β -caroteno)	Antioxidante
Bioprotect*	Antioxidante
X-2*	Antioxidante
(Cocarboxilasa o pirofosfato de tiamina)	
Cholal modificado*	Protege el parénquima hepático
(Factor antitóxico de hígado)	
Colchicina	Inhiben la síntesis de colágeno (Muriel y Rivera-Espinoza 2008).
Corticoesteroides	Antiinflamatorio, reducen la síntesis de citoquinas (Tome y Lucey, 2004).
Interferón α y glicirrizina	Antifibróticos, (Muriel y Rivera-Espinoza 2008).
Curcumina, resveratrol y talidomida	Modulan la actividad de NF-KB (Factor nuclear kappa B), disminuyen el daño de las citoquinas pronecróticas y profibróticas (Muriel y Rivera-Espinoza 2008).
Liv52	Es una mezcla de plantas que procede de la India, comercializada desde hace 50 años, se considera un protector hepático (Muriel y Rivera-Espinoza 2008).
Óxido nítrico (NO)	Inhibidor de la agregación plaquetaria y de la infiltración de neutrófilos, además de prevenir apoptosis (Muriel y Rivera-Espinoza 2008).

Tabla 3. Fármacos hepatoprotectores.

El mayor obstáculo que presenta el desarrollo de fármacos antifibróticos es la dificultad para definir el punto final adecuado en los ensayos clínicos, combinado todo ello con el lento desarrollo de la enfermedad, que puede llevar de años a décadas. La mayoría de éstos fármacos actúan evitando directamente la activación de las células estelares hepáticas, otros, previenen el daño o pérdida de los hepatocitos, o detienen la proliferando de la células del conducto epitelial, a través

del cual se liberan los factores profibrogenéticos que conducen a la fibrosis. Los efectos conseguidos son variables según se trate de fibrosis lobular o biliar, lo que obliga a realizar ensayos preclínicos en modelos animales con ambos tipos de fibrosis (Shuppan y Afdhal 2008).

Por lo que los medicamentos convencionales utilizados en el tratamiento de enfermedades hepáticas son a veces inadecuados y pueden ocasionar efectos adversos graves. Así que existe la tendencia mundial de volver a la medicina patologías hepáticas inducidas por fármacos, es decir efectos secundarios potencialmente graves de regímenes de quimioterapia antituberculosa (isoniazida, pirazinamida y aflatoxina). Se sabe, por estudios en animales que los medicamentos antituberculosos se administran en dosis tóxicas y afectan hígado, membranas y orgánulos. Esto se basa en los elevados niveles de enzimas marcadores de daño hepático: aspartato y alaninoaminotransferasa y fosfatasa alcalina en suero (Sharmila *et al*, 2009).

2.4.1.2.2 Plantas medicinales

El incluir fármacos de origen natural y alimentos crudos en la dieta que poseen antioxidantes, se ha convertido en un foco central de la investigación diseñada para prevenir o mejorar la lesión tisular y puede tener un papel importante para conservar la salud.

En la India, dentro de la medicina tradicional y en el ámbito etnomédico, se utilizan numerosas plantas medicinales en el tratamiento de enfermedades del hígado. Esta práctica se ha convertido en una parte integral de la atención médica, basada en una combinación de uso tradicional e investigación científica. De acuerdo con el interés en las hierbas medicinales se debe tener un mayor escrutinio científico de su potencial terapéutico y su seguridad (Vilwanathan *et al*, 2005).

Se han realizado numerosas pruebas de protección hepática utilizando diferentes especies, en la **Tabla 4** se enlistan estas especies; Sin embargo, pocas mencionan que compuestos contienen éstas.

Especies	Compuesto responsable de la protección
<i>Hygrophila auriculata</i>	Extracto metanólico de las semillas (Singh A y Handa S.-S., 1995.)
<i>Apium graveolens</i>	Extracto metanólico (Singh A y Handa S.-S., 1995.)
<i>Boerhaavia diffusa</i>	Extracto acuoso (Rawat <i>et al.</i> 1997)
<i>Ardostachys jatamansi</i>	Extracto etanólico (Ali <i>et al.</i> , 2000)
<i>Jigrine</i>	Flavonoides (Ahmad <i>et al.</i> 2002)
<i>Rosmarinus tomentosus</i>	Extracto etanólico (Galisteo <i>et al.</i> 2006)
<i>Butea monosperma</i>	Extracto metanólico (Sehrawat <i>et al.</i> 2006)
<i>Gingko biloba</i>	Flavonoides glucosilados y terpenos (Harputluoglu <i>et al.</i> , 2006)
<i>Tamarix gallica</i>	Extracto (Sehrawat y Sultana, 2006)
<i>Phyllanthus maderaspatensis</i>	Extracto hexánico (Asha, 2007)
<i>Solanum nigrum</i>	Extracto (Hsieh <i>et al.</i> 2008)
<i>Tecomella undulata</i>	Extracto etanol-agua (Khatri <i>et al.</i> 2009)
<i>Cleome viscosa</i>	Extracto etanólico (Gupta y Dixit, 2009)
<i>Tephrosia purpurea</i>	Extracto etanol-agua (Khatri <i>et al.</i> 2009)
<i>Anoectochilus formosanus</i>	Extracto acuoso (Wu <i>et al.</i> , 2010)
<i>Anoectochilus formosanus</i>	Extracto (Wu <i>et al.</i> 2010)
<i>Onopordum alexandrinum</i>	Flavonoides glucosilados: 6-methoxy-apigenin (hispidulin), acacetin, apigenin, luteolin, kaempferol, eriodictyol, apigenin-7-O-glucoside, luteolin-7-O-glucoside, and kaempferol-3-O-rutinoside y acacetin-7-O-galacturonide (Salama <i>et al.</i> , 2011)
<i>Phyllanthus acidus</i>	Extracto acuoso (Jain y Singhai , 2011)

Tabla 4. Especies con actividad hepatoprotectora.

2.5 GÉNERO GERANIUM

Desde tiempos inmemoriales los seres humanos han utilizado las plantas para mantener su salud, debido a que contiene numerosos compuestos biológicos activos. En los últimos años las plantas se han convertido en una fuente importante para descubrir nuevos medicamentos. El género *Geranium* (Geraniaceae fam.), comprende alrededor de 300 especies y son utilizadas en la medicina tradicional como agentes: antipiréticos, purgante y antidiarreico, así como contra los dolores renales. En el uso popular, las especies de geranio son utilizados como antiasmáticos, antialérgicos, antihepatotóxicos, diuréticos, tónicos, agentes hemostáticos y antidiabéticos (Neagu *et al.* 2010).

El análisis químico de las plantas pertenecientes a este género ha demostrado la existencia de algunas cantidades importantes de taninos hidrolizables, compuestos fenólicos y flavonoides (Neagu *et al.* 2010), (Şöhretoğlu *et al.*, 2008).

Los compuestos fenólicos, especialmente los flavonoides son componentes principales entre los compuestos biológicos activos de las especies de geranio. Los flavonoides tienen un papel importante en la bioquímica y acción a nivel fisiológico hepatoprotector, antitrombótico, antiinflamatorio, antiviral, antialérgico, antiproliferativo, inmuno-estimulante y anticancerígeno (Neagu *et al.* 2010).

Desde el punto de vista taxonómico el geranio se encuentra dentro de la familia Geraniaceae, que incluye hasta once géneros a los que pertenecen unas 750

especies. *Geranium* y *Pelargonium* son los géneros más conocidos, el primero como planta silvestre y el segundo de tipo ornamental. *Geranium* proviene de “geranos”, que significa grulla (Gómez, *et al.* 2005). Este género se ha caracterizado por contener taninos y flavonoides que le proporcionan actividad antioxidante principalmente.

La actividad biológica de las especies de *Geranium* está bien documentada (Gayosso *et al.*, 2009). Se utilizan tradicionalmente para disminuir diarreas, como por ejemplo *Geranium canescens*, *G. robertianum* y *G. incanum* (Amabeoku, 2009). El *G. sibiricum* Linne y el *G. robertianum* como agente antiinflamatorio (Shima y Limb, 2009) (Amaral, *et al.*, 2009).

Además se han utilizado durante mucho tiempo en la medicina tradicional para la curación de heridas, diarrea, cicatrización de úlceras y como antibacterianos. Estas propiedades se deben a que contienen polifenoles (Kobakhidze y Alaniya, 2003) (Fodorea, *et al.* 2005).

El *Geranium thunbergii* se utiliza en la medicina oriental como antihemorrágico, esterilización, diarrea y astringente (Qing-He, *et al.* 2006).

El *Geranium pratense* fue el más activo de tres geranios en un experimento de actividad antibacterial (Nikita, *et al.* 2007). El *G. pratense* y *macrorrhizum* han

mostrado actividad antioxidante (Myagmar y Aniya, 2000) (Giedrius *et al*, 2004). El *G. carolinianum* y *G. mexicanum* han demostrado actividad antimicrobiana, antiviral y antiprotozoaria respectivamente (Li *et al*, 2008) (Calzada, *et al.* 2005). Los extractos de *sibirum* han demostrado ser útiles en el tratamiento de cáncer de colon y muestra además actividad antiinflamatoria (Huang, *et al.* 2009) (Calza y Lim, 2009).

El *Geranium strictipes* ha mostrado actividad contra *Staphylococcus aureus* (Zuo, *et al.* 2008). Los polifenoles aislados de *Geranium sanguineum* mostraron actividad antioxidante in vivo e in vitro (Murzakhmetova *et al*, 2008). El *Geranium bellum* Rose inhibe de manera selectiva la trifosfato isomerasa del *Trypanosoma cruzi* (Gayosso-De Lucio *et al*, 2009).

Por lo que se ha visto en la literatura y los compuestos que poseen es probable que la especie endémica de nuestro estado provea actividad de protección hepática.

El *Geranium shiedeianum*, motivo de nuestro trabajo es conocido como “Pata de león”, es una planta herbácea perenne, rastrera a ascendente hasta de 60 cm de largo, con flores de pétalos casi siempre morados o rosado-morados, de 15 a 20 mm de largo cuya característica es que presenta dos flores por cada racimo (Rzedowski y Calderón, 1995). Florece de mayo a septiembre en nuestro estado, es empleada de manera tradicional para el tratamiento de fiebres y la inflamación (Villavicencio *et al*, 2002). De ésta especie no se han realizado evaluaciones farmacológicas.

III. JUSTIFICACIÓN

El hígado es el principal órgano implicado en el metabolismo de diversas toxinas y fármacos, dicho metabolismo se encuentra asociado a cambios bioquímicos en los hepatocitos y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Muchos de los daños en el hígado que incluyen desde ictericia, hepatitis a hepatitis necroinflamatoria, cirrosis y carcinoma han sido asociados con el desequilibrio de las ROS. Las principales causas de insuficiencia hepática aguda son la hepatitis viral aguda, fármacos y las lesiones inducidas por toxinas hepáticas (Galisteo *et al*, 2006), por lo que el desarrollo de medicamentos antioxidantes contribuiría a la protección y tratamiento de la lesión y enfermedad hepática, es decir reducir la inflamación y fibrosis hepática por lo tanto enlentecer o incluso prevenir la progresión a cirrosis (Chen *et al*, 2006).

El estado de Hidalgo cuenta con una enorme variedad florística y entre estas se incluyen las plantas medicinales usadas tradicionalmente en la terapéutica, sin embargo, aunque muchas de ellas han sido identificadas químicamente aún no se han realizado suficientes estudios fitoquímicos y farmacológicos para determinar su funcionalidad. Así mismo, un gran número de plantas aromáticas, especias, medicinales y otras contienen compuestos químicos que exhiben propiedades antioxidantes. Se han realizado numerosos estudios en algunas de estas plantas, por ejemplo, romero, salvia, orégano, etc. permitiendo el conocimiento de antioxidantes naturales útiles en las formulaciones de alimentos y cosméticos. Sin embargo, la

información química y farmacológica sobre las propiedades antioxidantes de diversas plantas, especialmente las que son menos utilizadas en la medicina y culinaria, sigue siendo más bien escasa. Por lo tanto, la evaluación de dichas propiedades sigue siendo una tarea interesante y útil de la cual se pueden obtener nuevas fuentes de antioxidantes naturales (Miliauskasa, *et al.* 2004).

Ahora bien, la finalidad de este estudio es evaluar el probable efecto hepatoprotector de la especie de *Geranium shiedeantum* endémica del Estado de Hidalgo en un modelo de daño hepático inducido por el xenobiótico tioacetamida en ratas a través de la medición de biomarcadores de daño. De esta manera, proponer una alternativa natural en el tratamiento de las enfermedades hepáticas que resulte ser eficaz y económicamente accesible para la población.

IV. HIPÓTESIS

Las partes aéreas de *Geranium shiedeantum* son utilizadas en la medicina tradicional por contener antioxidantes, por lo que pueden producir un efecto hepatoprotector frente a un al hepatotóxico tioacetamida.

V. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el probable efecto hepatoprotector de la especie de *Geranium shiedeantum* endémica del Estado de Hidalgo en un modelo de daño hepático inducido por el xenobiótico tioacetamida en ratas.

Objetivos Específicos

1. Obtener el extracto crudo de *Geranium shiedeantum*.
2. Aislar los compuestos mayoritarios del extracto de *G. shiedeantum* por medio de cromatografía en columna y capa fina.
3. Caracterizar los compuestos mayoritarios del extracto de *G. shiedeantum* en base a sus propiedades físicas y espectroscópicas.
4. Determinar la dosis letal 50 (DL₅₀) del extracto de *Geranium shiedeantum* obtenido, en ratas de la cepa Wistar por el método de Lorke.
5. Diagnosticar la intensidad de la lesión hepática inducida por tioacetamida en ratas pre-tratadas o no con el extracto obtenido de *Geranium shiedeantum*, mediante la determinación de parámetros séricos de lesión hepática y muerte celular.

VI. METODOLOGÍA

7.1 Productos y reactivos

- El pienso comercial 2018S de la marca Harlan.
- Tioacetamida de Merck.
- Solución salina fisiológica de PySA.
- Los sustratos, coenzimas y enzimas de la marca comercial Spinreact.
- Sephadex LH-20

7.2 Equipo

- Espectrofotómetro UV-V Agilent, modelo 8453.
- Centrífuga refrigerada eppendorf, modelo 5403.
- Cronómetro Gimex S.A.
- Baño ultrasónico Aquasonic VWR Scientific Products, modelo 550D.
- Autoclave de mesa Sterile Max Harvey, modelo ST75925.
- Balanza OHAUS, modelo AP310-O
- Vortex DAIGGER Genie 2, modelo 22220^a
- Baño María LINDBERG/BLUE, modelo WB1110A.
- Refrigerador SAMSUNG AQT 5000, modelo RT32JBSW
- Báscula ADAM æ Max. 5000g.

7.3 Obtención e identificación del material vegetal

Los especímenes de *Geranium shiedeanum* fueron colectados en la localidad de “El Guajolote” municipio de Epazoyucan en el estado de Hidalgo, en julio del 2009. Un ejemplar de referencia se depositó en el Herbario del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo con número de voucher Gayosso J.A.-03 y fue identificado por el M. en C. Manuel González Ledesma.

7.3.1 Obtención del extracto crudo

Un kilogramo de la parte aérea de *Geranium shiedeanum* fueron secados a la sombra, molidos y posteriormente se realizó la extracción mediante maceración en 20 L de acetona-agua 7:3, durante siete días. Se filtraron y concentraron a presión reducida, hasta la obtención del extracto crudo.

7.3.2 Fraccionamiento del extracto crudo

Dos gramos y medio de extracto crudo se sometieron a cromatografía de exclusión molecular usando como soporte Sephadex LH-20. Se obtuvieron 11 fracciones de 300 ml, iniciando con H₂O, H₂O-MeOH y terminando con MeOH, en polaridad decreciente.

La purificación posterior fue realizada utilizando técnicas cromatográficas convencionales en columna y CCF (cromatografía en capa fina) utilizando como soporte Sephadex, sílica gel, entre otros.

La identificación de los compuestos aislados se hizo en base a su composición de sus características físicas y espectroscópicas además de sus datos de RMN ^1H y ^{13}C .

Los espectros de RMN de ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz), fueron obtenidos en un espectrómetro Jeol Eclipse 400, usando como disolventes CD_3OD , $\text{DMSO-}d_6$ y/o acetona- d_6 . La separación cromatográfica se llevó a cabo en dos soportes: gel sílice y Sephadex LH-20, para el caso del gel de sílice fue de la marca Merck (230-400 mesh ASTM) tamaño de partícula 0.063-0.2 mm en columnas de vidrio de 2.0 y 1.0 cm de diámetro interno, para el caso de Sephadex LH-20 se usó una columna de cromatografía de 2.5cm de diámetro conteniendo 25 g de soporte. Las cromatografías en capa fina se realizaron en cromatofolios de aluminio recubiertos con gel de sílice 60 F²⁵⁴, espesor de 0.2 mm.

Soluciones reveladoras para CCF: FeCl_3 al 1% en MeOH, solución para identificar taninos y ácido difenil-borínico- β -etilaminoéster al 1% en MeOH, para identificar flavonoides.

7.4 Ensayo de toxicidad aguda.

El ensayo de toxicidad aguda, se realizó mediante el método de Dietrich Lorke (Lorke 1983), se utilizaron doce animales provenientes del Bioterio de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y se utilizaron bajo la aprobación del Comité ético interno para el cuidado y uso de animales de laboratorio de acuerdo a los lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999, en la cual se incluyen las especificaciones técnicas para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. En la primera etapa

del ensayo se determinó el rango de dosis necesario para obtener la Dosis letal media (DL₅₀) de dicho extracto en ratas.

Se formaron cuatro grupos o lotes:

- Grupo 1: grupo control administrado con 1ml de agua estéril
- Grupo 2: administrado con 10 mg/Kg de peso
- Grupo 3: administrado con 100 mg/Kg de peso
- Grupo 4: administrado con 1000 mg/Kg de peso

Estos animales fueron administraron a las diferentes dosis de extracto de *G. shiideanum* disuelto en agua destilada y mediante el uso de una cánula intragástrica, excepto el grupo control al cual se le administró solo el agua estéril. Se mantuvieron en observación durante catorce días consecutivos, en los cuales se evaluó su comportamiento y peso. Se cuantificó el número de animales muertos y se examinaron macroscópicamente para determinar posibles cambios en órganos de la cavidad abdominal (hígado, bazo, riñón) con respecto al grupo control (Lorke, 1983). De acuerdo a los resultados obtenidos en la primera fase se seleccionaron las dosis correspondientes a la segunda fase.

Se utilizaron cuatro animales más, uno por cada grupo. Las dosis administradas por grupo fueron:

- Grupo 1: grupo control administrado con 1ml de agua estéril,
- Grupo 2: administrado con 1600 mg/Kg de peso,

- Grupo 3: administrado con 2900 mg/Kg de peso y
- Grupo 4: administrado con 5000 mg/Kg de peso.

Se mantuvieron en observación durante catorce días consecutivos, en los cuales se les evaluó su comportamiento y peso. Se cuantificó el número de animales muertos y se examinaron macroscópicamente para determinar posibles cambios en órganos de la cavidad abdominal (hígado, bazo, riñón) con respecto al grupo control (Lorke, 1983).

7.5 Evaluación Hepatoprotectora

La evaluación se realizó con el extracto crudo de la especie *G.shiedeantum*.

7.5.1 Animales y tratamiento

Se adquirieron 40 ratas adultas de la cepa Wistar de dos meses de edad (200-220 g), en el Bioterio de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y se utilizaron de acuerdo al Comité interno ético para el cuidado y uso de animales de laboratorio de esta institución. Fueron aclimatadas en dicho Bioterio dos semanas antes de su uso. Durante estas dos semanas fueron alimentadas con libre acceso a pienso comercial 2018S Harlan y agua, y expuestas a un ciclo de 12 horas de luz y control de temperatura. Los experimentos se llevaron a cabo en dos diferentes grupos de ratas:

- (1) ratas tratadas con una dosis única de TA (100mg/ml) (Andrés *et al*, 2003), disuelta en NaCl 0.9% por vía intaperitoneal (**Figura 5**). La dosis de tioacetamida fue

escogida como la dosis máxima con una supervivencia del 90% (Zaragoza, *et al.* 2000).

(2) ratas pre-tratadas con extracto crudo de *Geranium shiedeanum* (100mg/kg) disuelto en agua y se administrado mediante el uso de cánula intragástrica (**Figura 6**) por tres días consecutivos y en el tercer día administradas con una dosis única de TA.

Las ratas control EGs fueron administradas con 1ml de agua estéril, por vía intragástrica y las control de TA con 0.5 ml de NaCl al 0.9% administrada por vía intraperitoneal. Cada experimento se realizó por duplicado en cuatro animales diferentes para cada condición. Posteriormente, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital al 6.3% a una dosis de 1ml/Kg y se obtuvieron muestras de sangre a diferentes tiempos después de la administración del hepatotóxico (0, 24, 48, 72 y 96h), para la evaluación de las diferentes enzimas marcadores de daño hepático (Sanz, *et al.* 1995).



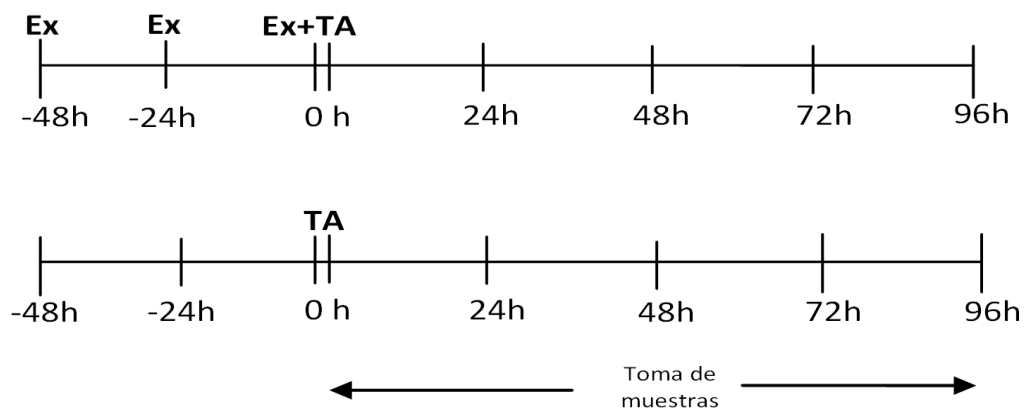
Figura 5. Administración intraperitoneal de TA.



Figura 6. Administración intragástrica de *G. shiideanum*.

7.5.2 Obtención del suero

Para la obtención de los sueros las ratas se anestesiaron mediante pentobarbital y tras proceder a la apertura de la región abdominal se obtuvo la sangre por punción de la vena porta. La sangre se mantuvo a 4° C durante 24 horas y posteriormente, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos a 4° C, obteniendo así el suero como sobrenadante.



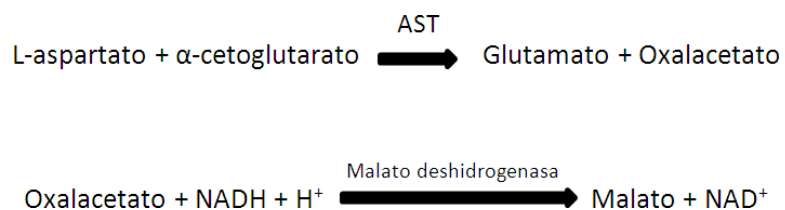
Esquema 1. Obtención de suero a distintos intervalos de tiempo (0, 24, 48, 72 y 96 h).

7.5.3 Determinaciones en suero

Se determinaron las concentraciones enzimáticas séricas de la aspartato aminotransferasa (AST) y alanino aminotransferasa (ALT), enzimas que se consideran determinantes del grado de necrosis y funcionalidad hepáticas. Así como también, bilirrubina total (TBIL) y directa.

7.5.3.1 Aspartato aminotransferasa (AST)

La concentración sérica de esta enzima, anteriormente llamada transaminasa glutámico oxaloacética (TGO), se determinó espectrofotométricamente en suero, midiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm a 30° C, producida por la oxidación del NADH a NAD⁺ en la reacción acoplada de reducción del oxalacetato a malato, catalizada por malato deshidrogenasa (Murray 1984), según el **Esquema 2**.

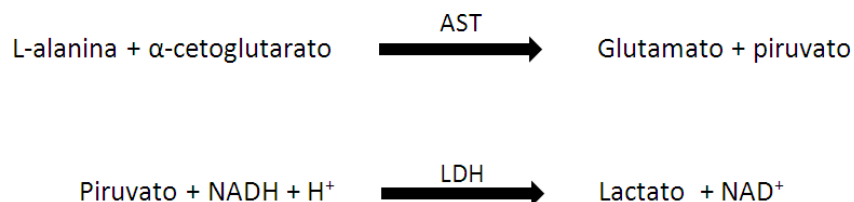


Esquema 2. La oxidación del NADH en el medio es directamente proporcional a la concentración catalítica de AST en suero.

7.5.3.2 Alanina aminotransferasa (ALT)

La actividad de esta enzima, anteriormente llamada transaminasa glutámico pirúvica (TGP), se determinó espectrofotométricamente en suero, midiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm a 30° C, producida por la oxidación del NADH a NAD⁺ en

la reacción acoplada de reducción del piruvato a lactato, catalizada por lactato deshidrogenasa (Murray 1984), según el **Esquema 3**.



Esquema 3. La oxidación del NADH en el medio es directamente proporcional a la concentración catalítica de ALT en suero.

7.5.3.3 Bilirrubina total (TBIL) y directa (DBIL)

La bilirrubina total se determinó espectrofotométricamente, midiendo la variación de la absorbancia a una longitud de onda de 555nm, y a una temperatura de 20° C. El método se basa en que la bilirrubina se convierte en azobilirrubina mediante el ácido sulfanílico diazotado midiéndose fotométricamente. De las dos fracciones presentes en suero, bilirrubin-glucorónido y bilirrubina libre ligada a la albúmina, sólo la primera reacciona en medio acuoso (bilirrubina directa) precisando la segunda la solubilización con dimetilsulfóxido (DMSO) para que reaccione (bilirrubina indirecta). En la determinación de la bilirrubina indirecta se determina también 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 (Kaplan *et al* 1984) (Malloy *et al*, 1937).

Cabe mencionar que los Residuos peligrosos biológicos infecciosos (RPBI) se manejaron de acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, referente a las especificaciones y manejo de los residuos peligrosos biológico-infecciosos.

7.6 Análisis estadístico

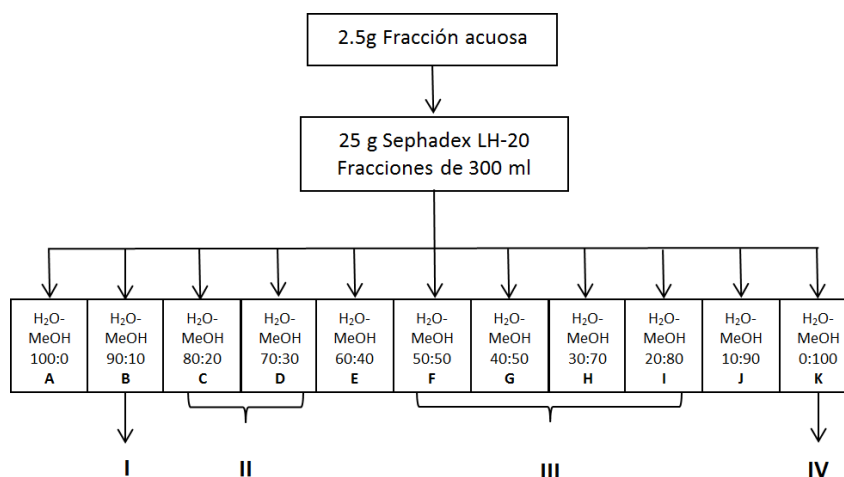
De los valores obtenidos se obtuvo la media \pm la desviación estándar (SD) en ensayos realizados por cuadruplicado en cuatro animales diferentes para cada condición de un número variable de experimentos que se especifican en cada caso. Las comparaciones frente a los respectivos controles se efectuaron mediante el análisis de la t de Student y el nivel de significación estadística se definió como $p < 0,05$.

VII. RESULTADOS

7.7 Aislamiento de los compuestos de *Geranium shiedeanum*

Un kilogramo de la parte aérea de *Geranium shiedeanum* fueron secados a la sombra, molidos y posteriormente se realizó la extracción mediante maceración en 20 L de acetona-agua 7:3, durante siete días. Se filtraron y concentraron a presión reducida, hasta la obtención del extracto crudo (100 g) con un rendimiento de 10%.

Luego, dos y medio gramos del extracto se sometieron a cromatografía de exclusión molecular usando como soporte sephadex LH-20. La separación subsecuente del extracto acetona-agua (7:3) de las partes aéreas de *G. shiedeanum* condujo a la obtención de 11 fracciones etiquetadas de la "A-K" de 300ml como se muestra en el **Esquema 4**, iniciando con H₂O "A", H₂O-MeOH "B" (9:1), H₂O-MeOH "C", (8:2) H₂O-MeOH "D" (7:3), H₂O-MeOH "E" (6:4), H₂O-MeOH "F" (5:5), H₂O-MeOH "G" (4:6), H₂O-MeOH "H" (3:7), H₂O-MeOH "I" (2:8), H₂O-MeOH "J" (1:9), MeOH "K".



Esquema 4. Ácido gálico **I**, 3-O- α -L-arabinofuranósido-7-O- β -D-ramnósido de Kaemferol **II**, acetoni geraniina **III** y ácido elágico **IV**.

El posterior fraccionamiento de la fracción “B” usando cromatografía en columna de gel de sílice y mezclas de disolventes CHCl₃-AcOEt condujo al aislamiento de ácido gálico (**I**), el cual se muestra su estructura química en la **Figura 7** y el espectro de RMN en **Anexos 1 y 2**, las fracciones “C” y “D” fueron mezcladas y el residuo sometido a cromatografía en columna de gel de sílice usando mezclas de CHCl₃-MeOH-H₂O obteniendo como compuesto mayoritario 3-O- α -L-arabinofuranósido-7-O- β -D-ramnósido de Kaemferol (**II**), el cual se muestra su estructura química en la **Figura 8** y sus espectros en **anexos 3, 4 y 5**. Las fracciones “F-I” fueron mezcladas en base a su perfil en CCF, se tomó una parte para separar mediante cromatografía en columna de gel de sílice C-18 obteniendo el compuesto acetoni geraniina (**III**), observado en la **Figura 9**, finalmente la fracción “K” formo un precipitado café oscuro el cual fue recristalizado en piridina formado un precipitado en forma de agujas de color amarillo identificadas como ácido elágico (**IV**), su estructura se

puede observar en la **Figura 10**. Como compuestos mayoritarios, debe resaltarse que **III** es el compuesto de mayor abundancia (54 %) en el extracto crudo y que el compuesto **II** es la primera vez que se reporta en el género.

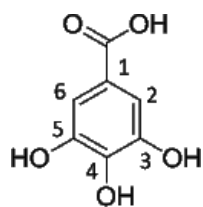


Figura 7. Compuesto I.

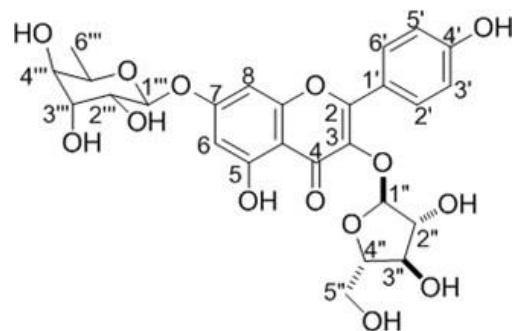


Figura 8. Compuesto II.

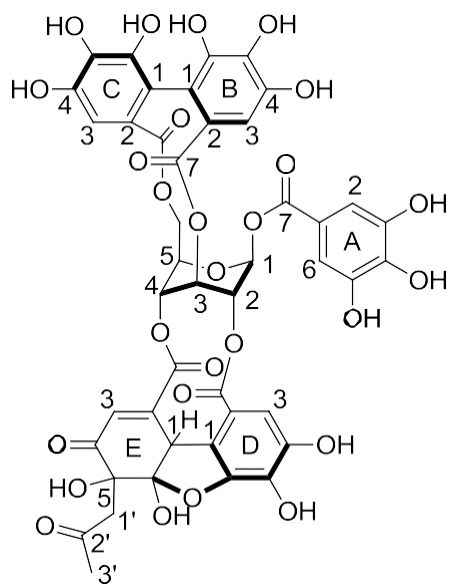


Figura 9. Compuesto III

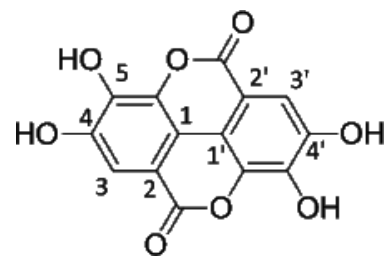


Figura 10. Compuesto IV

7.8 Ensayo de toxicidad aguda DL₅₀

Para la estimación de la dosis letal media (DL₅₀) del extracto de *Geranium shiedeanum* (**Tabla 7**), fueron seleccionadas las dosis de 10, 100 y 1000 mg/kg en la primera fase del ensayo (Fase I).

Extracto <i>G. shiedeanum</i>	Dosis (mg/Kg) intragástrica.		
Fase I	10	100	1000
Muertes	0/3	0/3	0/3
Fase II	1600	2900	5000
Muertes	0/3	0/3	0/3
DL ₅₀	> 5000		

Tabla 5. Estimación de la DL₅₀ para el extracto de *Geranium shiedeanum* de acuerdo al método de Lorke.

De acuerdo a los resultados obtenidos 14 días después de la administración intragástrica de las dosis mencionadas anteriormente, se determinó el esquema de dosis de la segunda fase (Fase II), del ensayo (1600, 2900 y 5000 mg/kg) (**Tabla 7**).

Debido a que ninguna rata murió, ni se observaron cambios patológicos a nivel macroscópico en ninguno de los animales a ninguna de las dosis administradas de *Geranium shiedeanum*, por lo que la DL₅₀ estimada para el extracto es >5000 mg/Kg.

7.9 Evaluación Hepatoprotectora

El xenobiótico tioacetamida es conocido por producir un marcado daño hepático en los animales expuestos. Esto está evidenciado por los cambios enzimáticos, los cuales incluyen la elevación en los niveles séricos de aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa. El extracto de *Geranium shiedeanum*, mostró una muy buena actividad hepatoprotectora contra el daño inducido por la tioacetamida en ratas.

La actividad hepatoprotectora del extracto de *G. shiedeanum* se evaluó en ratas de dos meses de edad (200 g) de la cepa Wistar. Se reservaron ratas control para blanco, extracto de *G. shiedeanum* (EGs) y tioacetamida (TA). A las restantes se les administró el extracto a una dosis ponderal de 100 mg/kg cada 24 h por vía intragástrica durante tres días. En el tercer día se administró una dosis subletal de TA de 100mg/ml por vía intraperitoneal. Se obtuvieron las muestras de sangre a diferentes intervalos de tiempo (0, 24, 48, 72 y 96h) mediante la apertura de la región abdominal por punción de la vena porta, dichas muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 15 min a 4 °C y así se obtuvieron los sueros. Los resultados, expresados en U/L de suero, fueron la media \pm SD de los valores obtenidos por duplicado en suero 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) $p < 0.05$.

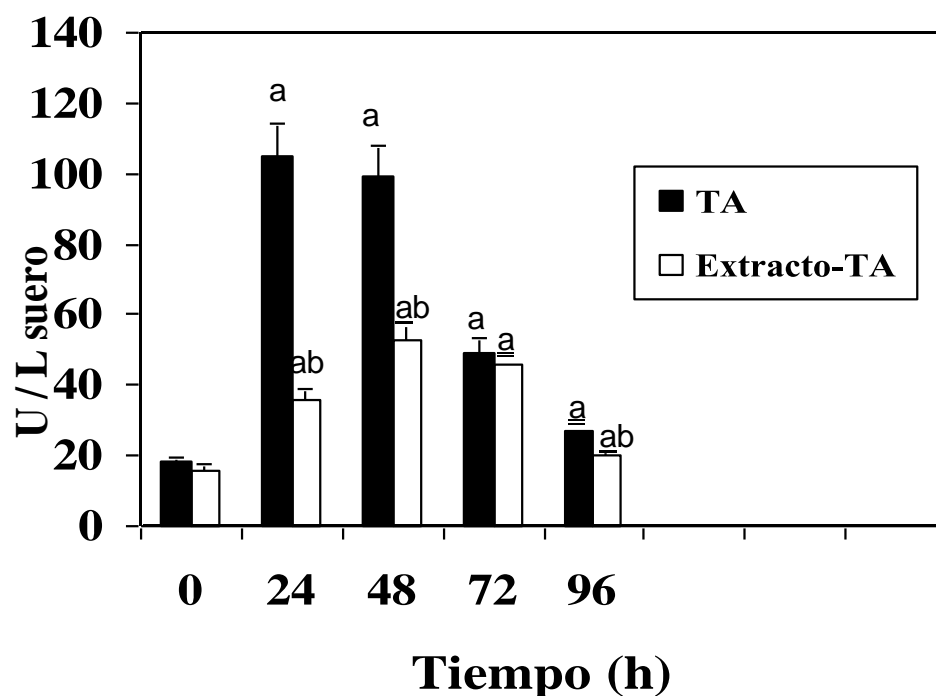
7.9.1 Determinación sérica de Aspartato aminotransferasa

La cuantificación de la enzima aspartato aminotransferasa la realizamos en el suero de las ratas pretratadas o no con el EGs (100 mg/Kg), obtenido a diferentes tiempos después de la administración de la tioacetamida (6.6mmol/Kg), y de sus respectivos controles. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena porta a partir de las ratas anestesiadas con pentobarbital sódico, a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de la administración con TA y se procesaron como se explica con detalle en el apartado de 6.5.3 de Metodología.

El incremento máximo observado en los valores séricos de la enzima aspartato aminotransferasa (AST) fue a las 24 h (**Gráfica 1**) para el grupo tratado solo con la TA. Alcanzando un valor 6 veces superior al valor basal (control). Cuando las ratas fueron pretratadas con el EGs, los valores séricos de AST sólo aumentaron 2 veces más con respecto al control. Es decir, se observó una disminución para esta enzima marcadora de daño hepático del 65% a las 24 horas y del 48% a las 48 horas, lo que nos indica que la administración del EGs aminoró el daño inducido por la TA.

Cabe mencionar que no hubo diferencia significativa en la actividad de la AST en los sueros de los animales tratados sólo con el EGs, estos datos no se muestran en la gráfica.

Aspartato Aminotransferasa



Gráfica 1. Efecto del pretratamiento con EGs (100mg/Kg de peso) sobre la actividad de la AST en suero de ratas intoxicadas con una dosis subletal de TA (100mg/ml). Las muestras fueron obtenidas a las 0, 24, 48, 72 y 96 h de la administración de TA. Los resultados, expresados en U/L, fueron la media \pm SD de los valores obtenidos por duplicado en suero de cuatro animales diferentes para cada condición. Las diferencias frente a los respectivos controles están representadas como (a) y las diferencias debidas al extracto como (b) $p < 0.05$.

7.9.2 Determinación sérica de Alanina aminotransferasa

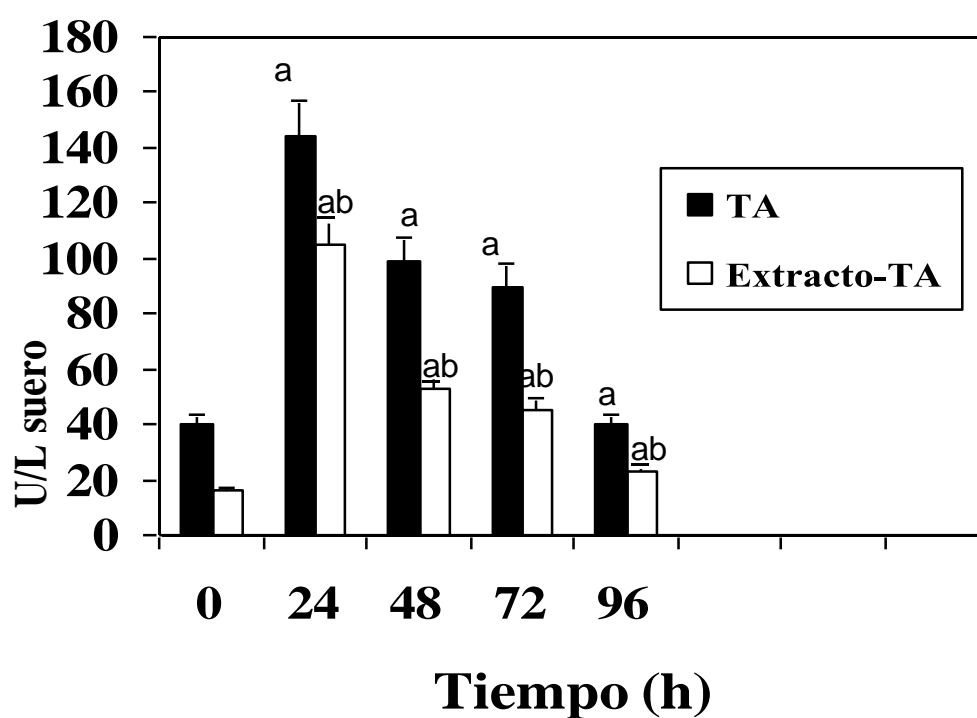
La cuantificación de la enzima alanina aminotransferasa se realizó en el suero de las ratas pretratadas y no con el EGs (100 mg/Kg), obtenido a diferentes tiempos después de la administración de la TA (6.6mmol/Kg), y de sus respectivos controles. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena porta a partir de las ratas anestesiadas con pentobarbital sódico, a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de la administración con TA y se procesaron como se explica con detalle en el apartado de 6.5.3 de Metodología.

El mayor incremento de los valores séricos de la enzima alanina aminotransferasa (ALT) se observó a las 24 h (**Gráfica 2**), después de la administración de la TA. La intensidad de la necrosis inducida por TA es directamente proporcional al incremento de esta enzima en suero, la cual alcanzó valores cinco veces superiores con respecto a los valores basales (control).

Cuando las ratas fueron pretratadas con el EGs, los valores séricos de esta enzima sólo aumentaron 3.7 veces con respecto al control. Es decir, se obtuvo una actividad hepatoprotectora del 27% a las 24 horas. Sin embargo a las 48 horas de administrada la TA, se obtuvo una actividad hepatoprotectora del 46%. Incluso a las 72 horas de administrada la TA, se observó actividad hepatoprotectora del 49%. Y a

las 96 horas de administrada la TA Lo que nos indica que la administración del EGs retrasó y aminoró el daño inducido por la TA.

Alanina Aminotransferasa



Gráfica 2. Efecto del pretratamiento con EGs (100mg/Kg de peso) sobre la actividad de la ALT en suero de ratas intoxicadas con una dosis subletal de TA (100mg/ml). Las muestras fueron obtenidas a las 0, 24, 48, 72 y 96 h de la administración de TA. Los resultados, expresados en U/L, fueron la media \pm SD de los valores obtenidos por duplicado en suero de cuatro animales diferentes para cada condición. Las diferencias frente a los respectivos controles están representadas como (a) y las diferencias debidas al extracto como (b) $p < 0.05$.

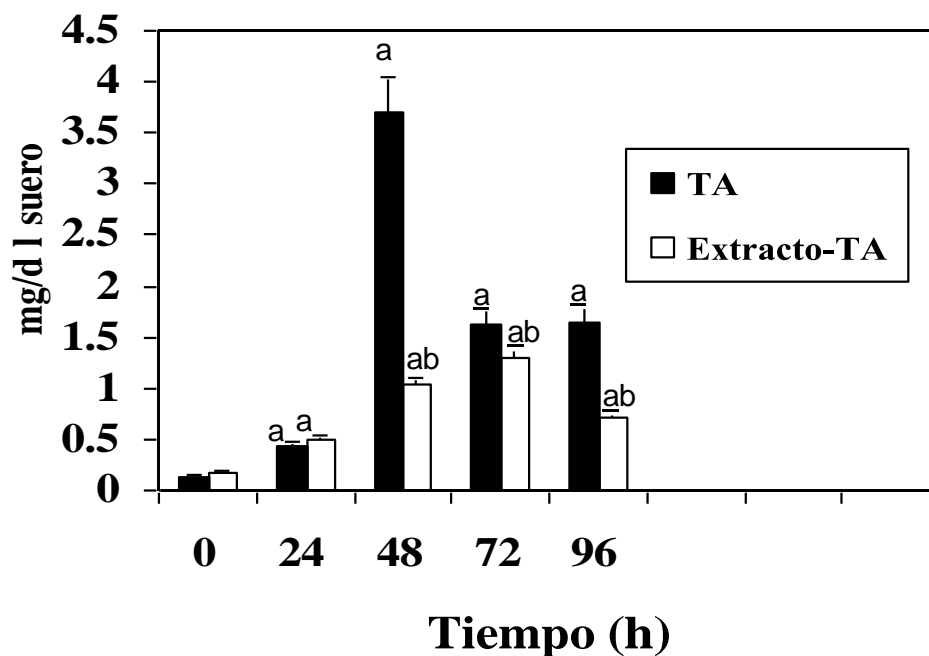
7.9.3 Determinación sérica de Bilirrubina total

Otro parámetro relacionado con el metabolismo hepático y sus alteraciones, considerado de importancia a nivel clínico para el diagnóstico de enfermedades hepáticas, es la bilirrubina. La hiperbilirrubinemia se asocia al daño hepático y está producida por un deterioro de la excreción de los pigmentos conjugados, lo que aumenta su reflujo hacia el suero. Los niveles para la TBIL (**Gráfica 3**) alcanzaron su nivel máximo a las 48 horas en suero de ratas tratadas únicamente con tioacetamida; sin embargo, en las ratas pretratadas con el EGs este aumento no fue tan considerable y el nivel máximo para esta condición, se alcanzó a las 72 horas.

El mayor incremento de los valores séricos de TBIL se observó a las 48 h, alcanzando valores veinticuatro veces superiores con respecto a los valores basales (control).

Cuando las ratas fueron pretratadas con el EGs, los valores séricos de TBIL sólo aumentaron 6.8 veces con respecto al control. Es decir, se obtuvo una actividad hepatoprotectora del 72% a las 48 horas. A las 72 horas de administrada la TA, se obtuvo una actividad hepatoprotectora del 20%. Sin embargo a las 96 horas de administrada la TA, se obtuvo una actividad hepatoprotectora del 56%. Lo que nos indica que la administración del EGs proporcionó hepatoprotección.

Bilirrubina Total



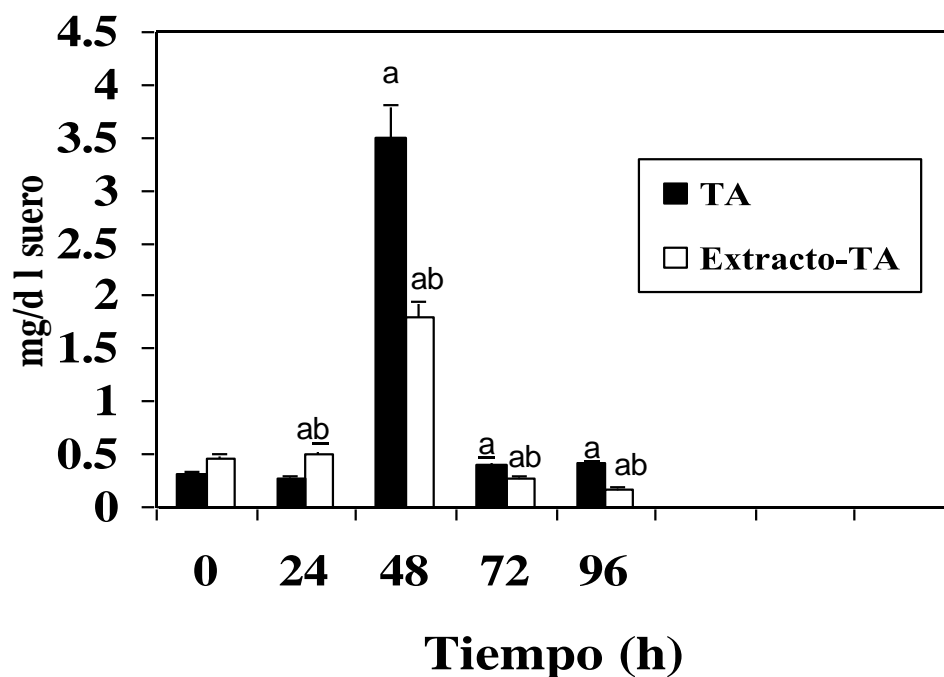
Gráfica 3. Efecto del pretratamiento con EGs (100mg/Kg de peso) sobre la cuantificación de la Bilirrubina total (TBIL) en suero de ratas intoxicadas con una dosis subletal de TA (100mg/ml). Las muestras fueron obtenidas a las 0, 24, 48, 72 y 96 h de la administración de TA. Los resultados, expresados en mg/dL, fueron la media \pm SD de los valores obtenidos por duplicado en suero de cuatro animales diferentes para cada condición. Las diferencias frente a los respectivos controles están representadas como (a) y las diferencias debidas al extracto como (b) $p < 0.05$.

7.9.4 Determinación sérica de Bilirrubina directa

Al cuantificar la Bilirrubina directa (DBIL), se observó el mayor incremento de los valores séricos a las 48 h, alcanzando valores 8.9 veces superiores con respecto a los valores basales (control).

Cuando las ratas fueron pretratadas con el EGs, los valores séricos de DBIL sólo aumentaron 4.6 veces con respecto al control. Es decir, se obtuvo una actividad hepatoprotectora del 48% a las 48 horas. A las 72 horas de administrada la TA, se obtuvo una actividad hepatoprotectora del 30%. Sin embargo a las 96 horas de administrada la TA, se obtuvo una actividad hepatoprotectora del 59%. Lo que nos indica que la administración del EGs proporcionó la actividad de protección hepática.

Bilirrubina Directa



Gráfica 4. Efecto del pretratamiento con EGs (100mg/Kg de peso) sobre la cuantificación de la Bilirrubina directa (DBIL) en suero de ratas intoxicadas con una dosis subletal de TA (100mg/ml). Las muestras fueron obtenidas a las 0, 24, 48, 72 y 96 h de la administración de TA. Los resultados, expresados en mg/dL, fueron la media \pm SD de los valores obtenidos por duplicado en suero de cuatro animales diferentes para cada condición. Las diferencias frente a los respectivos controles están representadas como (a) y las diferencias debidas al extracto como (b) $p < 0.05$.

Cabe mencionar que los Residuos peligrosos biológicos infecciosos (RPBI) se manejaron de acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, referente a las especificaciones y manejo de los residuos peligrosos biológico-infecciosos.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La tioacetamida es un potente hepatotóxico que fue originalmente utilizado como fungicida (Child, 1946), sin embargo, en poco tiempo fue reconocido como un potente hepatotóxico cuya administración originaba una necrosis hepatocelular en la región perivenosa del acino. (Fitzhugh y Nelson, 1948).

La necrosis hepática ocasionada por agentes químicos hepatotóxicos se ha relacionado con una serie de eventos, entre los que cabe destacar:

(1) formación de especies químicas reactivas derivadas de la biotransformación del tóxico en el interior de la célula hepática, en nuestro caso la tioacetamida S-óxido y sus derivados,

(2) alteraciones en el estado redox celular, en los niveles del glutatión, en las lipoproteínas membranales y en la concentración de calcio intracelular (Díez-Fernández *et al*, 1996), y

(3) proliferación hepatocelular postnecrótica o regeneración hepática compensatoria (Sanz *et al*, 1995).

Estas alteraciones se desencadenan por la gran reactividad de estos metabolitos, y por la generación incrementada de especies reactivas de oxígeno que se derivan como subproductos en los procesos de oxidación a partir de los macrófagos y

neutrófilos circulantes como productos del estallido respiratorio catalizado por la NADPH oxidasa. Por otra parte, se sabe que el metabolismo de la TA se debe al CYP450, el cual la oxida formando el S-óxido, compuesto responsable de incrementar la concentración intracelular de Ca^{+2} , inhibir la actividad mitocondrial y producir la muerte celular.

La destrucción selectiva de los hepatocitos centrilobulares producida por una dosis subletal de tioacetamida y el estado proliferativo de las células hepáticas en la regeneración que se desencadena inmediatamente a la necrosis, se ha utilizado como un modelo para estudiar la respuesta hepática frente a la agresión de un agente tóxico en su doble aspecto: (a) destrucción celular y (b) regeneración hepatocelular postnecrótica. El modelo estudiado consta de dos grupos: ratas tratadas con una única dosis de tioacetamida como agente tóxico y ratas pretratadas con EGs y tratadas también con una única dosis de tioacetamida.

El análisis químico de las plantas pertenecientes al género *Geranium* ha demostrado la existencia de algunas cantidades importantes de taninos hidrolizables, compuestos fenólicos y flavonoides (Neagu *et al.* 2010). Estos últimos, son los componentes principales entre los compuestos biológicos activos de las especies de geranio, ya que tienen un papel importante en las actividades hepatoprotectoras, antitrombóticas, antiinflamatorias, antivirales, antialérgicas, antiproliferativas, y anticancerígenas (Neagu *et al.* 2010). Y es también, este contenido de flavonoides, lo que les confiere al género *Geranium* su actividad antioxidante (Gayosso *et al.*, 2009).

El daño en las células hepáticas debido al estrés oxidativo (incremento de ROS), causa la elevación de las enzimas séricas en enfermedades hepáticas asociadas con necrosis: mononucleosis infecciosa, cirrosis, colestasis, carcinoma metastásico del hígado, así como después de la administración de algunos medicamentos (Tietz, 1991) (Friedman y Young, 1997).

La administración aguda de la tioacetamida induce cambios importantes en las concentraciones séricas de AST, ALT y TBIL. El aumento significativo de la concentración sérica de éstos, es considerado indicador de daño hepático, en el presente estudio el incremento de esta concentración inducida por la administración de TA, fue reducido de manera significativa debido al pretratamiento con el EGs, lo que sugiere la conservación de la membrana celular en los hepatocitos. Nuestros resultados muestran que ambas, tanto la cuantificación de transaminasas como la de TBIL en suero, aumentan en las ratas administradas con TA, con respecto a los controles a diferentes intervalos de tiempo. El pretratamiento con EGs, sin embargo reduce de manera significativa estas concentraciones.

Existen muchos trabajos que mencionan que los compuestos polifenólicos presentes en el género estudiado proveen protección hepática. Sin embargo, el mecanismo por el cual el EGs protege al hígado aún es desconocido, aunque tomando en cuenta la similitud con otros metabolitos debiera estar directamente relacionado con la composición química del mismo.

IX. CONCLUSIONES

El estudio fitoquímico de *Geranium shideanum* condujo al aislamiento de: taninos hidrolizables (I, III y IV) y en menor proporción un flavonoide glicosidado de Kaemferol (II). Cabe destacar que es la primera vez que se describe el compuesto II en el género y además que el rendimiento del compuesto III en el extracto crudo fue del 54 %.

Este trabajo muestra que el pretratamiento con el extracto crudo de *G. shideanum* en el modelo de hepatotoxicidad inducido por tioacetamida en rata, normaliza varios parámetros bioquímicos utilizados para evaluar el daño hepático, es decir, disminuyó y retrasó la lesión hepática en un 66 % a las 24 h.

Estos resultados demuestran que la administración de EGs previa a la intoxicación con tioacetamida provee protección hepática.

Hasta el momento no se tiene reportes de estudios de la actividad hepatoprotectora de *Geranium shideanum*, por lo que la presente investigación contribuye al conocimiento fitofarmacológico.

X. BIBLIOGRAFÍA

Andrés D., Sánchez-Reus I., Bautista M., Cascales M. (2003) Depletion of Kupffer cell function by gadolinium chloride attenuates thioacetamide-induced hepatotoxicity. Expression of metallothionein and HSP70. *Biochemical Pharmacology*, 66: 917-926.

Ahmad A.; Pillai K.; Najmi A. K.; Ahmad S. J.; Pal S. N.; Balani D. K. (2002) Evaluation of hepatoprotective potential of jigrine post-treatment against thioacetamide induced hepatic damage. *Journal of ethnopharmacology*; 79: 35-41.

Ali S., Ansari K-A., Jafry M. A., Kabeer H., Diwakar G. (2000). *Nardostachys jatamansi* protects against liver damage induced by thioacetamide in rats. *Journal of ethnopharmacology* 71: 359-363.

Amabeoku G. J. (2009) Antidiarrhoeal activity of *Geranium incanum* Burm. f. (Geraniaceae) leaf aqueous extract in mice. *J. Ethnopharm.*; 123, 190-193.

Amaral S., Mira L., Nogueira J. M., Da Silva A. P., Helena Florêncio M. (2009). Plant extracts with anti-inflammatory properties--a new approach for characterization of their bioactive compounds and establishment of structure-antioxidant activity relationships. *Bioorg. Med. Chem.*, Mar 1; 17(5), 1876-1883.

Asha VV, Sheeba MS, Suresh V, Wills PJ. (2007) Hepatoprotection of *Phyllanthus maderaspatensis* against experimentally induced liver injury in rats. *Fitoterapia*. 78(2):134-41.

Barnes P. M., Bloom B., Nahin R. (2008) Complementary and Alternative Medicine Use Among Adults and Children: United States, 2007. *National Health Statistics*

Reports. Number 12.

Borrás C. **(2003)**. Importancia del estrés oxidativo en la diferencia de longevidad entre machos y hembras. (Tesis Doctoral). España. Universidad de Valencia.

Shima J-U., Oha P-S., Limb K-T. **(2009)** Anti-inflammatory activity of ethanol extract from *Geranium sibiricum* Linne. *Journal of Ethnopharmacology*. Volume 126, Issue 1, pp 90-95.

Calzada F., Cervantes-Martínez J-A. y Yépez-Muliab L. **(2005)** In vitro antiprotzoal activity from the roots of *Geranium mexicanum* and its constituents on *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. *Journal of Ethnopharmacology*. Volume 98, pp 191-193.

Cascales M. **(1987)** Hepatopatías Experimentales. Estudio del Metabolismo. En: Aspectos Bioquímicos y Farmacológicos en Disfunciones Hepáticas, pp 9-26, CSIC. Madrid.

Cassileth B. R. y Deng G. **(2004)**. Complementary and alternative therapies for cancer. *The Oncologist* 9(1): 80-89.

Chen H., Yan X., Zhu P., Lin J. **(2006)**. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of agaro-oligosaccharides *in vitro* and *in vivo*. *Nutrition Journal*. 2: 5:31.

Chen T. M., Subeq Y. M., Lee R. P., Chiou T. W., Hsu B. G.. **(2008)** Single dose intravenous thioacetamide administration as a model of acute liver damage in rats. *International Journal of Experimental Pathology*. 89(4):223-31.

Child J.F.L; **(1946)**. Controlling orange decay. *Indian journal of Chemistry*. 38: 82.

Córdova V. J; Henández A. M; Ortíz M; Martínez L. **(2011)**. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Software IRIS 4.0. Presentación y diseño electrónico. Ing. Ángel Sergio Díaz Sánchez. Fuente: CONAPO/Proyecciones de la Población de México 2005-2050, disponible en: http://www.gob.mx/wb/egobierno/egob_consejo_nacional_de_poblacion_conapo (<http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>). Agosto 2011.

Devlin T. **(2002)** Biochemistry with clinical correlations. 5ª. Ed. USA: Wiley-Liss; P. 590-2.

Dyroff M. C. y Neal R. A. **(1981)**. Identification of the major protein adduct formed in rat liver after thioacetamide administration. *Cancer Research*; 41: 3430-3435.

Fitzhugh O.G; Nelson A. A; **(1948)**. Liver tumours in rats fed thiourea or thiacetamide. *Science* 108; 626-628.

Fodorea C. S., Vlase L., Suciú S., Leucuta S. E., Tamás M. **(2005)**. Preliminary HPLC study on some polyphenols of *Geranium robertianum* L. (Geraniaceae). *Rev Med Chir Soc Med Nat*. 109(1):174-8.

Friedman y Young. **(1997)**. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press.

Galisteo M., Suárez A., Montilla M.P., Torres M. I. , Gil A., Navarro M. C. **(2006)**. Protective effects of *Rosmarinus tomentosus* ethanol extract on thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. *Phytomedicine*. 13(1-2); 101-8.

Gayosso-De-Lucio J, Torres-Valencia M, Rojo-Domínguez A, Nájera-Peña H, Aguirre-López B, Salas-Pacheco J, Avitia-Domínguez C, Téllez-Valencia A. **(2009)** Selective inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by brevifolin carboxylate derivatives isolated from *Geranium bellum* Rose. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Vol. 19, Issue 20: 5936-5939.

Gómez, M. A., Borja y Tomé, López-Lomo V. M. A. **(2005)**. Biotecnología aplicada a la mejora de "Pelargonium. 1ª edición. Editorial Universidad Complutense de Madrid, España. pp. 9-11.

Gómez-Martínez R. y Tlacuilo-Parra A., **(2007)** Garibaldi-Covarrubias R. *Pediatric Blood & Cancer*; 49(6), 820–823.).

Gupta DN., **(1956)** Acute changes in the liver after administration of thioacetamide. *J. Pathol Bacteriol*. Jul; 72(1); 183-92.

Gupta NK y Dixit VK. **(2009)** Hepatoprotective activity of *Cleome viscosa* Linn. extract against thioacetamide-induced hepatotoxicity in rats. *Nat Prod Res*. 23(14):1289-97.

Harputluoglu MM, Demirel U, Ciralik H, Temel I, Firat S, Ara C, Aladag M, Karıncaoglu M. y Hilmioglu F. **(2006)** Protective effects of *Gingko biloba* on thioacetamide-induced fulminant hepatic failure in rats. *Human & Experimental Toxicology*. 25: 705-713.

Hsieh C.-C., Fang H-L., Lina W-C. **(2008)** Inhibitory effect of *Solanum nigrum* on thioacetamide-induced liver fibrosis in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 119 117-121.

Ira Fox, S. **(2008)** Fisiología humana. Décima edición. Mc Graw Hill. pp 135-139.

Jain NK, Singhai AK. **(2011)** Protective effects of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels leaf extracts on acetaminophen and thioacetamide induced hepatic injuries in Wistar rats. *Asian Pac J Trop Med*. Jun; 4(6):470-4.

Kobakhidze K. B. y Alaniya M. D. **(2003)**. Hydrolyzed tannins from *Geranium pusillum*. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 38, No. 2. 196-197.

Kaplan A., et al. **(1984)** *Bilirubin*. *Clin. Chem*. The C. V. Mosby Co. St. Louis. Toronto. Princeton; 1238-124, 436,650.

Khatri A, Garg A, Agrawal SS. **(2009)** Evaluation of hepatoprotective activity of aerial parts of *Tephrosia purpurea* L. and stem bark of *Tecomella undulata*. *J Ethnopharmacol*. 122(1):1-5.

Kishore K. et al, **(1998)**. Nature of the transient species formed during pulse radiolysis of thioacetamide in aqueous solutions. *Res. Dharm. Intermed*. Vol. 24, No. 1, pp. 35-45.

Lee A. y Farrel G. **(2001)** Mechanism of azathioprine-induced injury to hepatocytes: roles of glutathione depletion and mitochondrial injury. *Journal of Hepatology*; 35: 756-764.

Li J., Huang H., Feng M., Zhou W., Shi X., Zhou P. **(2008)** *In vitro* and *in vivo* anti-hepatitis B virus activities of a plant extract from *Geranium carolinianum* L. *Antiviral Research*. 79(2):114-20.

Liapi Ch., Al-Humadi H., Zarros A., Galanopoulou P., Stolakis V., Gkrouzman E., Mellios Z., Skandali N., Anifantaki F., Tsakiris S. **(2009)** Combined thirty-day exposure to thioacetamide and choline-deprivation alters serum antioxidant status and crucial brain enzyme activities in adult rats. *Metab. Brain Dis.* 24:441-451

Lorke D. **(1983)** A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch Toxicol* (54:275-278.

Malloy H., *et al*, **(1937)** The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J. Biol. Chem.*; 112, 2; 481-491.

Mansour S-Z. y El-Kabany H. **(2009)** Effects of Fructus *Piperis Longi* extract on fibrotic liver of gamma-irradiated rats. *Chinese Medicine*, 4:2; 1749-8546.

Michalopoulos, G. Liver Regeneration. *Journal Cell Physiol.* 2007 November; 213 (2): 286-300.

McPhee S. (2011). Fisiopatología de la enfermedad. Una introducción a la medicina clínica. 6a edición. Mc Graw Hill LANGE. pp. 375-377.

Miliauskas G., Van Beek T., Venskutonis P., Linssen J., Waard P. (2004). Actividad antioxidante de *Geranium macrorrhizum*. *Eur Food Res Technol.* (2004) 218:253–261.

Miliauskasa G; Venskutonisa P.R; Van Beekb T.A. (2004) Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry* 85 231–237.

Muriel P. y Rivera-Espinoza Y. (2008) Beneficial drugs for liver diseases. *J. Appl. Toxicol.* 28(2): 93-103.

Murray R. y Kaplan A. (1984) Aspartato aminotransferasa. *Clin Chem The C.V. Mosby Co. St. Louis. Toronto. Princeton*; 1112-1116.

Murzakhmetova M, Moldakarimov S., Tancheva L., Abarova S., Serkedjieva J. (2008). Propiedades antioxidantes y pro-oxidantes de polifenoles provenientes del extracto de *Geranium sanguineum* in vivo e in vitro. *Phytotherapy Research.* 2008; 22(6):746-51.

Myagmar B., Aniya Y. (2000) Actividad antioxidante de plantas medicinales provenientes de Mongolia *Phytomedicine.* 7(3):221-9.

Nanji A. y French S. **(2003)** Animal models of alcoholic liver disease-focus on the intragastric feeding model. *Alcohol Liver Disease. Mechanism of Injury*. 27: 325-330.

Neagu E.; Paun-Roman G.; Lucian-Radu G.; Nechifor G. **(2010)**. Concentration of the bioactive principles in *Geranium robertianum* extracts through membranare procedures (ultrafiltration) *Romanian Biotechnological Letters* Vol. 15, No.1.

Newman D. J. **(2008)** Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? *Journal Medicinal Chemistry*. 51: 2589-2599.

OMS. Health statistics and health information systems. **(2004)** Fuente: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates_country/en/index.html#. Death and DALY estimates for 2004 by cause for WHO Member States.

Qing-He Liu, Ji-Eun Jeong, Eun Jin Choi, Young Hee Moon, and Eun-Rhan Woo. **(2006)** A New Furofuran Lignan from *Geranium thunbergii* Sieb. Et Zucc. *Arch Pharm Res* Vol 29, No 12, 1109-1113.

Rawat AK, Mehrotra S, Tripathi SC, Shome U. **(1997)** Hepatoprotective activity of *Boerhaavia diffusa* L. roots a popular Indian ethnomedicine. *J Ethnopharmacol*. Mar; 56(1):61-6.

Rodríguez J., Menéndez J. y Trujillo Y. **(2001)** Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit.*; 1: 15-20.

Rzedowski J., Calderón G. **(1995)**. Flora del bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 40.

Salama MM, Ezzat SM, Sleem AA. **(2011)** A new hepatoprotective flavone glycoside from the flowers of *Onopordum alexandrinum* growing in Egypt. *Z Naturforsch C*. May-Jun; 66(5-6):251-9.

Sanz M., Cascales C., Gómez A., Brindley D., Cascales M. **(1987)** Effect of a rhodium complexo in alterations of hepatic function in thioacetamide-induced hyperplastic noduligenesis in rats. *Carcinogenesis*. 8(11):1685-90.

Sanz N, Díez-Fernández C, Andrés D, Cascales M. **(2002)**. 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*. 21; 1587(1):12-20.

Sanz N., Díez-Fernández C., Fernández-Simón L., Alvarez A., Cascales M. **(1995)**. Relationship between antioxidant systems, intracellular thiols and DNA ploidy in liver of rats during experimental cirrhogenesis. *Carcinogenesis*. 16(7): 1585-93.

Secretaría de Salud/Dirección General de Información en Salud, **(2008)**. Elaborado a partir de la base de datos de defunciones 1979-2008 INEGI/SS y de las Proyecciones de la Población de México 2005-2050, y proyección retrospectiva 1990-2004. CONAPO 2006-2008. Fuente: www.sinais.salud.gob.mx/descargas/xls/m_005.xls. Agosto 2011.

Sehrawat A, Khan TH, Prasad L, Sultana S. **(2006)** *Butea monosperma* and chemomodulation: protective role against thioacetamide-mediated hepatic alterations in Wistar rats. *Phytomedicine*. 13(3):157-63.

Sehrawat A y Sultana S. **(2006)** *Tamarix gallica* ameliorates thioacetamide-induced hepatic oxidative stress and hyperproliferative response in Wistar rats. *J Enzyme Inhib Med Chem*. Apr; 21(2):215-23.

Shaikh B. T. y Hatcher J. **(2005)** Complementary and Alternative Medicine in Pakistan: Prospects and Limitations. *Advance Access Publication*. 2(2)139–142.

Shaikh B. T., Haran D., Hatcher J. **(2008)** Where do they go, whom do they consult, and why? Health-seeking behaviors in the northern areas of Pakistan. *Qualitative Health Research*, Jun; 18(6):747-55.

Sharmila Banu G., Kumar G. and Murugesan A. **(2009)** Effect of ethanolic leaf extract of *trianthema portulacastrum* L. on aflatoxin induced hepatic damage in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 24 (4) 414-418.

Shuppan D.y Afdhal NH. **(2008)** *Liver cirrhosis*. *Lancet*. 8; 371 (9615): 838-51.

Şöhretoğlu D., Sakar M. K., Atasayar Sabuncuoğlu S., Özgünes H., Sterner O. **(2009)**. Antioxidant galloylated flavonoids from *Geranium tuberosum* L. subsp. *tuberosum*. *Turk J Chem*. 33, 685–692.

Spalholz J., Boylan M. y Driskell J. **(1998)**. *Nutrition Chemistry and Biology*. 2ª Ed. USA: Boca Raton London; P.265-275.

Tietz NW. **(1991)**. Clinical guide to laboratory tests. 2nd ed. Saunders Co.

Tome S.y Lucey MR. **(2004)** Review article: current management of alcoholic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. Apr 1; 19 (7): 707-14

Torres G. (2001) Stress oxidativo en hemodiálisis: Prevención y estrategias de tratamiento. 2do. Congreso Internacional de Nefrología por Internet. Disponible en: <http://www.uninet.edu/cin2001/html/conf/torres/torres.html>.

Villavicencio N. M. A., Pérez-Escandón B. E., Ramírez A. A. **(2002)**. Plantas Útiles del Estado de Hidalgo II., 1ª ed. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca Hidalgo, México p. 70-71.

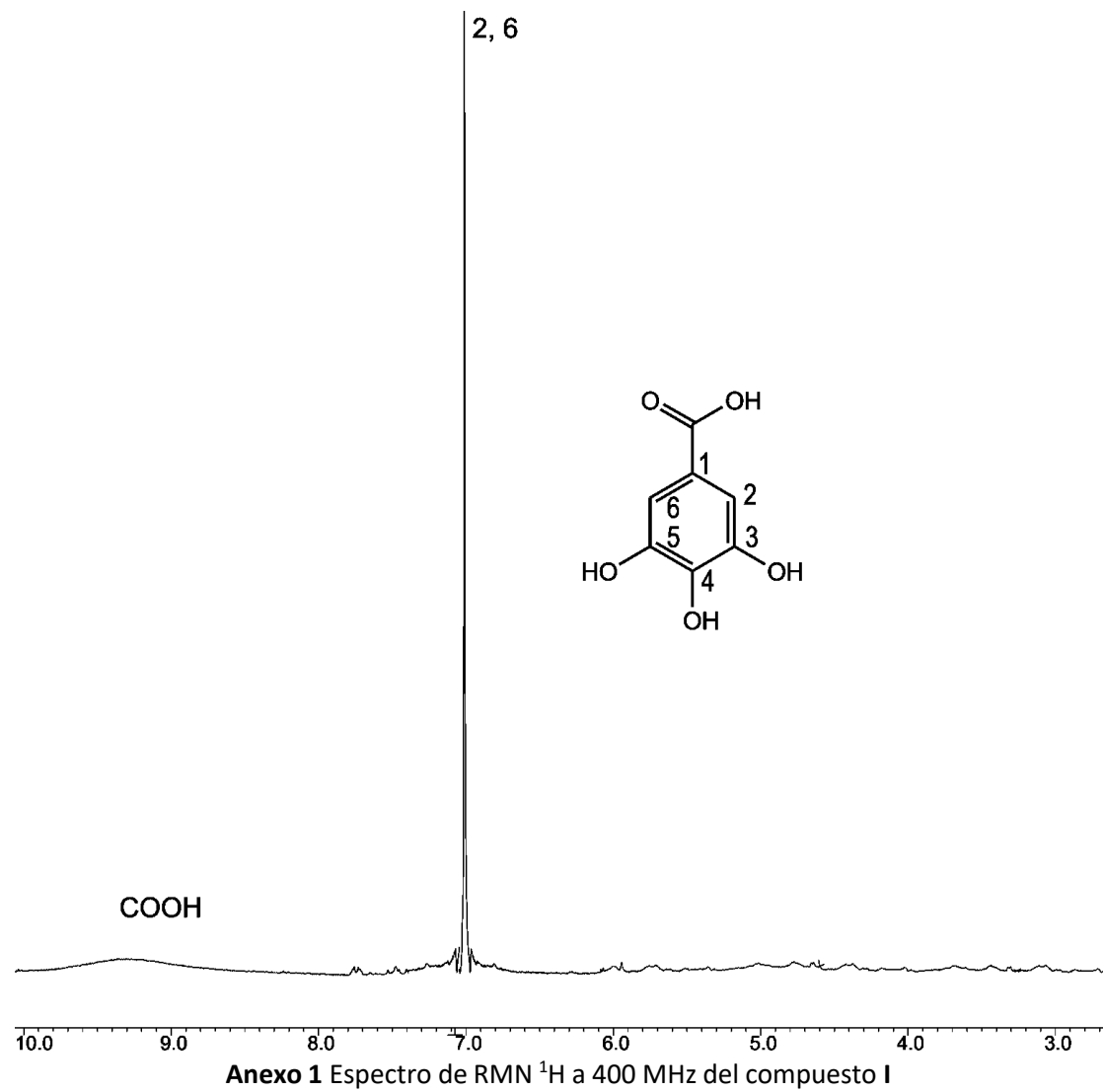
Vilwanathan R., Kanchi S., Thiruvengadam D. **(2005)** Effect of *Tridax procumbens* on liver antioxidant defense system during lipopolysaccharide-induced hepatitis in D-galactosamine sensitized rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 269:131-136.

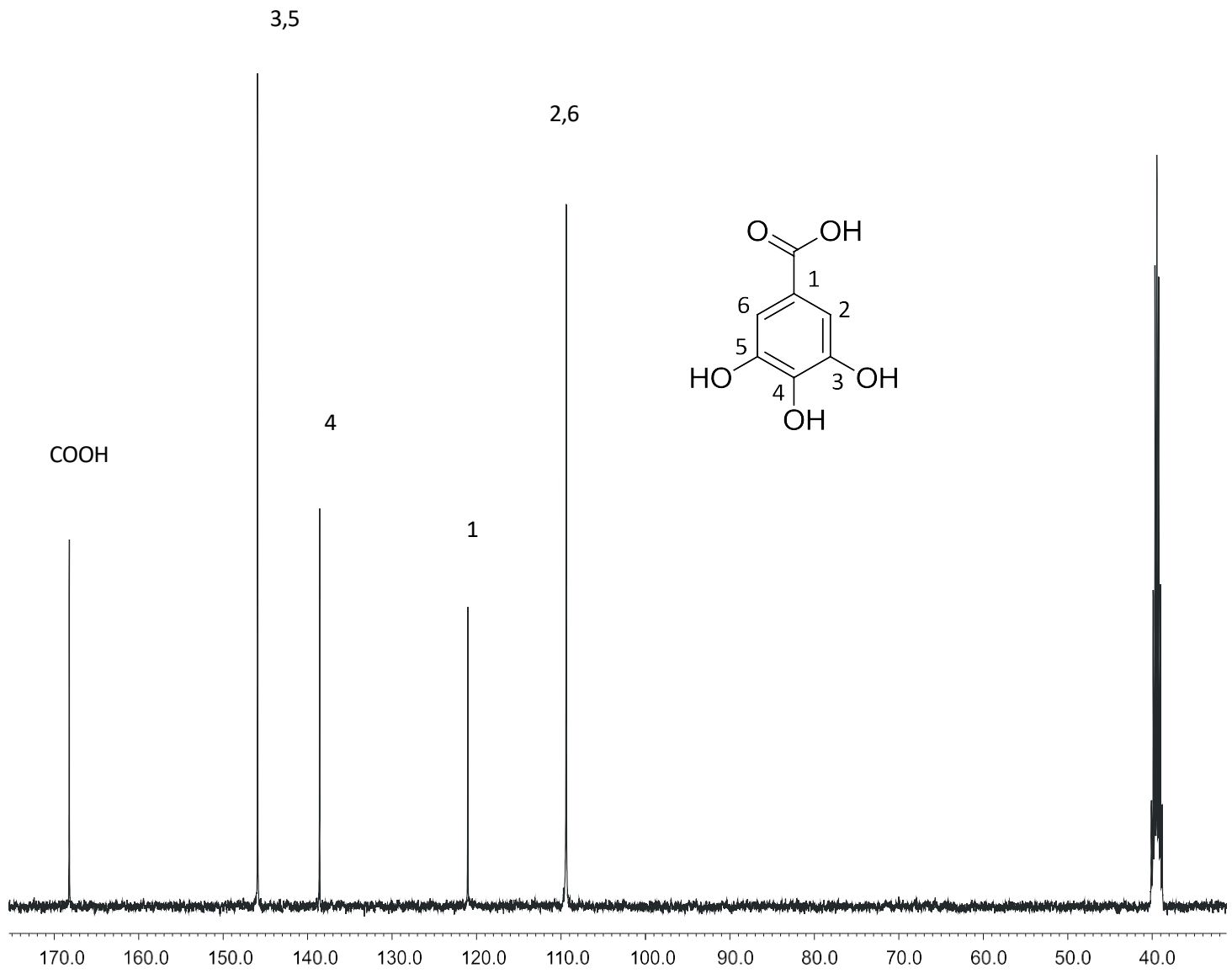
Waxman D.y Azaroff L., **(1992)** Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem J*. 281,557-592.

Wu JB, Chuang HR, Yang LC, Lin WC. **(2010)**. A standardized aqueous extract of *Anoectochilus formosanus* ameliorated thioacetamide induced liver fibrosis in mice: the role of Kupffer cells. *Biosci Biotechnol Biochem*; 74(4):781-7.

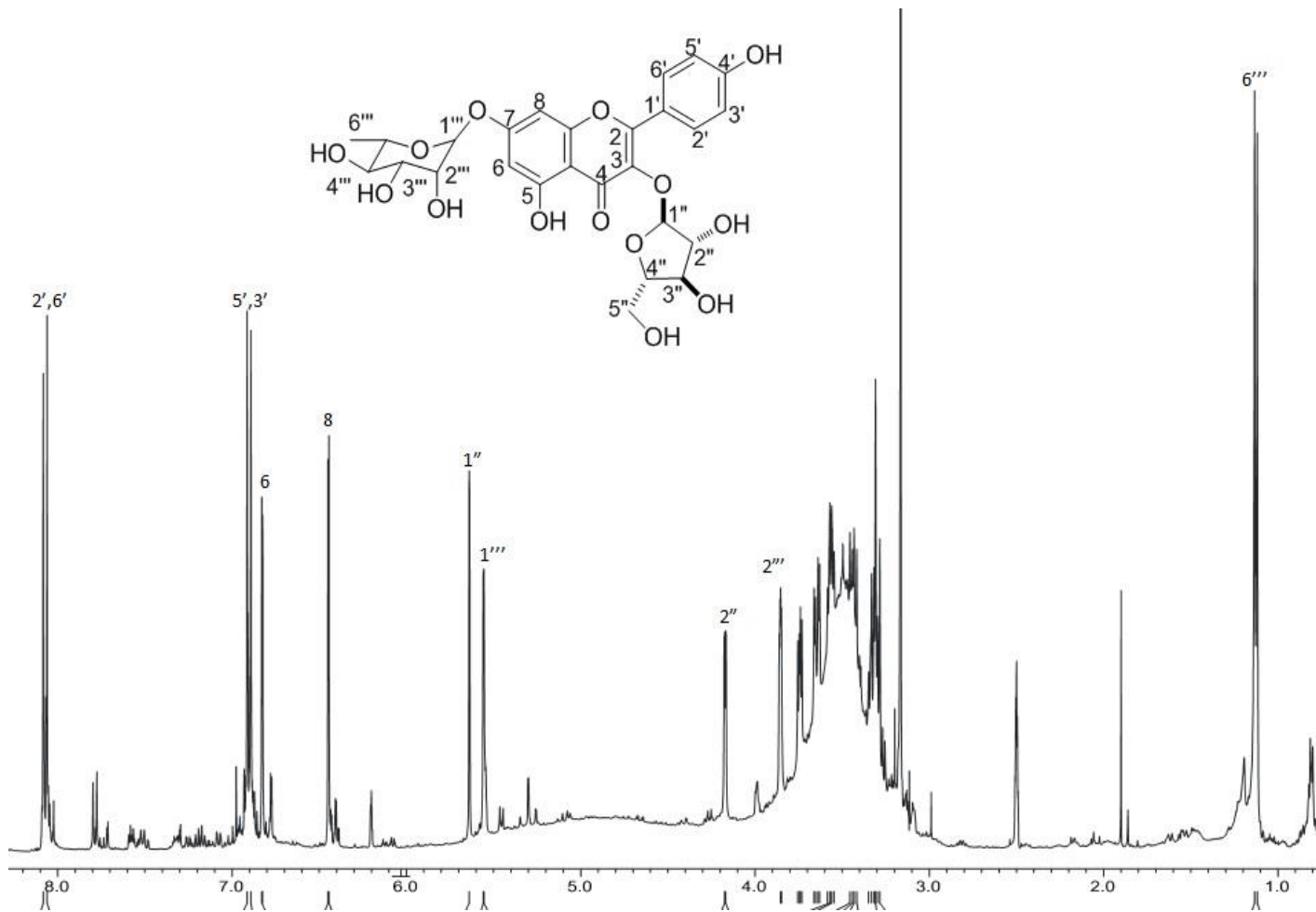
Zaragoza A., Andrés D., Sarrión D., Cascales M. **(2000)**. Potentiation of thioacetamide hepatotoxicity by phenobarbital pretreatment in rats. Inducibility of FAD monooxygenase system and age effect. *Chem Biol Interact.* 124: 87-101,

Zimmerman T., Muller A., Machnik G., Franke H., Schubert H., Dargel R. **(1987)** Biochemical and morphological studies on production and regression of experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in Uje: WIST rats. *Z. Versuchstierkd.* 30(5-6): 165-80.

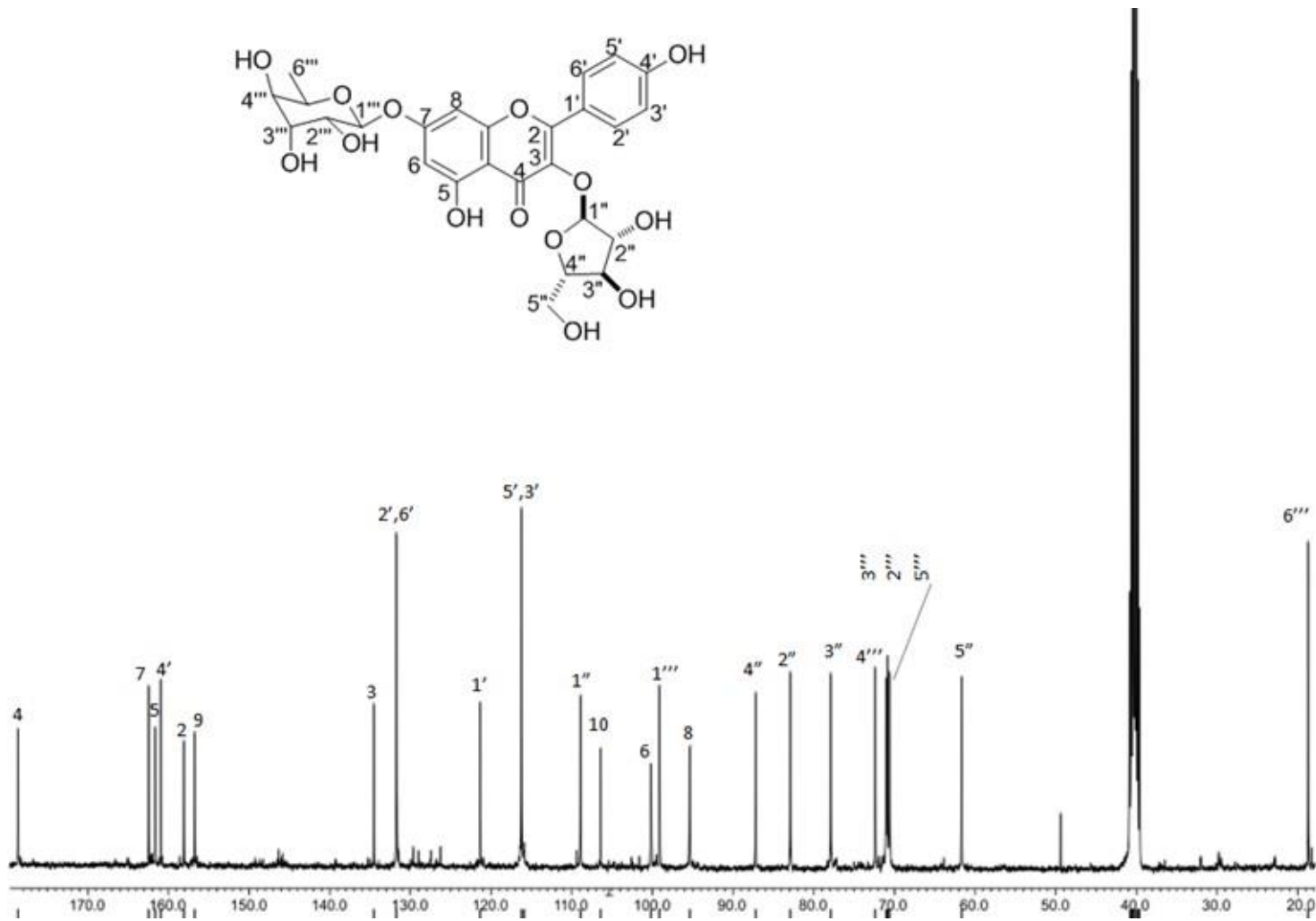
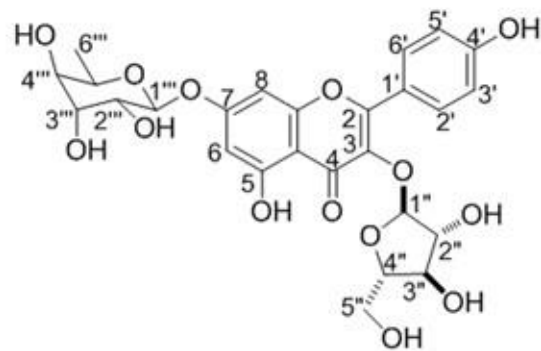




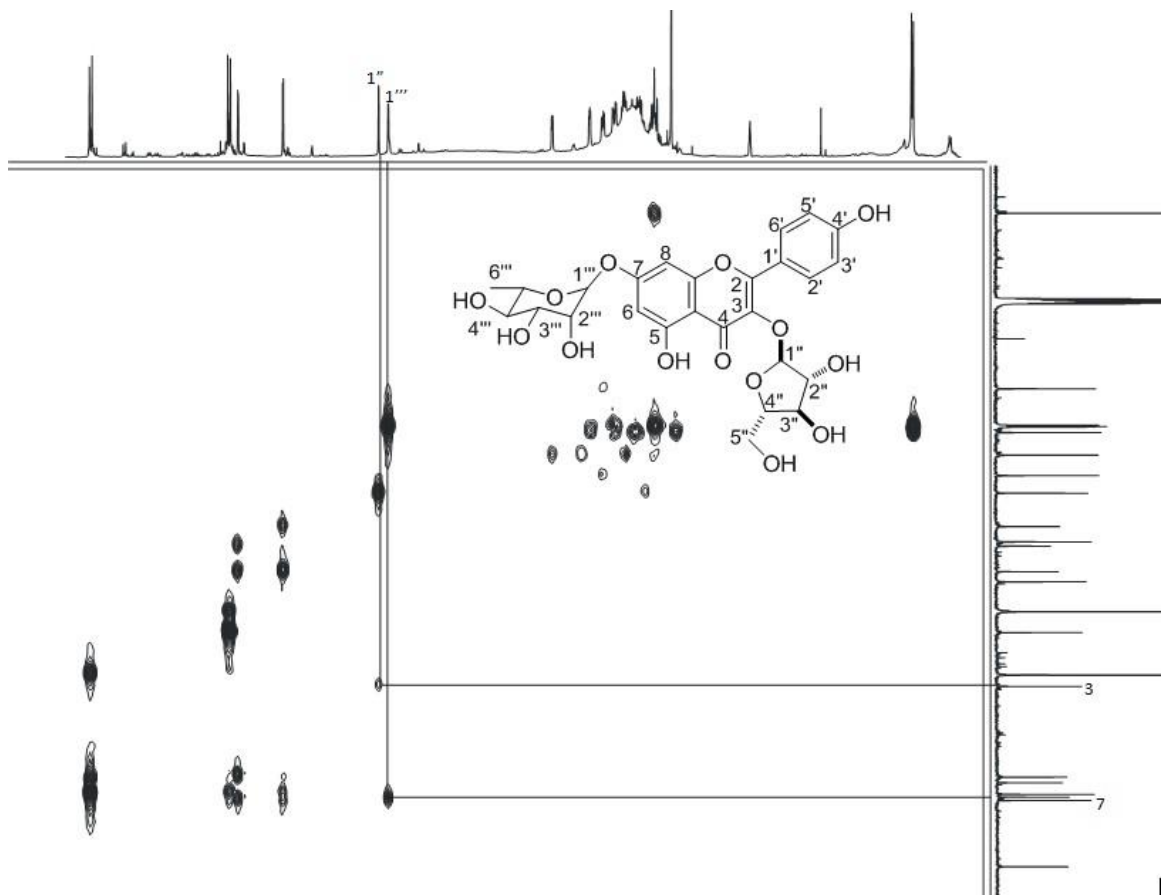
Anexo 2. Espectro de RMN ^{13}C a 100 MHz del compuesto I



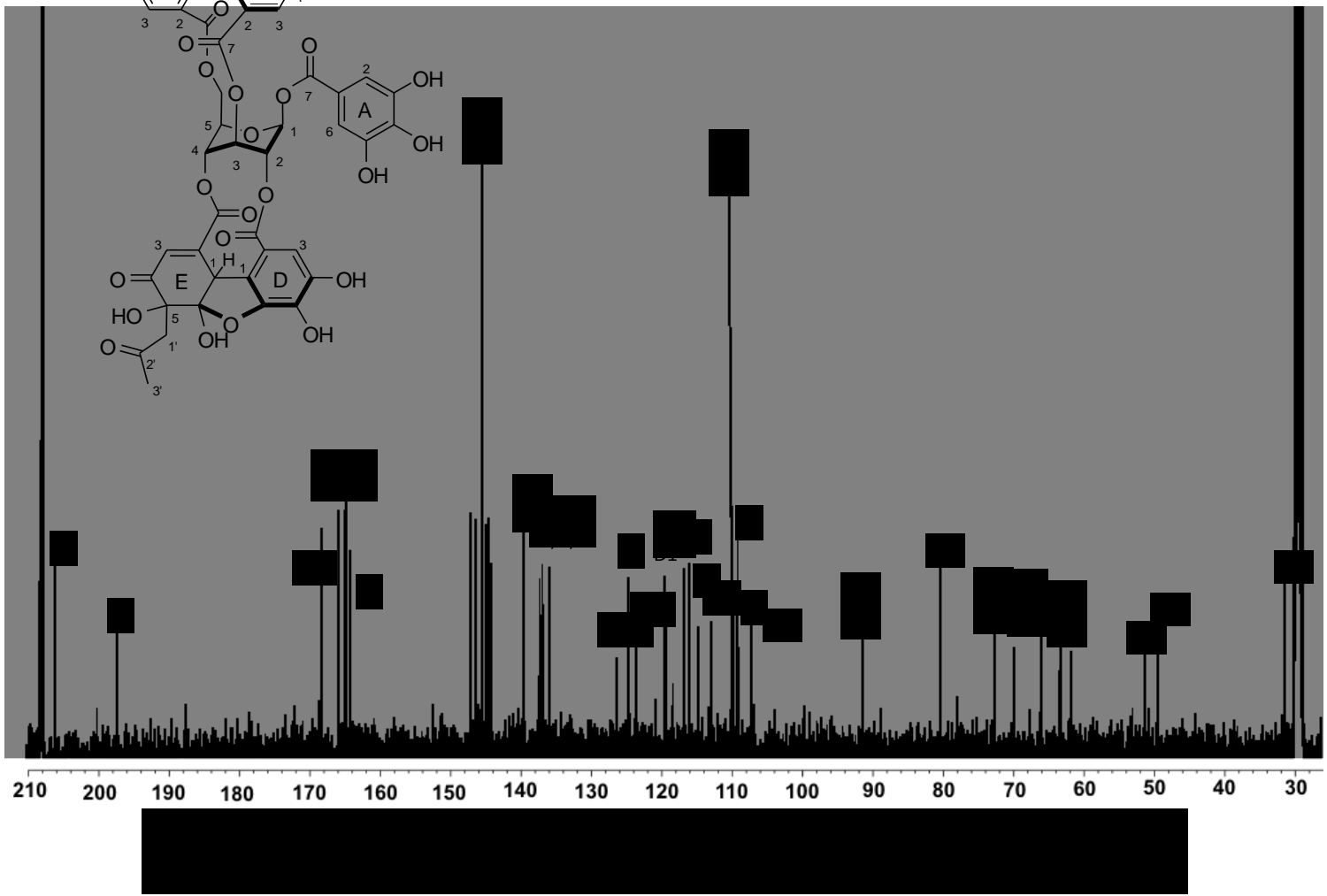
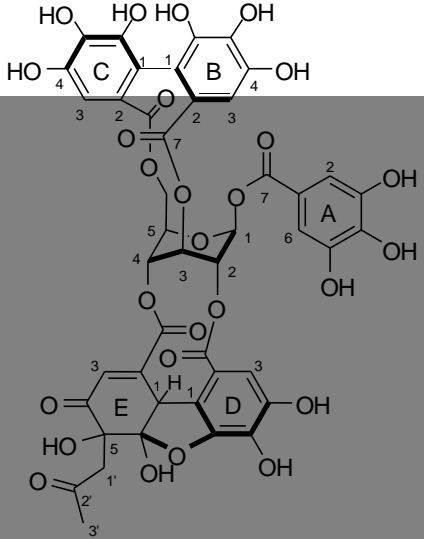
Anexo 3. Espectro de RMN ¹H a 400 MHz del compuesto II

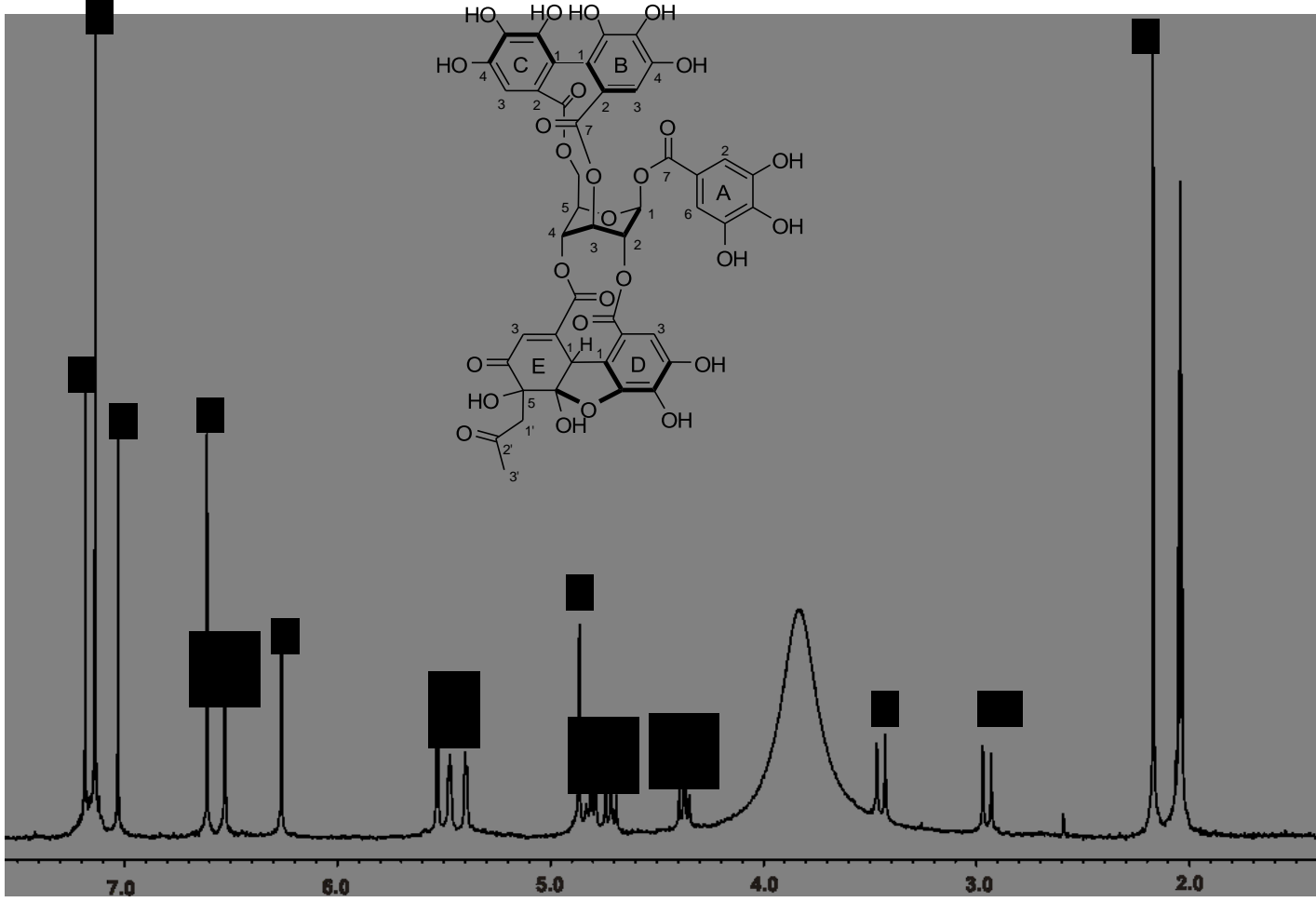


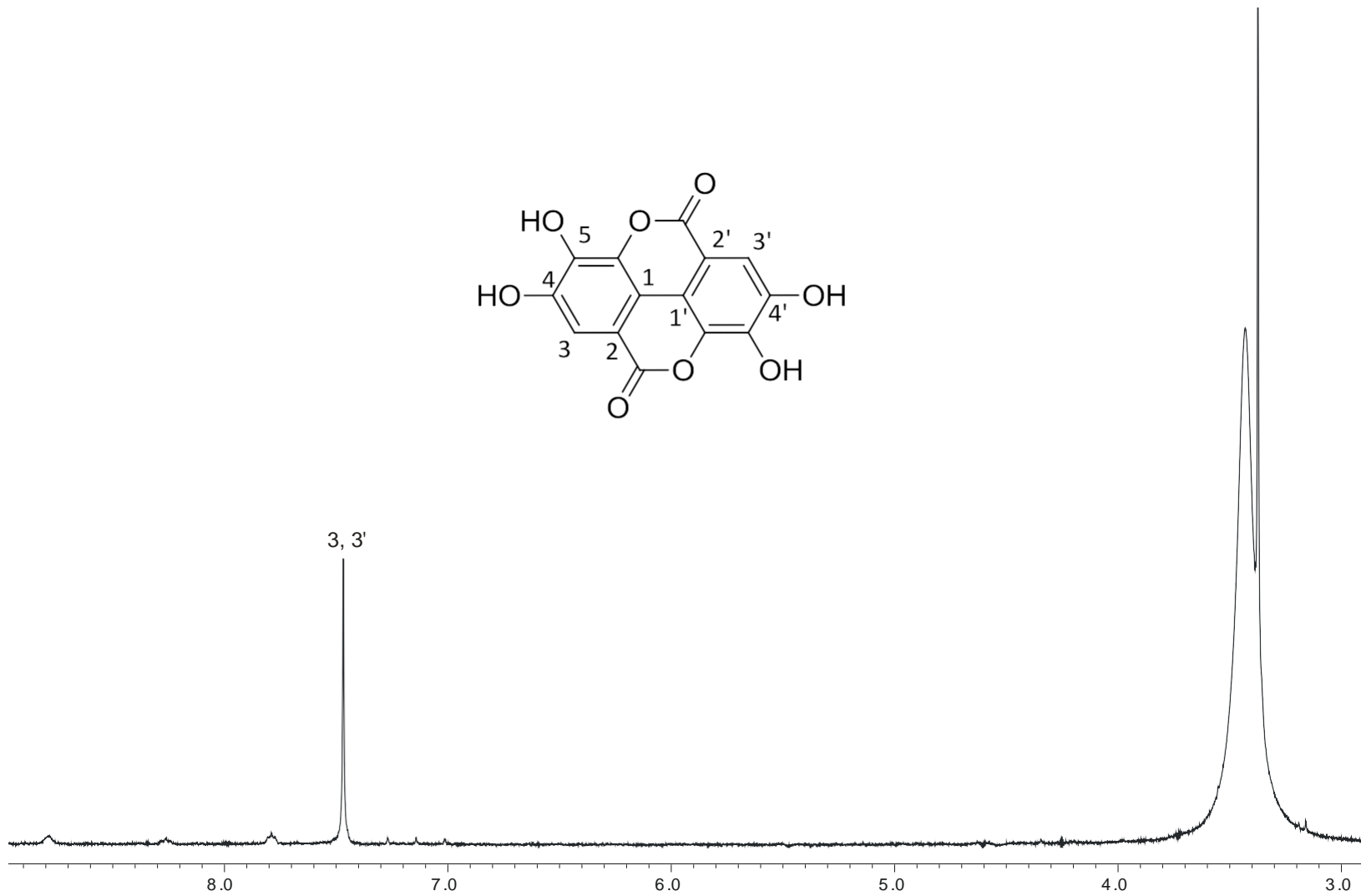
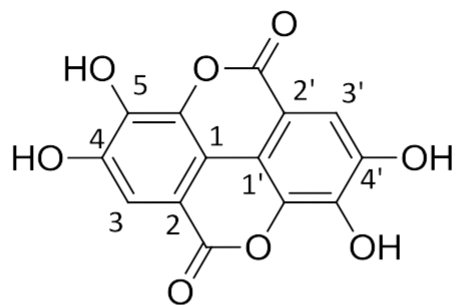
Anexo 4. Espectro de RMN ^{13}C a 100 MHz del compuesto II



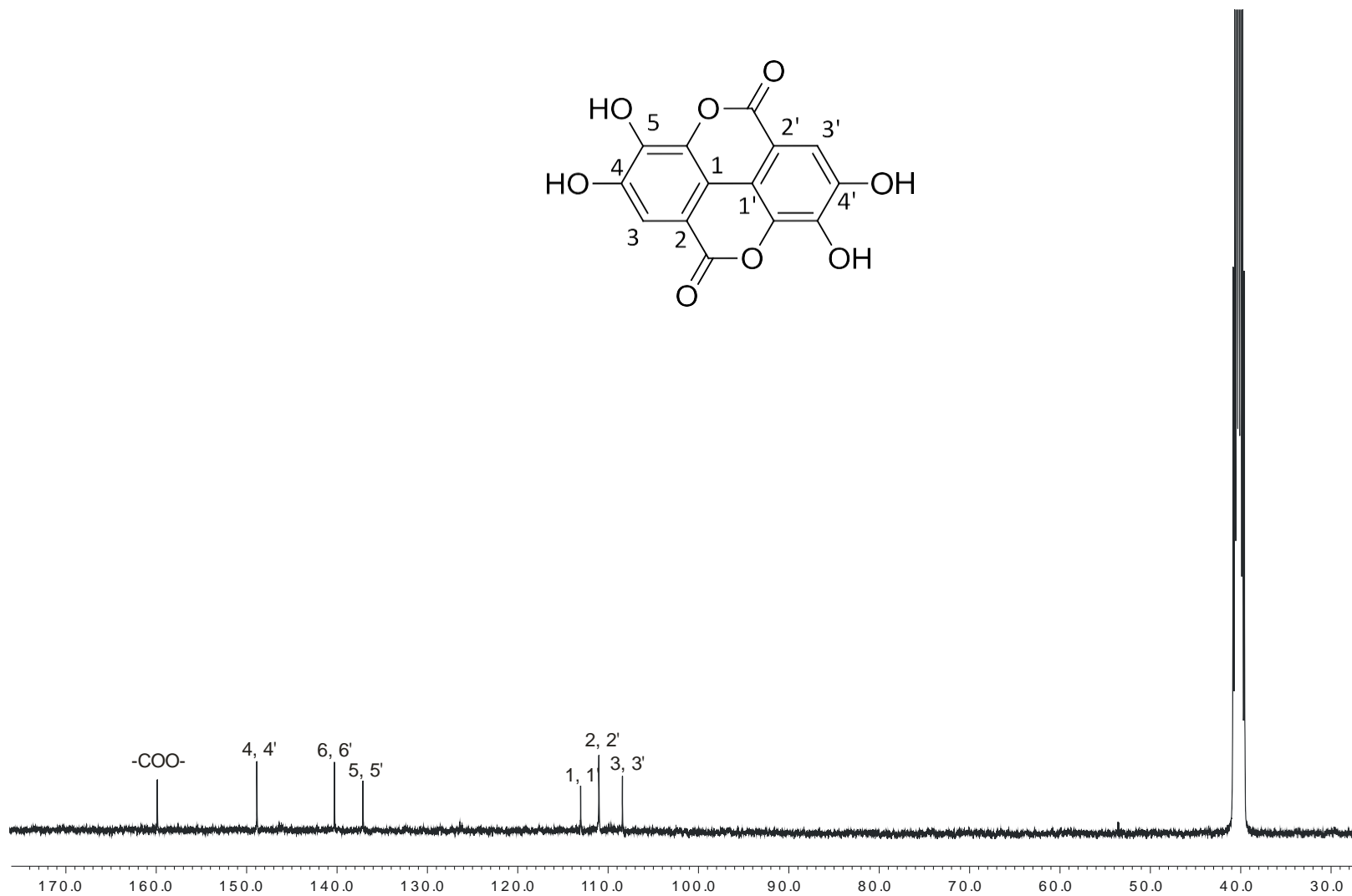
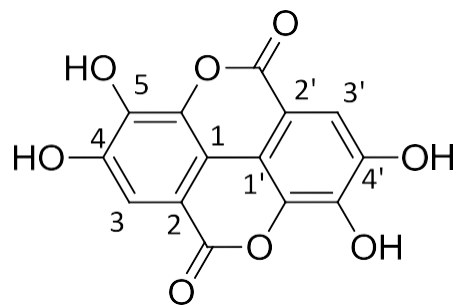
Anexo 5. Experimento HMBC del compuesto II







Anexo 8. Espectro de RMN ^1H a 400 MHz del compuesto IV en $\text{DMSO-}d_6$.



Anexo 9. Espectro de RMN ^{13}C a 400 MHz del compuesto IV en $\text{DMSO-}d_6$.

Estudio químico y actividad hepatoprotectora de *Geranium shiedeanum*

María Teresa Vargas-Picazo,¹ Mirandell Bautista Ávila,¹ Claudia Velázquez González,¹ Raquel Carriño Cortés,² Juan Antonio Gayosso-De-Lucio^{1*}

¹Área Académica de Farmacia, ²Área Académica de Medicina, Instituto de Ciencias de la Salud Carretera Pachuca-Tlaxiotepec sin. Municipio San Agustín Tlaxiaca, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México. *jgayosso@yahoo.com.mx

INTRODUCCIÓN



Figura 1. *Geranium shiedeanum*.

Dentro de la Medicina Alternativa y Complementaria (CAM) destacan un importante número de remedios a base de plantas medicinales¹, sin embargo su uso no cuenta con estudios farmacológicos y químicos que lo sustenten², de ahí la importancia de este estudio. *Geranium shiedeanum* (Fig. 1) conocido como Pata de León, es una hierba perenne con flores de pétalos morados cuya característica es que presenta dos flores por cada racimo, se usa tradicionalmente como antipirético y antiinflamatorio³.

RESULTADOS

Un Kg de las partes aéreas de *G. shiedeanum* se extrajo por maceración durante 7 días con 20 L acetina-agua (7:3), concentrados a presión reducida hasta obtener un volumen de 3 L, el cual se extrajo con CHCl_3 obteniéndose 12.75 g de F-CHCl_3 y 125 g de la F-Ac .

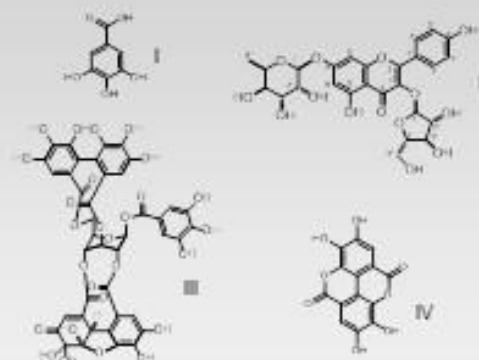
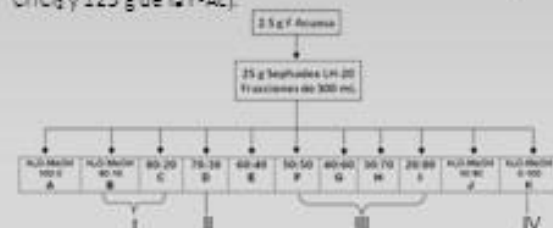


Figura 2. Ácido gálico I, 3-O-(L-arabinofuranosil)-7-O-(D-glucuronido) de Kaempferol II, acetilgeranina III y ácido elágico IV.

La actividad hepatoprotectora del extracto de *G. shiedeanum* (Ex) se evaluó en ratas hembra de dos meses de edad (200 g) de la raza Wistar las cuales se dividieron en ratas pre-tratadas o no con extracto + tioacetamida (TA) y sólo TA.

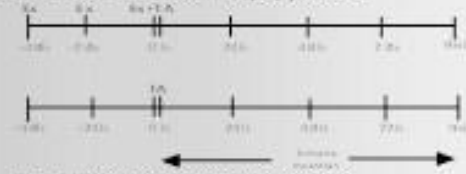


Figura 3. Línea de tiempo del tratamiento de los animales.

Se obtuvo el suero de cada animal a distintos intervalos de tiempo (0, 24, 48, 72 y 96 h) y se determinó cuantitativamente la enzima aspartato aminotransferasa (AST), marcador de daño hepático, mediante la utilización del kit de Spinreact - Aspartato aminotransferasa.

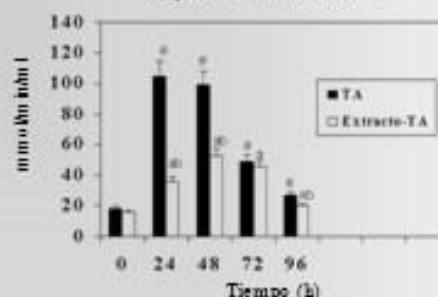


Figura 4. Los resultados expresados en mmol/min/ml de suero, fueron la media \pm SD de los valores obtenidos por duplicado en suero de 4 animales diferentes para cada condición. Las diferencias frente a los respectivos controles están representadas como (a) y las diferencias de los extractos como (b) $p < 0.05$, los datos del blanco no fueron significativos, no se muestran en la gráfica.

CONCLUSIONES

El estudio fitoquímico de *Geranium shiedeanum* condujo al aislamiento de: taninos hidrolizables (I, III y IV) y en menor proporción un flavonoide glicosidado de Kaempferol (II). Cabe destacar que es la primera vez que se describe el compuesto II en el género y además que el rendimiento del compuesto III en el extracto crudo fue del 54%.

El pre-tratamiento con el extracto crudo en el modelo de hepatotoxicidad inducido por tioacetamida en rata, disminuyó y retrasó la lesión hepática en un 66% a las 24 h.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Barnes M. A., R. A., Bloom M. P. A., J. Natl. Heal. Statist. Repor. 2008, 10(12), 1-24.
- 2) Calahan L. F., Wiley-Soley G. K., Nierenz T. J., Brady T. J., Xiao C., Currey S. S., et al. Prev. Chron. Dis 2009;6(2), 1-22.
- 3) Villavicencio N. M. A., Perez-García G. S., Ramírez A. A. Plantas Útiles del Estado de Hidalgo II, 2002. 1ª ed. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca Hidalgo, México p. 10-11.