



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO ANTIOXIDANTE  
SOBRE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN LA  
HEPATOTOXICIDAD EXPERIMENTAL.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**P R E S E N T A:**

**LUIS FERNANDO GRANADOS CASTRO**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI**

MÉXICO, D.F.

Agosto 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Jurado asignado:**

PRESIDENTE: Profesor: Jesús Fernando Montiel Aguirre

VOCAL: Profesor: Eleazar Martínez Barajas

SECRETARIO: Profesor: José Pedraza Chaverri

1er SUPLENTE: Profesor: Juan Diego Ortiz Palma Pérez

2do SUPLENTE: Profesora: Laura Carmona Salazar

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

Laboratorio 209, segundo piso, edificio F de la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Se agradece el apoyo a esta tesis de los proyectos PAPIIT IN210713 Y CONACYT 129838.

Se agradece al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” y al Dr. Rogelio Hernández Pando por su ayuda en los análisis histológicos.

**ASESOR**

---

Dr. José Pedraza Chaverri

**SUSTENTANTE**

---

Luis Fernando Granados Castro

## Índice

1. Antecedentes .....	1
1.1 Cúrcuma y curcumina .....	1
1.1.1 Análogos de la curcumina .....	1
1.1.2 Usos comunes de la curcumina .....	2
1.2 Estrés oxidante.....	3
1.2.1 Curcumina como protector del estrés oxidante .....	3
1.3 Hígado .....	5
1.3.1 Estructura hepática .....	6
1.3.2 Citocromo P450.....	7
1.4 Acetaminofén.....	8
1.4.1 Acetaminofén en modelos animales.....	9
1.4.2 Metabolismo del acetaminofén .....	9
1.5 Mitocondrias.....	10
1.5.1 Fosforilación oxidativa y cadena de transporte de electrones .....	11
1.5.1.1 Componentes de la cadena de transporte de electrones .....	11
1.5.1.1.1 Complejo I o NADH-ubiquinona oxidoreductasa .....	12
1.5.1.1.2 Complejo II o succinato deshidrogenasa.....	12
1.5.1.1.3 Complejo III o ubiquinona: citocromo c oxidoreductasa .....	13
1.5.1.1.4 Complejo IV o citocromo c oxidasa .....	13
1.5.1.2 ATP sintasa o F1F0-ATPasa .....	14
1.5.2 Capacidad respiratoria y desacoplamiento mitocondrial.....	15
2. Planteamiento del problema.....	17

3. Hipótesis .....	17
4. Objetivos.....	18
5. Materiales y métodos.....	18
5.1 Reactivos.....	18
5.2 Animales .....	18
5.3 Modelo experimental .....	19
5.4 Determinación de disfunción hepática en plasma .....	20
5.5 Evaluación del daño histológico en hepatocitos .....	20
5.6 Aislamiento de mitocondrias.....	21
5.7 Cuantificación de proteínas totales.....	21
5.8 Cuantificación del consumo de oxígeno.....	22
5.9 Análisis estadístico.....	22
6. Resultados .....	22
6.1 Efecto de la curcumina y el APAP en el peso corporal y la masa del hígado .....	22
6.2 La curcumina atenúa el daño hepático producido por APAP en ratón .....	23
6.3 La curcumina atenúa el daño histológico inducido por APAP.....	23
6.4 Efecto de la curcumina en los estados de respiración 1 y 2.....	25
6.5 La curcumina previene los efectos del APAP en los estados respiratorios 3 y 4 .....	26
6.6 Efecto del APAP y la curcumina en el coeficiente respiratorio mitocondrial.....	27
6.7 Determinación del valor ADP/O .....	28
7. Discusión.....	29
8. Conclusiones.....	31
9. Perspectivas.....	31
10. Referencias .....	32

## Resumen

**INTRODUCCIÓN.** La curcumina (diferuloilmetano), es uno de los compuestos con mayor actividad biológica presente en la cúrcuma (*Curcuma longa L.*); se ha descrito que posee actividad antioxidante tanto directa como indirectamente, así como actividad antiinflamatoria en modelos celulares y animales. Por otro lado, se sabe que la sobredosis de acetaminofén, analgésico y antipirético más usado a nivel mundial, induce hepatotoxicidad por un exceso en la producción de especies reactivas de oxígeno y por daño a nivel mitocondrial. **JUSTIFICACIÓN.** El acetaminofén es un fármaco muy usado y es la principal causa de daño hepático en diversos países, conocer a fondo su mecanismo de toxicidad a nivel mitocondrial se convierte en algo esencial. Por otro lado, se ha estudiado el efecto protector de la curcumina en diferentes modelos de toxicidad. Sin embargo se desconoce si la actividad biológica de la curcumina previene o atenúa la inflamación y hepatotoxicidad, así como la disfunción mitocondrial producida por acetaminofén en ratones. **HIPÓTESIS.** El acetaminofén causará disfunción mitocondrial a nivel respiratorio; así mismo, si el antioxidante curcumina es capaz de reducir directamente las especies reactivas de oxígeno, de inducir la transcripción de enzimas citoprotectoras y de reducir la inflamación en tejidos, entonces será capaz de prevenir o atenuar la disfunción hepática, los daños histológicos y las alteraciones mitocondriales producidas por acetaminofén. **OBJETIVOS.** Caracterizar la respiración mitocondrial en el presente modelo con sobredosis de acetaminofén; evaluar si la curcumina ejerce efecto hepatoprotector en el modelo, a nivel histológico, funcional y mitocondrial. **METODOLOGÍA.** Los ratones se trataron con una dosis única e intraperitoneal de acetaminofén (350 mg/kg de peso corporal) para inducir hepatotoxicidad. La protección se probó dando a los ratones curcumina (100 mg/kg de peso corporal) de forma oral 90 min antes de la administración del fármaco; se anexaron también grupo control y grupo con una dosis única de curcumina. Los ratones se sacrificaron 14 h después de la última administración para posteriormente analizar la función hepática, las características histológicas, la respiración y los parámetros de respiración mitocondria. **RESULTADOS.** El tratamiento con curcumina atenuó la disfunción hepática

(disminuyó los niveles de alanina aminotransferasa y de aspartato aminotransferasa en plasma sanguíneo), el daño histológico (disminuyó el área de inflamación en zonas porta, porcentaje de células necróticas y aumentó la fracción de células en regeneración), la disfunción respiratoria (marcó tendencias de recuperación en los estados 3 y 4 de respiración y en el índice de control respiratorio) y la disminución del valor ADP/O (regresó este parámetro a valores similares al grupo control).

**CONCLUSIONES.** La toma única de curcumina antes de la sobredosis con acetaminofén fue capaz de disminuir el daño hepático; mostrando además protección importante a nivel mitocondrial. Los resultados sugieren que el complejo I de la cadena de transporte de electrones es dañado en la mitocondria, probablemente de una manera irreversible, y la curcumina no es capaz de atenuar esto de manera significativa. **PERSPECTIVAS.** Para poder ampliar la visión de cómo afecta este fármaco a la mitocondria y principalmente en donde es capaz la curcumina de proteger contra el daño producido dentro de este modelo es necesario realizar Una caracterización de la actividad enzimática de todos los complejos, un análisis de la producción de ATP, un monitoreo de la fuga de protones y un estudio completo de la presencia y generación de especies reactivas de oxígeno en fracción mitocondrial y en homogeneizado de tejido.

## Abreviaciones

ADP	Adenosina difosfato
ALT	Alanina aminotransferasa
APAP	Acetaminofén
ARE	Elementos de respuesta antioxidante
ASB	Albúmina sérica bovina
ASB*	Albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos
AST	Aspartato aminotransferasa
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalasa
Cit	Citocromo
CMC	Carboximetilcelulosa
CR	Coeficiente respiratorio
CTE	Cadena de transporte de electrones
e-	Electrón/Electrones
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error estándar de la media
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FCCP	Carbonil cianida-4-(trifluorometoxy)fenilhidrazona
FMN	Mononucleótido de flavina
FPM	Fuerza protón motriz
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GCL	Glutamato cisteína ligasa
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GST	Glutación S-transferasa
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-pireracil-etanosulfónico
HO-1	Hemo oxigenasa-1
ip	Intraperitoneal



KCl	Cloruro de potasio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potasio monobásico
MEM	Membrana externa mitocondrial
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
MIM	Membrana interna mitocondrial
NADH	Nicotinamida adenín dinucleótido
NAPQI	N-acetil-p-benzoquinonemina
NF- κB	Factor nuclear kappa de células B
NQO1	NAD(P)H: quinona oxidoreductasa
Nrf2	Factor Nuclear (derivado de eritroide-2)- 2
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
Pi	Fosfato inorgánico
PrX	Peroxirredoxina
·QH	Semiquinona
Q	Ubiquinona
SOD	Superóxido dismutasa
SSI	Solución salina isotónica
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina reductasa
x g	Multiplicador por la aceleración gravitacional terrestre (9.81 m/s*s)

## **1. Antecedentes**

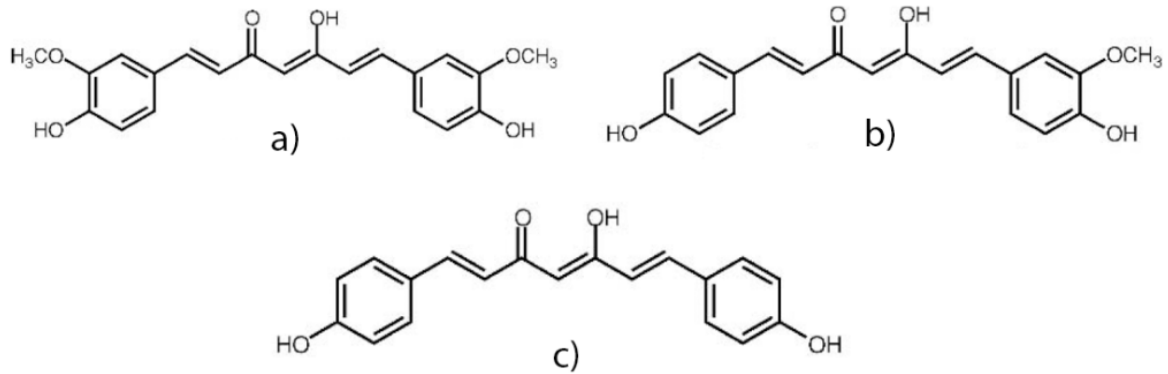
### **1.1 Cúrcuma y curcumina**

La *Curcuma longa* L. es una planta de origen asiático que pertenece a la familia Zingiberáceas, cuyo rizoma color naranja se utiliza como una especia debido a sus propiedades organolépticas; como compuesto para la medicina tradicional por sus propiedades terapéuticas y como colorante textil y alimenticio (Goel *et al.*, 2008). Entre los componentes del extracto de este rizoma están: carbohidratos (4.7-8.2%), aceites esenciales (2.4-4.0%), ácidos grasos (1.7-3.3%), curcuminoides (curcumina, demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina) cuyo contenido aproximado es de un 2.5%, aunque puede rondar entre 2.5-5.0% del peso seco, y otros polipéptidos como la turmerina (0.1 % del extracto seco) (Srinivas *et al.*, 1992).

La curcumina es el fitoquímico que da un color amarillo a la cúrcuma y se ha reconocido como el responsable de la mayoría de los efectos terapéuticos de la cúrcuma, se aisló de la cúrcuma por primera vez en 1815, y la estructura se delineó en 1910 como diferuloilmetano (Figura 1). La curcumina es de naturaleza hidrófoba por lo que es soluble en dimetilsulfóxido, acetona, etanol y aceites. Tiene una absorción de luz máxima en alrededor de 420 nm (Aggarwal *et al.*, 2007).

#### **1.1.1 Análogos de la curcumina**

La cúrcuma contiene tres diferentes curcuminoides: diferuloilmetano, también llamada curcumina, demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina (Figura 1); las tres tienen la capacidad de atrapar especies reactivas de oxígeno (ERO) en sistemas in vitro (Aggarwal *et al.*, 2007) y se les han atribuido propiedades terapéuticas. No está bien definido si las tres moléculas exhiben igual actividad de atrapamiento, aunque en la mayoría de los informes se describió a la curcumina como la más potente (Sreejayan y Rao, 1996, Syu *et al.*, 1998) También se ha sugerido que la mezcla de los tres tiene actividad sinérgica con respecto a cada uno solo (Sreejayan y Rao, 1997).



**Figura 1.** Principales compuestos de la cúrcuma con propiedades terapéuticas: a) diferuloilmetano o curcumina, b) demetoxicurcumina, c) bisdemetoxicurcumina.

### 1.1.2 Usos comunes de la curcumina

La cúrcuma se ha utilizado por mucho tiempo en la medicina tradicional asiática, su uso se recomienda para el tratamiento de varios padecimientos comunes como dolor de estómago, heridas en la piel, inflamación, úlceras, artritis, infecciones y disentería (Goel *et al.*, 2009). Se han descrito diversas actividades biológicas de la cúrcuma y se le atribuyen características de antiparasitario (Reddy *et al.*, 2005), fungicida (Kim *et al.*, 2003), antiproliferativo (Kuttan *et al.*, 1985), entre otros más. Si bien se le atribuyen varios efectos benéficos, sus efectos como anti-inflamatorio y antioxidante son los más estudiados.

Se ha demostrado recientemente que la cúrcuma, particularmente la curcumina, exhibe potentes actividades anti-inflamatorias tal como se observa en una amplia variedad de modelos (Shehzad y Lee, 2013; Heeba *et al.*, 2012; Menon y Sudheer, 2007), principalmente inhibiendo la translocación al núcleo del factor nuclear NF- $\kappa$ B, lo que impide la respuesta inflamatoria celular (Figura 2). Se ha descrito también que la curcumina protege contra sustancias químicas que producen daño y muerte celular, principalmente por sus propiedades antioxidantes (Reyes *et al.*, 2012; Molina-Jijón *et al.*, 2011).

La curcumina también exhibe una potente actividad antioxidante, se ha demostrado que por su estructura química y alto grado de insaturaciones (Figura 1) tiene la capacidad de atrapar ERO directamente; además es capaz inducir mecanismos

indirectos para la producción de enzimas antioxidantes y el restablecimiento del equilibrio oxidante, principalmente por la translocación al núcleo del factor nuclear NrF2 (Carmona-Ramírez *et al.*, 2013; Tapia *et al.*, 2012). Por lo tanto, no es sorprendente el uso de la curcumina en la medicina tradicional asiática contra una gran variedad de enfermedades.

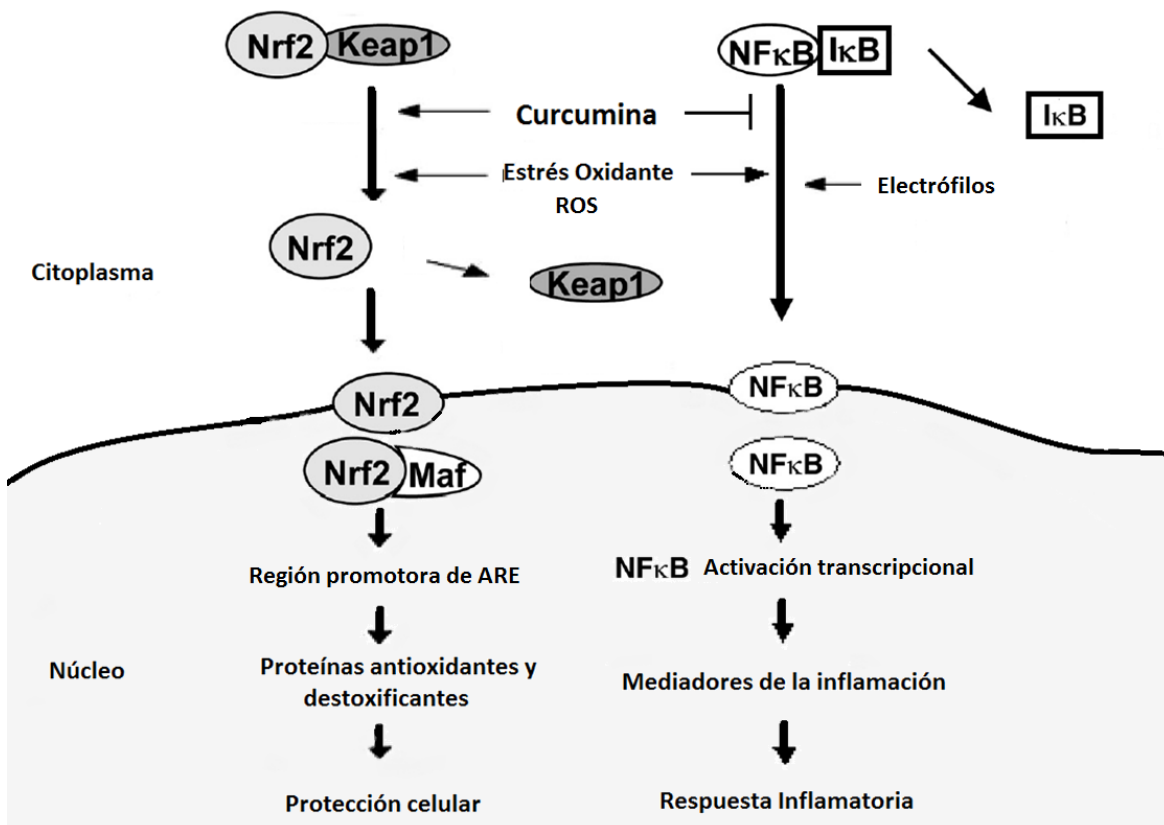
## **1.2 Estrés oxidante**

De manera normal, en la célula existe un equilibrio entre la producción de ERO y la neutralización de éstas por sistemas celulares de defensa antioxidante (Cohen-Kerem y Koren, 2003). El balance entre condiciones oxidantes y defensas antioxidantes se puede perder debido a un aumento en la producción de ERO, a una disminución en los sistemas antioxidantes y de respuesta, o a una combinación de ambos factores; a cualquiera de estas condiciones se le llama estrés oxidante. El estrés oxidante se origina en situaciones fisiológicas anormales y se relaciona con una gran variedad de enfermedades como cáncer, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades hepáticas, disfunción renal, etc. (Konigsberg, 2008).

### **1.2.1 Curcumina como protector del estrés oxidante**

Se ha demostrado que la curcumina puede aumentar la expresión de enzimas antioxidantes como son la glutatión S-transferasa (GST), la glutatión reductasa (GR) y la NAD(P)H:quinona oxidoreductasa (NQO1), entre otras, que ayudan a desintoxicar xenobióticos y a restaurar el balance redox, (Iqbal *et al.*, 2003); todas ellas reguladas por el factor de transcripción Nrf2. El factor de transcripción Nrf2 desempeña un papel fundamental en la activación de genes relacionados con elementos de respuesta antioxidantes (ARE por sus siglas en inglés), está normalmente secuestrado en el citosol como un complejo inactivo con su supresor Keap-1. El estrés oxidante o la presencia de algunos compuestos naturales, inducen la disociación del factor Nrf2 de Keap-1 y la translocación de Nrf2 al núcleo, donde junto con la proteína Maf se une a la región promotora de ARE (Figura 2), activando los genes de respuesta antioxidante (Tapia *et al.*, 2012). El factor de transcripción Nrf2 en el núcleo está asociado con una gran cantidad de proteínas capaces de

disminuir el estrés oxidante, algunas de las cuales se presentan en la Tabla 1 junto con la reacción que llevan a cabo. Se ha descrito también que la curcumina es capaz de ejercer protección a nivel mitocondrial en modelos de daño renal (Molina-Jijón *et al.*, 2011) y cardíaco (González-Salazar *et al.*, 2011).



**Figura 2.** Representación esquemática de la activación Nrf2 y NF-κB por ROS, electrófilos y estrés. La curcumina induce la separación de Nrf2 con Keap-1 induciendo la región ARE; a su vez, puede inhibir la separación de NF-κB con IκB para detener la respuesta inflamatoria. Existe evidencia de que las vías de Nrf2 y NF-κB ejercen influencia inhibitoria mutua el uno del otro, sin embargo no se conoce a fondo el mecanismo (Kim y Vaziri, 2010).

**Tabla 1.** Enzimas antioxidantes dependientes del factor de transcripción Nrf2 y su función.

Proteína	Función protectora
Glutación S-transferasa (GST)	Conjuga electrófilos y reduce oxidantes y peróxidos. $RX + GSH \rightarrow RSG + HX$
$\gamma$ -Glutamato cisteína ligasa ( $\gamma$ GCL)	Cataliza la reacción limitante de la síntesis de GSH. $Glu + Cis + ATP \rightarrow \gamma\text{-Glutamil-Cis} + ADP + Pi$

<b>Glutación reductasa (GR)</b>	Regenera GSH a partir de GSSG. $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$
<b>Tiorredoxina reductasa (TrxR)</b>	Regenera tiorredoxina (Trx) reducida. $Trx-S_2 + NADPH + H^+ \rightarrow Trx-(SH)_2 + NADP^+$
<b>NADPH quinona óxidorreductasa (NQO1)</b>	Previene el ciclo redox de las quinonas, disminuye el nivel de las quinonas electrofílicas, mantiene a la coenzima Q en su forma reducida. $Quinona + NADPH + H^+ \rightarrow Hidroquinona + NADP^+$
<b>Hemo oxigenasa-1 (HO-1).</b> <b>Nota: la HO-1 cataliza la reacción (1) y la biliverdina reductasa cataliza la reacción (2)</b>	Genera antioxidantes (bilirrubina y monóxido de carbono). (1) $Hemo + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow monóxido\ de\ carbono + Biliverdina + NADP^+ + Fe^{2+}$ (2) $Biliverdina + NADPH + H^+ \rightarrow Bilirrubina + NADP^+$
<b>Glutación peroxidasa (GPx)</b>	Descompone peróxidos. $ROOH + 2GSH \rightarrow ROH + GSSG$ $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$
<b>Catalasa (CAT)</b>	Descompone $H_2O_2$ . $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
<b>Peroxirredoxina (Prx)</b>	Descompone $H_2O_2$ . $H_2O_2 + Prx-(SH)_2 \rightarrow 2H_2O + Prx-S_2$
<b>Superóxido dismutasa (SOD)</b>	Convierte superóxido en $H_2O_2$ . $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
<b>Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)</b>	Genera NADPH. $Glucosa\ 6\ fosfato + NADP^+ \rightarrow 6\ fosfogluconato-\delta\ lactona + NADPH + H^+$
<b>6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD)</b>	Genera NADPH. $6\ fosfogluconato + NADP^+ \rightarrow D\text{-ribulosa}\ 5\ fosfato + NADPH + H^+$
<b>Tiorredoxina (Trx)</b>	Reduce diversos compuestos. $Trx-(SH)_2 + proteína-S_2 \rightarrow Trx-S_2 + proteína-(SH)_2$

Si bien existen varios estudios que demuestran las propiedades ya mencionadas de la curcumina, el número de trabajos para examinar su habilidad protectora contra daño provocado por fármacos con efectos tóxicos es bastante limitado. Algunos fármacos producen como efecto secundario estrés oxidante y daño a tejidos específicos, principalmente riñones e hígado por su función fisiológica.

### 1.3 Hígado

El hígado es el órgano glandular más grande del cuerpo, es un órgano intra-torácico, situado detrás de las costillas y cartílagos costales, separado de la cavidad pleural y de los pulmones por el diafragma. Está localizado en el cuadrante superior de la cavidad abdominal y se proyecta a través de la línea media hacia el cuadrante

superior izquierdo (Villalobos, 1993). En recién nacidos representa el 5%, y en el adulto el 2.5% del peso corporal, en este último aproximadamente entre 1.4-1.6 kg en el hombre y 1.2-1.4 kg en la mujer.

### **1.3.1 Estructura hepática**

El hígado tiene cuatro lóbulos: el lóbulo derecho, el lóbulo izquierdo, el lóbulo cuadrado y el caudado. Estos lóbulos se encuentran limitados por una capa delgada de tejido conjuntivo denominada cápsula de Glisson (Villalobos, 1993).

Microscópicamente está constituido por diversas poblaciones celulares. Las principales y más abundantes células (60% por número y 80% por volumen) son llamadas hepatocitos (Sasse, 1986). Los hepatocitos forman láminas hepáticas o redes trabeculadas que sólo tienen una o dos células de espesor (Rohr *et al.*, 1976). Las láminas hepáticas están dispuestas en unidades funcionales denominadas lobulillos hepáticos, están separadas entre sí por grandes espacios capilares denominados sinusoides. Los sinusoides poseen poros relativamente grandes, denominados fenestras, que permiten el paso de algunas proteínas plasmáticas; estos poros permiten también el contacto íntimo entre los hepatocitos y el contenido de la sangre (Braet *et al.*, 1995). Los hepatocitos se observan con facilidad al realizar una tinción con hematoxilina-eosina, por la cual se puede observar la estructura y tamaño del núcleo, la forma y tonalidad del citoplasma, el estado general de los hepatocitos, entre muchas otras cosas (Hardison, 1993).

Entre las otras células que conforman al hígado están: 1) Las células endoteliales, con fenestraciones de 100-200 nm, que forman la pared de las venas y las arterias que recorren al hígado (Braet *et al.*, 1995); 2) Las células de Kupffer, son macrófagos que se encuentran en el área periportal, las cuales se unen al lumen de la red sinusoidal para formar parte del sistema reticuloendotelial; poseen actividad endógena de peroxidasa, secretan metabolitos del ácido araquidónico y tienen receptores específicos de membrana para insulina, glucagón y lipoproteínas, 3) Las células perisinusoidales (células Ito, lipocitos o almacenadores de lípidos), estas se localizan en el espacio de Disse rodeando a las células endoteliales sinusoidales y poseen una gran actividad contráctil debido a sus filamentos de actina y miosina

(Braet *et al.*, 1995), estas células contienen gran cantidad de vitamina A almacenada, sintetizan diferentes proteínas del tejido conectivo y secretan diferentes factores de crecimiento (Kawada *et al.*, 1993).

Las múltiples y diversas funciones del hígado son proporcionadas por todos los tipos de células ya mencionados, ya sea individualmente o en cooperación; la alteración en alguna de las tres puede dar lugar a una disfunción hepática (Sasse, 1986).

Normalmente, en la sangre, se encuentran pequeñas cantidades de alanina aminotransferasa (ALT), pero cuando el hígado sufre un daño (por sustancias tóxicas, fármacos, infecciones, etc) o enfermedad (cirrosis, obstrucciones, etc), se libera una mayor cantidad de ALT al torrente sanguíneo debido al daño en los hepatocitos; así los niveles de ésta se incrementan. Dado que la ALT se altera principalmente por condiciones hepáticas, ésta es un indicador muy confiable de la disfunción del hígado. La cuantificación de actividad de la ALT generalmente se acompaña de otros análisis de la función del hígado como la actividad de aspartato aminotransferasa (AST) para tener un análisis más amplio. La AST se encuentra en diversos órganos como el hígado, el corazón, los músculos y los riñones. No es tan específica del hígado como la ALT, pero en conjunto son marcadores idóneos de daño hepático (Singh *et al.*, 2013).

### **1.3.2 Citocromo P450**

En 1964 se identificó la naturaleza hemoproteica de un pigmento que se encuentra presente en los microsomas hepáticos de diferentes especies de mamíferos y que tras ser reducido por NADPH es capaz de unirse al CO, mostrando un característico pico de absorbancia en el espectro UV a 450 nm (pico de Soret). Por este motivo a esta hemoproteína se la denominó citocromo P-450 (Mulder *et al.*, 2007).

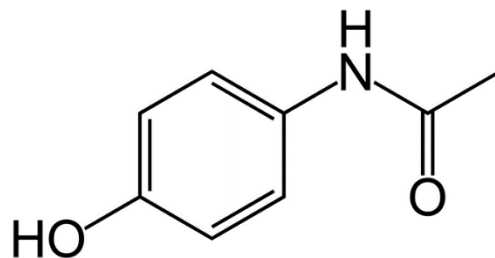
Se encuentra ampliamente distribuido en animales, plantas y protistas (Katz *et al.*, 2007). Su actividad se relacionó con el metabolismo de gran número de xenobióticos como drogas, pesticidas, procarcinógenos, anestésicos, solventes orgánicos, etc., así como de algunas sustancias endógenas como colesterol, ácidos biliares, esteroides, vitaminas liposolubles y ácidos grasos. Se vio que presentaba una amplia distribución entre distintas especies, desde bacterias hasta mamíferos,



así como dentro de un mismo organismo, estando presente en una gran variedad de tejidos como riñón, pulmón, piel, intestino, corteza adrenal, testículos, placenta y otros, aunque es particularmente activo en el hígado (Leysen *et al.*, 1988). En organismos eucariotas se ha detectado prácticamente en todas las membranas subcelulares (Mannens *et al.*, 1993), siendo la mitocondria, y principalmente el retículo endoplásmico las fuentes más importantes (Prior *et al.*, 1999). Los P450s, así como otras enzimas, también pueden activar profármacos u otras sustancias químicas, pudiendo incluso dar lugar a productos reactivos que pudieran dañar la célula. Las enzimas del citocromo P450 son las que más frecuentemente se encuentran involucradas en el metabolismo de xenobióticos (Megens *et al.*, 1994). La desintoxicación de algunos fármacos puede dar origen a moléculas reactivas de alta toxicidad.

#### **1.4 Acetaminofén**

El acetaminofén (APAP), también conocido como paracetamol, es una amida aromática acetilada, que fue utilizada por primera vez en la medicina como antipirético y analgésico cerca de 1880, entró al mercado en 1950 y ha sido uno de los analgésicos principales en el hogar por más de 30 años (Toussaint *et al.*, 2010). El acetaminofén es aceptado como un tratamiento muy eficaz para el alivio del dolor y la fiebre en adultos y menores de edad. Según la nomenclatura de la IUPAC lleva por nombre N-(4-hidroxifenil)acetamida (Figura 3); es el compuesto activo principal en la mayoría de medicamentos para el resfriado, la gripe y varios analgésicos recetados de manera común. La masa molecular del paracetamol es de 151.2 g/mol, es medianamente soluble en agua y en aceites (Wehling, 2013). A dosis recomendadas (40 mg/kg de peso corporal) es seguro, pero debido a su amplia disponibilidad, las sobredosis deliberada o accidental son frecuentes en todo el mundo. Dosis mayores a 70 mg/kg de peso corporal inducen daño hepático en humanos, el cual se agrava cuando las personas ingieren el medicamento después de un ayuno prolongado (Espinosa *et al.*, 2006).



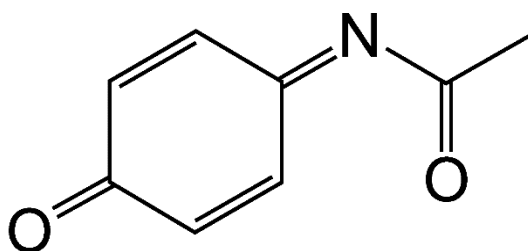
**Figura 3.** Estructura química del acetaminofén.

#### 1.4.1 Acetaminofén en modelos animales

Debido a su alto consumo, la reproducción de daño hepático por APAP se ha estudiado ampliamente en modelos animales. Se ha descrito que el modelo con ratón tienen mucha similitud al de humano en cuanto al mecanismo de toxicidad generado por sobredosis de APAP, dosis de 250 a 500 mg/kg de peso corporal en animales con ayuno de 10 h son suficientes para causar daño hepático alto (McGill *et al.*, 2011).

#### 1.4.2 Metabolismo del acetaminofén

En condiciones normales cerca del 90% del APAP se glucoroniza en el hígado y luego se elimina por vía urinaria; del 10% restante, la mitad es excretada directamente por los riñones y la otra mitad es metabolizada por el citocromo P450, donde se transforma en N-acetil-p-benzoquinonemina (NAPQI) (Quiñónez *et al.*, 2008). El NAPQI (Figura 4) es conjugado rápidamente con glutatión, formando cisteína y mercaptano. Cuando las reservas de glutatión disminuyen a un 70%, el NAPQI comienza a acumularse produciendo daño hepático (Bromer y Black, 2003).



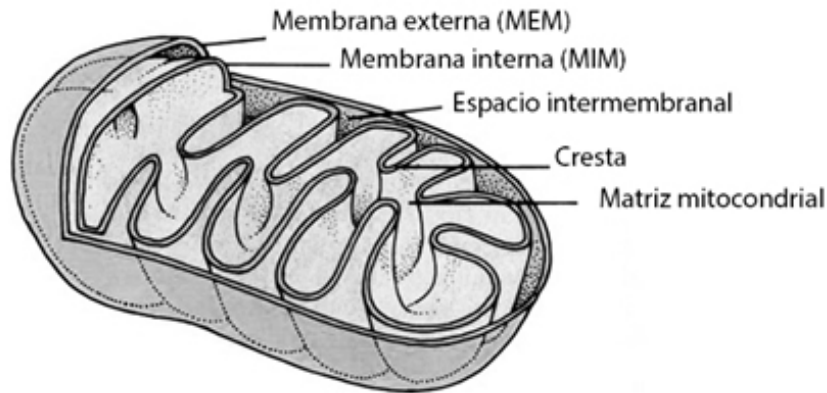
**Figura 4.** Estructura química del N-acetil-p-benzoquinonemina.

En estudios bioquímicos y ultraestructurales se ha demostrado que el NAPQI puede causar cambios morfológicos en las mitocondrias del hígado (Placke *et al.*, 1987; Myers y Beierschmitt, 1988). Si bien se ha demostrado que hay daño mitocondrial con sobredosis de APAP, aún no está totalmente caracterizado cómo afecta a la respiración de la mitocondria. Se ha descrito que en la hepatotoxicidad producida por sobredosis de APAP las uniones de NAPQI con proteínas hepáticas son frecuentes hacia las proteínas mitocondriales y que se produce estrés oxidante en las mitocondrias de hígado de ratón (McGill *et al.*, 2012).

### **1.5 Mitocondrias**

Las mitocondrias son organelos presentes en las células eucariontes, emplean el oxígeno como aceptor final de electrones ( $e^-$ ) durante su proceso de respiración, si bien tienen muchas funciones biológicas en la célula, la más importante de ellas es la generación de energía a través de la formación de adenosina trifosfato (ATP), molécula que es empleada como moneda energética en las vías metabólicas de la célula (Metzler, 2003). Las mitocondrias son esenciales también para la homeostasis de  $Ca^{2+}$ , participan en la regulación del ciclo celular y en las vías de señalización que controlan la respuesta celular ante estímulos externos, intervienen en la regulación de la apoptosis celular, entre otras funciones (McBride *et al.*, 2006). Por trabajar directamente con transportadores de  $e^-$  y por realizar la reducción del oxígeno son capaces de generar ERO (Wallace *et al.*, 2010).

La mitocondria cuenta con una membrana externa (MEM) y una membrana interna (MIM), generando entre éstas dos el espacio intermembranal. La MIM se acomoda de forma especial dentro de la mitocondria para formar crestas y aumentar así la longitud de la misma (Figura 5).



**Figura 5.** Representación básica de la estructura de una mitocondria.

### **1.5.1 Fosforilación oxidativa y cadena de transporte de electrones**

En las etapas anteriores de la respiración se generaron moléculas capaces de transportar  $e^-$  como son nicotinamida adenín dinucleótido (NADH), nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (NADPH), flavín adenín dinucleótido ( $FADH_2$ ); estas moléculas transportan  $e^-$  hasta lo que se conoce como cadena de transporte de  $e^-$  (CTE). Los  $e^-$  pasan a través de una serie de proteínas (también llamados complejos) para finalmente ser transferidos al oxígeno generando agua, todo en base al potencial redox de los complejos involucrados (Hansford *et al.*, 2001). El paso de los  $e^-$  a través de la CTE genera energía en forma de fuerza protón motriz (FPM) en el espacio intermembranal, dicha energía hace capaz a la ATP sintasa de sintetizar ATP a partir de la unión de adenosín difosfato (ADP) y fosfato inorgánico ( $P_i$ ) (Saraste, 1999).

#### **1.5.1.1 Componentes de la cadena de transporte de electrones**

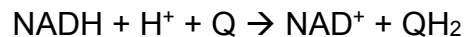
La CTE está formada por cuatro complejos enzimáticos localizados en la MIM (Saraste, 1999), todos ellos son capaces de unirse de distintas formas, junto con la ATP sintasa, para formar los denominados supercomplejos (Dudkina *et al.*, 2010). La ATP sintasa también es conocida como el complejo V de la CTE, aunque formalmente no participa en la transferencia de  $e^-$  (Figura 6).

Los cuatro complejos de la CTE (Figura 6) son: el complejo I (NADH deshidrogenasa o NADH-UQ oxidoreductasa); el complejo II (succinato deshidrogenasa), el complejo III (complejo bc<sub>1</sub> o ubiquinona:citocromo c oxidoreductasa) y el complejo IV (citocromo c oxidasa) (Nelson y Cox, 2004).

#### **1.5.1.1.1 Complejo I o NADH-ubiquinona oxidoreductasa**

Es el complejo de mayor tamaño de la CTE, incluye un mononucleótido de flavina (FMN) y al menos seis centros hierro-azufre. Este complejo tiene forma de L, con uno de los brazos en la MIM y el otro extendido dentro de la matriz mitocondrial. En el complejo I se catalizan dos procesos simultáneos que están obligadamente acoplados:

a) La transferencia exergónica de un ión hidruro a la ubiquinona (Q) por el NADH y de un protón proveniente de la matriz, expresada por:



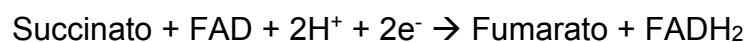
b) La transferencia endergónica de 4 protones desde la matriz al espacio intermembranal.

El complejo I es entonces una bomba de protones motivada por la energía de transferencia de e<sup>-</sup>, los protones se mueven de la matriz mitocondrial hacia el espacio intemembranal, el cual se carga positivamente.

El ubiquinol (QH<sub>2</sub>) difunde en la membrana mitocondrial interna y pasa del complejo I al III, los barbitúricos y otros compuestos como la rotenona inhiben el transporte de e<sup>-</sup> mediante el complejo I al bloquear la transferencia desde Fe-S hacia Q (Krishnamoorthy y Hinkle, 1988). El complejo I es un importante generador de ERO principalmente en la transferencia de e<sup>-</sup> a ubiquinona (Dudkina *et al.*, 2010).

#### **1.5.1.1.2 Complejo II o succinato deshidrogenasa**

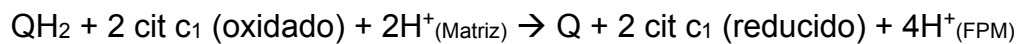
Es un complejo proteico que pertenece al ciclo de Krebs y además participa en la CTE por medio de la transferencia de e<sup>-</sup> proveniente del succinato y transportados por FAD a la Q, para esta posteriormente transferir los e<sup>-</sup> al complejo III.



Contiene FAD, varios centros Fe-S y un hemo tipo-b, el cual mantiene al complejo anclado a la membrana. El complejo II no transloca protones al espacio intermembranal, por lo tanto solo alimenta de e<sup>-</sup> a la CTE (Metzler, 2003).

#### **1.5.1.1.3 Complejo III o ubiquinona: citocromo c oxidoreductasa**

El complejo III es un dímero de monómeros idénticos, la interfase entre ambos monómeros forma dos cavidades, cada una de ellas contiene un sitio de unión diferente para QH<sub>2</sub>, cuyos intermediarios se mueven entre estas dos cavidades protegidas. En este complejo se acopla la transferencia de e<sup>-</sup> del QH<sub>2</sub> al citocromo c con la transferencia vectorial de protones de la matriz hacia el espacio intermembranal. El paso de e<sup>-</sup> y protones a través del complejo III se puede describir con la ecuación neta para la reacción redox del ciclo Q:



El ciclo adecúa el intercambio de e<sup>-</sup> entre la Q (acarreadora de dos e<sup>-</sup>) y los citocromos b<sub>562</sub>, b<sub>566</sub>, c<sub>1</sub> y c (acarreadores de un e<sup>-</sup>), y explica la estequiometría medida de 4 protones translocados por par de e<sup>-</sup> que pasan a través del Complejo III al citocromo c. La transferencia de e<sup>-</sup> de QH<sub>2</sub> al citocromo c mediada por el complejo III, se lleva a cabo por una serie de reacciones denominada ciclo de Q, el cual tiene como intermediario al semiquinona (-QH), que es capaz de generar gran cantidad de ERO si existe una mala función del complejo III.

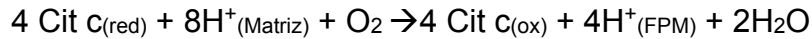
El citocromo c es una proteína soluble en el espacio intermembranal y está anclada a la MIM. Después de que su único grupo hemo acepta un e<sup>-</sup> del complejo III, el citocromo c se moviliza hacia el complejo IV para donar un e<sup>-</sup> a un centro binuclear de cobre (Hatefi, 1985).

La antimicina A bloquea el flujo de e<sup>-</sup> del complejo III al citocromo c, bloqueando la continuidad del transporte de e<sup>-</sup> (Metzler, 2003).

#### **1.5.1.1.4 Complejo IV o citocromo c oxidasa**

La citocromo c oxidasa consta de 13 polipéptidos, que a su vez, conforman tres subunidades, una de ellas cumple únicamente funciones estructurales, mientras que las dos restantes contienen centros redox: citocromos a y a<sub>3</sub>; iones Cu (Cu<sub>a</sub><sup>2+</sup>

y  $\text{Cu}_b^{2+}$ ) y también iones  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  (Metzler, 2003). La citocromo c oxidasa acepta cuatro  $e^-$  del citocromo c (2 por cada par de  $e^-$ ), uno a la vez, los cuales emplea para realizar la reducción del  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ .



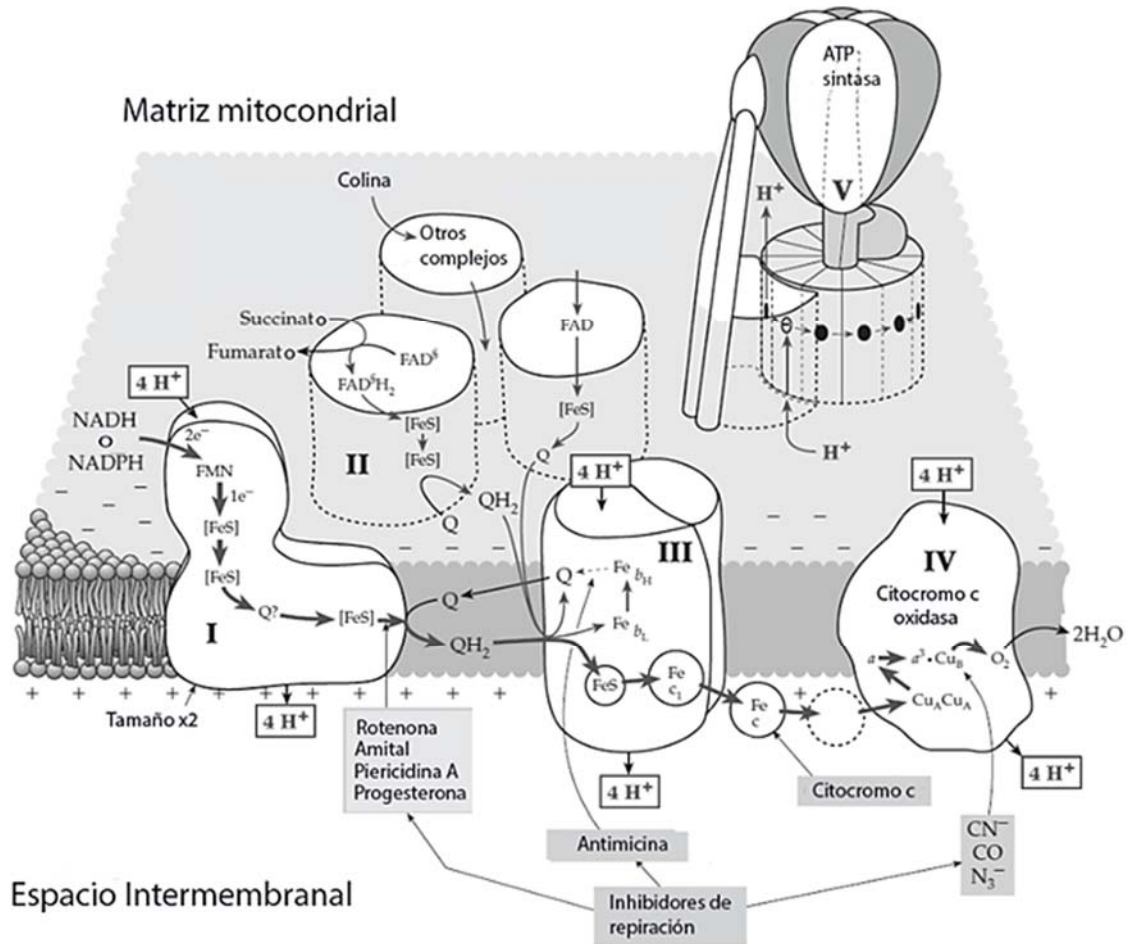
Los  $e^-$  entran a través del centro  $\text{Cu}_a^{2+}$ , pasan por citocromo a, después por el citocromo  $a_3$  y por último al centro  $\text{Cu}_b^{2+}$  donde se lleva a cabo la reducción del  $\text{O}_2$  (Metzler, 2003), dicha reacción requiere cuatro  $e^-$  y cuatro  $\text{H}^+$ , por lo que, adicionalmente, cuatro  $\text{H}^+$  son bombeados a través de la membrana interna en cada ciclo catalítico (Hansford *et al.*, 2001). Un mal desempeño de este complejo podría producir reducciones incompletas del oxígeno formando ERO y radicales libres, disparando estrés oxidante en la célula.

#### 1.5.1.2 ATP sintasa o $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATPasa

El gradiente de protones generado por la CTE es empleado para la síntesis de ATP por medio de un complejo constituido por 16 subunidades las cuales conforman dos componentes o factores mayoritarios,  $\text{F}_1$  y  $\text{F}_0$ . Este complejo se conoce como ATPasa o ATP sintasa, cada nombre describe una actividad catalítica diferente debido a que este complejo no sólo sintetiza ATP, sino también lo puede hidrolizar, dependiendo de la dirección que presente el flujo de protones y del estado estructural de la CTE (Metzler, 2003). Dado que termodinámicamente la hidrólisis del ATP se puede llevar a cabo por la ATP sintasa, la correcta estructura de la mitocondria es fundamental para una buena producción de energía.

La ATP sintasa ocupa 3 protones, que pasan a través de su subunidad  $\text{C}_{10}$ , para realizar un giro de sus subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (en la parte  $\text{F}_1$  hay 3  $\alpha$  y 3  $\beta$ ) permitiendo la síntesis de ATP, así es como se acopla el transporte de  $e^-$  con la fosforilación oxidativa (síntesis de ATP) utilizando la FPM acumulada en el espacio intermembranal (Saraste, 1999).

Cuando las mitocondrias son sometidas a estrés, o pierden su funcionalidad, el acoplamiento entre la CTE y la ATP sintasa se pierde, produciendo un consumo de oxígeno sin la consecuente formación de ATP, esto indica sin duda la pérdida de la funcionalidad principal de la mitocondria.



**Figura 6.** Representación de la cadena de transporte de e<sup>-</sup> y la fosforilación oxidativa; se muestran los inhibidores de la respiración, también se puede observar que los complejos son móviles dentro de la MIM y que existen otras fuentes externas de e<sup>-</sup>. Basado en Metzler (2003, pp 1020).

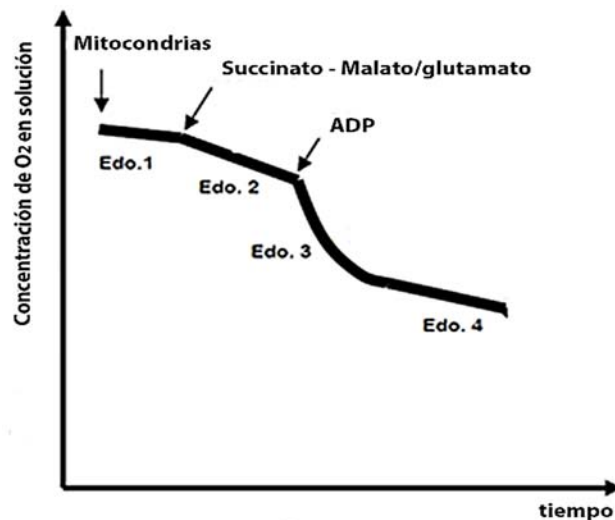
### 1.5.2 Capacidad respiratoria y desacoplamiento mitocondrial

Dependiendo de la necesidad energética de la célula la mitocondria regula la producción de ATP siendo proporcional al consumo de oxígeno, ADP y Pi; a la relación entre el consumo de oxígeno y la síntesis de ATP se le denomina acoplamiento mitocondrial o ADP/O, la regulación de la velocidad de la fosforilación oxidativa motivada por la concentración de ADP se denomina índice de control respiratorio (ICR) (Hansford *et al.*, 2001). Monitoreando el consumo de oxígeno de las mitocondrias aisladas se puede saber cómo responden éstas a la presencia de sustratos como son succinato, malato-glutamato, malato-piruvato, ADP y Pi,



inhibidores como el cianuro (complejo IV), la rotenona (complejo I), la antimicina A (complejo III) y la oligomicina (Complejo V) o desacoplantes como son la carbonil cianida-4-(trifluorometoxy)fenilhidrazona (FCCP).

Las variaciones registradas en la velocidad de consumo de oxígeno al agregar alguna de las sustancias antes mencionadas, se conocen como estados de respiración mitocondrial. Se definieron los estados de respiración mitocondrial en base a un protocolo experimental de oximetría cerrada empleando mitocondrias aisladas (Gnaiger, 2010). El estado 1 representa la respiración mitocondrial basal, tal estado se mide sólo con la presencia de las mitocondrias aisladas y generalmente Pi; el estado 2 representa la respiración mitocondrial en presencia de Pi y sustrato de oxidación; el estado 3 es el estado que registra la mayor velocidad de respiración, es la respiración mitocondrial en presencia de ADP, sustrato de oxidación y Pi; el estado 4 comienza generalmente cuando todo el ADP adicionado ha sido fosforilado (algunas veces cuando se termina el sustrato de oxidación) provocando una disminución en la velocidad de consumo de oxígeno debido a la ausencia de algún sustrato. La relación entre el estado 3 y el estado 4 se llama índice de control respiratorio, este valor es adimensional y da una muy buena idea de la integridad mitocondrial (González-Calvar y Coirini, 2004).



**Figura 7.** Evolución de la concentración de oxígeno en un estudio de oximetría mitocondrial.

Dada la importancia del APAP, por su alto consumo en el mundo y toxicidad potencial, es importante evaluar las alteraciones mitocondriales producidas por los metabolitos generados al consumirlo y así ayudar a describir mejor los mecanismos que las producen. Para entender el mecanismo del NAPQI cuando se fija a proteínas de membrana mitocondrial durante la sobredosis de APAP es muy importante evaluar las alteraciones en el coeficiente de respiración mitocondrial, así como en el acoplamiento entre la cadena de transporte de e- y la fosforilación oxidativa. Tomando en cuenta que se genera estrés oxidante en mitocondrias hepáticas por exceso de NAPQI es muy importante además evaluar si el tratamiento antioxidante puede atenuar las alteraciones mitocondriales secundarias a la sobredosis de APAP.

## **2. Planteamiento del problema**

La curcumina es un compuesto que ha sido ampliamente estudiado y se le han atribuido propiedades antioxidantes en diversos modelos *in vivo* e *in vitro*. Por otro lado, se sabe que una sobredosis de acetaminofén produce estrés nitrante y oxidante; aumenta marcadores de daño hepático como son ALT y AST; y produce daño a la membrana mitocondrial, sin embargo no se tiene caracterizada la disfunción mitocondrial a nivel respiratorio producida por APAP y se desconoce si el consumo de una única dosis de curcumina es capaz de prevenir el daño hepático en ratón así como las alteraciones mitocondriales producidas por acetaminofén.

## **3. Hipótesis**

La sobredosis de acetaminofén producirá, principalmente por un aumento en las ERO y por alteraciones estructurales a la mitocondria, una disfunción en la respiración mitocondrial; sin embargo, dado que la curcumina es capaz de reducir directamente el estrés oxidante e inducir la transcripción de enzimas antioxidantes, esta será capaz de prevenir los efectos dañinos de la sobredosis de acetaminofén.

#### **4. Objetivos**

Evaluar si la ingesta de curcumina previene o disminuye la hepatotoxicidad producida por una sobredosis de acetaminofén en ratón.

Caracterizar la función respiratoria y el desacoplamiento en mitocondrias de hígado de ratones sometidos a una sobredosis de acetaminofén.

Determinar si el consumo de curcumina es capaz de prevenir o atenuar el daño mitocondrial producida por una sobredosis de acetaminofén.

#### **5. Materiales y métodos**

##### **5.1 Reactivos**

Los siguientes reactivos se compraron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA): curcumina (C1389; LOT 079K1756), acetaminofén (A7085; LOT 099K0127V), D-mannitol (M9647; LOT 070M0093V), succinato de sodio dibásico (S2378; LOT 055K0019), HEPES (H3375; LOT 32H5655), albúmina sérica bovina (ASB) (A-6793; LOT 42H0145), ADP (A2754), FCCP (C2920), rotenona (R8875), albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (ASB\*) (A8806), formalina al 10% (HT501128). De Mallinckrodt (NY, EUA) se compraron el  $K_2HPO_4$  (7088) y el KCl (6858). De EliTech se compraron los estuches AST (ASSL 0410 AST/GOT; LOT 10-3166) y ALT (ALSL 0410 ALT/GOT; LOT 42H0145). La sacarosa (832-208; LOT M300KTTD) se compró en CMS Chempure Brand (Canadá). Para la cuantificación de proteína se utilizó el reactivo BIO-RAD Protein Assay (500-0006) de BIO-RAD Laboratories (CA, EUA). El pentobarbital utilizado fue: Sedalphorte MR Reg Q-7503-003 (México). Los demás reactivos y compuestos que se usaron fueron de alta pureza y se obtuvieron comercialmente.

##### **5.2 Animales**

Se utilizaron ratones macho CD1 con un peso inicial de 35-40 g. Los animales se mantuvieron bajo condiciones constantes de temperatura, humedad e iluminación (ciclos de 12 h luz/oscuridad), se colocaron en cajas de acrílico y se les suministró una dieta estándar (Tekland Global Diets 2018S rodent diet; Harland Laboratories Inc., Maddison, WI, EEUU) y agua purificada *ad libitum*. Todos los procedimientos

que se llevaron a cabo en los ratones se apegaron a la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999 y para la disposición de los residuos biológicos se manejó la NOM-087-ECOL-1995. La manipulación de los animales se realizó siempre procurando minimizar el sufrimiento de los mismos.

### **5.3 Modelo experimental**

Se estudiaron 4 grupos (n=5/grupo):

- 1) Grupo control (CT), los ratones se trataron por vía oral con carboximetilcelulosa (CMC) al 0.05% (vehículo de la curcumina) y 90 min después se inyectó intraperitonealmente (ip) con solución salina isotónica (SSI), vehículo del APAP.
- 2) Grupo tratado con curcumina (CUR), la curcumina se disolvió en CMC y se administró, con sonda intragástrica, una dosis de 100 mg/kg de peso corporal por vía oral seguida de una inyección ip de SSI 90 min después.
- 3) Grupo tratado con acetaminofén (APAP), se administró CMC oralmente y después de 90 min se inyectó ip una dosis de 350 mg/kg de peso corporal de APAP previamente diluido en SSI.
- 4) Grupo tratado con curcumina y acetaminofén (CUR+APAP), la curcumina se disolvió en CMC y se administró, con sonda intragástrica, una dosis 100 mg/kg de peso corporal por vía oral, 90 min después se inyectó ip una dosis de 350 mg/kg de peso corporal de APAP previamente diluido en SSI.

Los animales se mantuvieron sin alimento 7 h antes de toda manipulación y se sacrificaron 14 h después de la última administración.

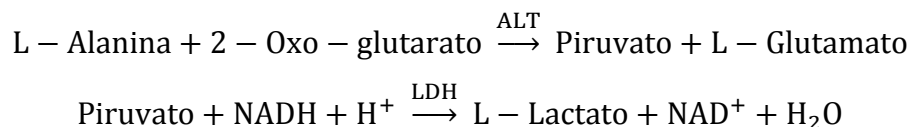
Pasado este tiempo los animales se administraron con una dosis de pentobarbital ip de 80 mg/kg de peso corporal para quedar completamente sedados. Una vez que no daban respuesta motriz alguna se desangraron por el plexo al cortar la vena axilar. La sangre se recibió directamente en tubos eppendorf de 1.5 mL con heparina como anticoagulante, cuando se recolectó suficiente sangre los animales se sacrificaron por dislocación cervical, el plasma se separó centrifugando los tubos 10 min a 5,000 x g y se almacenó a 4°C hasta su análisis.

#### 5.4 Determinación de disfunción hepática en plasma

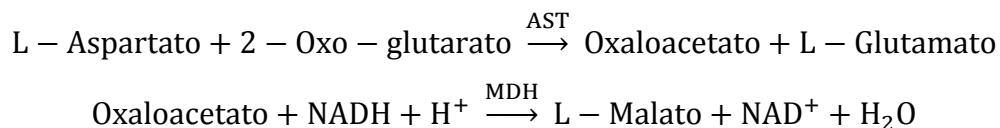
El daño hepático se evaluó cuantificando, con estuches comerciales, la actividad enzimática de ALT y de AST en plasma.

Las dos reacciones se basan en un ensayo cinético espectrofotométrico en el que se mide la desaparición del NADH a 340 nm, la cual es directamente proporcional a la actividad de las enzimas. Las reacciones son:

ALT



AST



#### 5.5 Evaluación del daño histológico en hepatocitos

A partir del hígado recién extraído se obtuvieron rebanadas transversales con un grosor de cerca de 1 mm. Las rebanadas se colocaron rápidamente en formalina al 10% por 1 semana para fijar el tejido. El tejido ya fijado se lavó con alcohol y posteriormente con xilol para ser después ser incluido en parafina, del bloque de parafina se realizaron cortes de 4  $\mu\text{m}$  de grosor, los cuales se adhirieron a portaobjetos de vidrio. Después de desparafinar el portaobjetos se realizó una tinción hematoxilina-eosina para luego fijar el tejido con resina.

La histología se observó en la zona porta hepática, cerca de las venas porta con un diámetro de entre 150 y 200  $\mu\text{m}$ , área en la cual se espera más daño debido a que los hepatocitos en esta zona son los primeros en comenzar a metabolizar al APAP y existe entonces mayor concentración de NAPQI. Se determinaron como marcadores de daño 4 parámetros: a) el área de inflamación visible, seleccionada como las zonas con presencia de macrófagos y restos celulares, se informa como porcentaje tomando un área total de 150,000  $\mu\text{m}^2$  siempre con la vena porta en el centro; b) el porcentaje de hepatocitos visualmente normales en un área de 50,000  $\mu\text{m}^2$  siempre con la vena porta en el centro (esta área fue utilizada también para los

dos parámetros siguientes); c) el porcentaje de hepatocitos sin función (con núcleo condensado, con núcleo roto y con membrana fracturada); d) el porcentaje de hepatocitos en regeneración (hepatocitos binucleados, núcleos expandidos y núcleos con alguna etapa visual de mitosis). Para este análisis sólo se tomaron en cuenta hepatocitos con núcleos claramente visibles.

### **5.6 Aislamiento de mitocondrias**

El equipo y todos los amortiguadores utilizados en el aislamiento se mantuvieron siempre a 4°C. Inmediatamente después de la dislocación cervical de los animales, se extrajeron los 4 lóbulos del hígado y se colocaron en amortiguador de aislamiento con la siguiente composición: D-manitol 220 mM, sacarosa 75 mM, EDTA 1 mM, HEPES 10 mM, ASB\* 1 mg/mL a pH 7.2. Posteriormente el tejido se pesó, se cortó finamente y se lavó en dos ocasiones con amortiguador de aislamiento fresco. Al tejido se adicionó amortiguador de aislamiento en una proporción de 1:4, posteriormente se homogeneizó en un Potter de vidrio (5 mL) por cerca de 20 s. El homogeneizado se sometió a una primera centrifugación de 2,500 x g por 5 min (Microfuga R, Beckman CA, rotor F241.5P 181/08) para sedimentar los restos celulares. Se recuperó el sobrenadante y éste se centrifugó a 12,000 x g por 15 min; el botón café precipitado se resuspendió en 1 mL de amortiguador de aislamiento para ser centrifugado de nuevo a 12,000 x g por 10 min, después de centrifugar se tiró por completo el sobrenadante y se adicionaron 50 µL de amortiguador de aislamiento sin ASB\* para evitar sobreestimación de proteínas.

### **5.7 Cuantificación de proteínas totales**

La proteína se cuantificó en base a la técnica de Bradford (1976) adaptada a una microplaca de 96 pozos, la mezcla final se incubó y agitó por 15 min, y se leyó la absorbancia a 595 nm (Biotek, Sinergy HT). La técnica se basa en el cambio de coloración del azul del Coomassie G-250 cuando éste se une a las proteínas presentes absorbiendo a 595 nm, para esta cuantificación es necesaria una curva patrón que se realizó de 0 a 14 µg/mL con ASB. Las mitocondrias provenientes del

último paso del aislamiento se resuspendieron, se tomaron 5  $\mu\text{L}$  del resuspendido y se realizó una dilución 1:10 para cuantificar la proteína.

### **5.8 Cuantificación del consumo de oxígeno**

El monitoreo del consumo de oxígeno se realizó en un oxímetro con electrodo tipo Clark 782 modelo MT200 (Strathkelvin Instruments, ML, Escocia) a temperatura constante de 30°C, con un volumen total de 100  $\mu\text{L}$  en la cámara y con agitación constante. La cámara se llenó con amortiguador de respiración con la siguiente composición: KCl 130 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM, HEPES 10 mM y EDTA 1 mM a pH 7.2. Después de cuantificar la proteína se colocó el volumen necesario para tener 20  $\mu\text{g}$  de proteína total en la cámara de respiración (estado 1), se agregó succinato a una concentración final de 10 mM ó malato (5 mM)/glutamato (10 mM) en la cámara (estado 2), se agregó ADP a una concentración final de 115  $\mu\text{M}$  en la cámara (estado 3), se esperó a que el ADP presente fuera utilizado y la tasa de respiración regresara a estado basal (estado 4). El coeficiente de respiración se calculó dividiendo el estado 3 entre el estado 4 y la relación ADP/O se calculó dividiendo los mol de ADP adicionados a la cámara entre los mol de oxígeno consumidos para la generación de ATP a partir de ADP y Pi.

### **5.9 Análisis estadístico**

Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar de la media (EEM), se realizaron análisis de varianza de una vía para encontrar si había diferencia significativa entre los grupos, las diferencias entre cada grupo se determinaron posteriormente con la prueba de Bonferroni, los valores se consideraron significativamente diferentes con una  $p < 0.05$  (95% de confiabilidad). Para los análisis estadísticos se utilizó el software Graph Pad Prism 5.

## **6. Resultados**

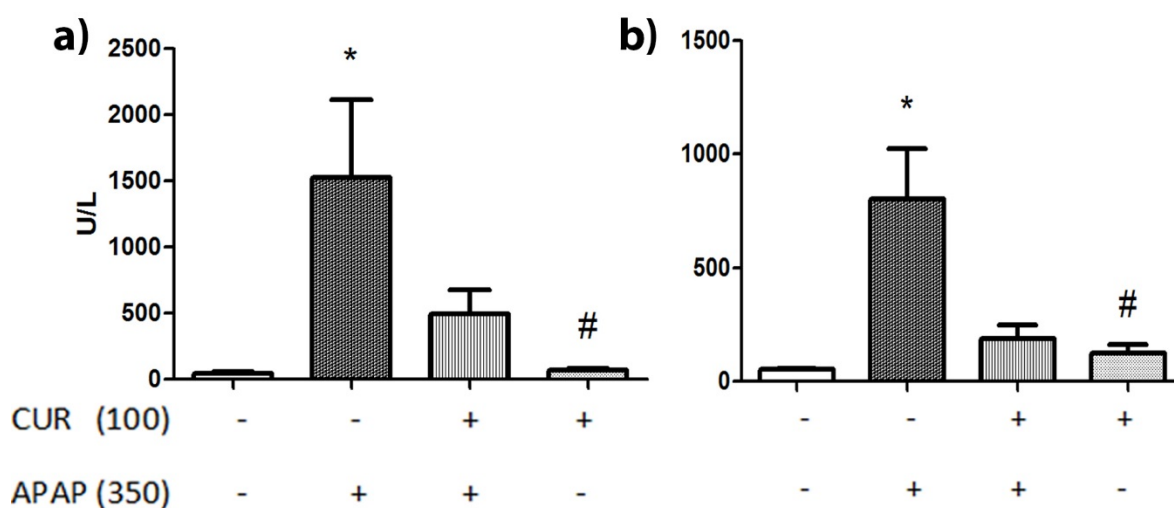
### **6.1 Efecto de la curcumina y el APAP en el peso corporal y la masa del hígado**

Bajo estas condiciones experimentales no se observaron diferencias significativas en el peso corporal de los ratones tras ser administrados con APAP, curcumina o

ambas; así mismo, la masa del tejido hepático no fue diferente entre los grupos tratados y el grupo control (Tabla 2).

### 6.2 La curcumina atenúa el daño hepático producido por APAP en ratón

El tratamiento con 350 mg/kg de peso corporal de APAP indujo daño en el hígado, el cual se hizo evidente por el aumento en la actividad de ALT y de AST en plasma sanguíneo (Figura 8). Si bien la curcumina es capaz de disminuir el efecto producido por APAP ( $p < 0.05$ ), se observa claramente que los marcadores estudiados no regresan a valores similares a los del grupo CT. La administración única de curcumina no produce cambios significativos en comparación a los animales control (Figura 8).



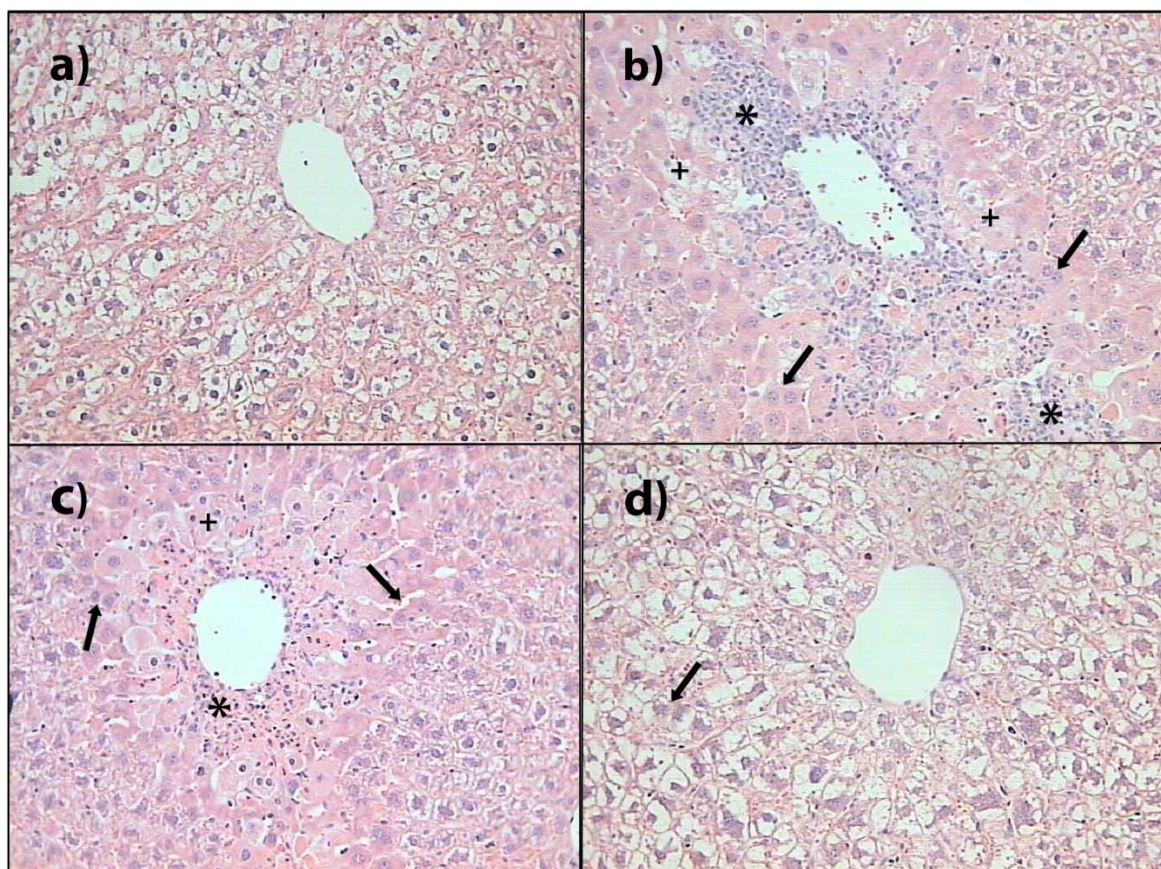
**Figura 8.** Daño hepático después de 14 h de la administración de APAP evaluado en plasma sanguíneo por la actividad enzimática de (a) ALT y de (b) AST. Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  EEM,  $n = 5$ . \* $p < 0.05$  vs. CT, # $p < 0.05$  vs. APAP.

### 6.3 La curcumina atenúa el daño histológico inducido por APAP

El APAP produce un alto número de hepatocitos dañados, esto a su vez induce la llegada de macrófagos a la zona porta observándose inflamación en el área, cuando el animal tiene una administración previa de curcumina se observa una menor



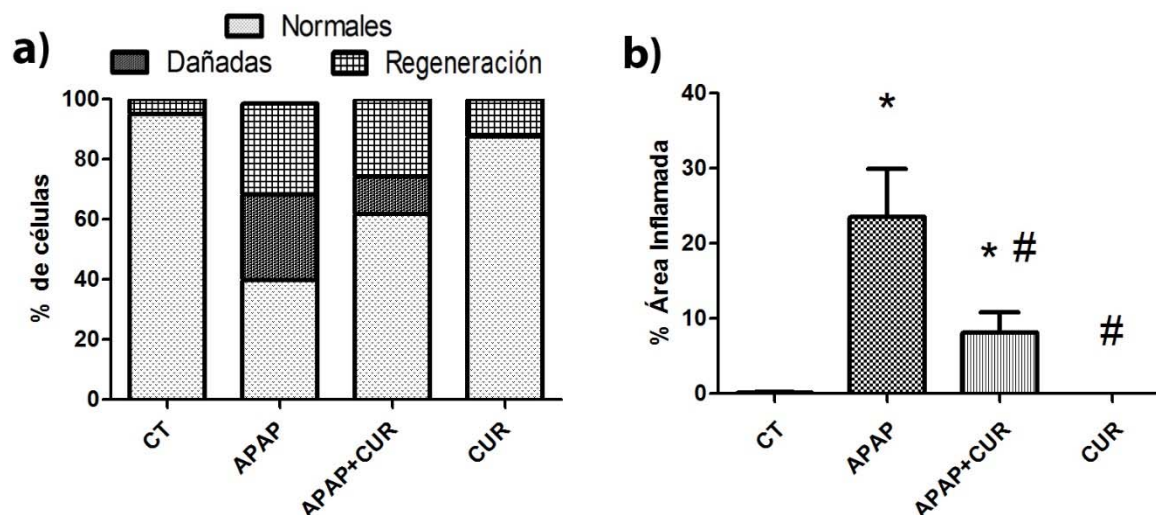
presencia de macrófagos en esta zona (Figura 9); el porcentaje de área inflamada cuando los animales son sometidos a una sobredosis de APAP es de  $23.53 \pm 6.34$ , la cual disminuye significativamente a  $8.11 \pm 2.67$  cuando se da el tratamiento previo con curcumina (Figura 10 (b)).



**Figura 9.** Efecto de la curcumina sobre las alteraciones histológicas inducidas por APAP. Las imágenes son representativas de: a) grupo CT, b) grupo APAP, c) grupo APAP+CUR y d) grupo CUR. Se observan zonas con muerte celular (+), células en regeneración (flechas) y zonas inflamadas con presencia de macrófagos y linfocitos (\*).

En cuanto a la relación entre hepatocitos sin daño, dañados y en regeneración se observa en la Figura 10 (a) cómo el APAP aumenta las células muertas hasta en un  $28.33 \pm 8.55\%$ , valor que se reduce considerablemente a  $12.43 \pm 5.48\%$  cuando se da un tratamiento previo con curcumina. Es importante mencionar que si bien no hay diferencia entre el valor de células en regeneración del grupo CT y del grupo CUR,

parece existir una tendencia a aumentar los hepatocitos en regeneración con el sólo consumo de curcumina.



**Figura 10.** Observaciones histológicas. a) Relación entre los hepatocitos en regeneración, dañados y normales en un área de  $50,000 \mu\text{m}^2$  observada con un aumento 40x. b) Porcentaje de área inflamada en  $150,000 \mu\text{m}^2$  a un aumento de 20x. Los resultados en b) se presentan como promedio  $\pm$  EEM,  $n = 5$ . \* $p < 0.05\%$  vs. CT, # $p < 0.05\%$  vs. APAP.

#### 6.4 Efecto de la curcumina en los estados de respiración 1 y 2

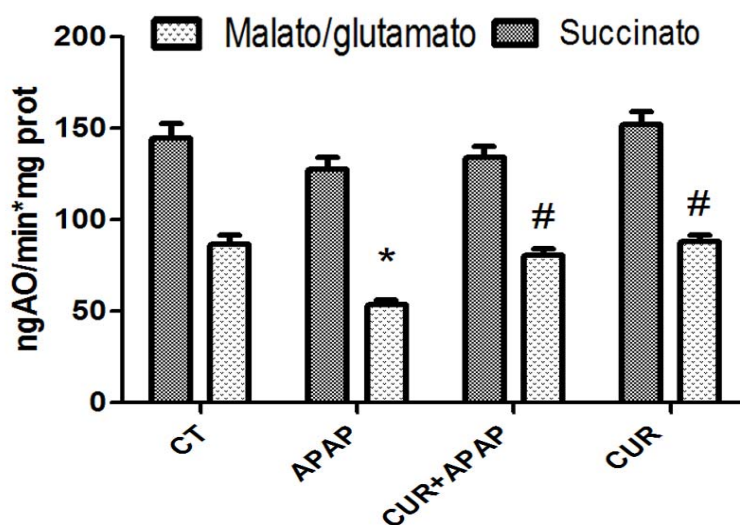
Bajo estas condiciones experimentales no se observaron diferencias significativas en los estados 1 y 2 de la respiración mitocondrial para ninguno de los grupos tratados (Tabla 2).

**Tabla 2.** Peso de animales e hígado y valores experimentales de respiración para el estado 1 y 2 de todos los grupos.

	CT		APAP		APAP+CUR		CUR	
<b>Peso ratón (g)</b>	38.6 $\pm$ 0.5		37.7 $\pm$ 0.7		38.3 $\pm$ 0.5		38.5 $\pm$ 0.6	
<b>Peso hígado (g)</b>	2.9 $\pm$ 0.2		3.16 $\pm$ 0.1		2.8 $\pm$ 0.2		2.9 $\pm$ 0.2	
	Succ.	Mal/Glu	Succ.	Mal/Glu	Succ.	Mal/Glu	Succ.	Mal/Glu
<b>Edo 1</b>	15.8 $\pm$ 1.9	16.4 $\pm$ 1.5	16.8 $\pm$ 1.9	15.8 $\pm$ 1.5	15.2 $\pm$ 1.3	17.2 $\pm$ 1.9	14.2 $\pm$ 1.5	15.5 $\pm$ 1.4
<b>Edo 2</b>	25.2 $\pm$ 2.3	21.4 $\pm$ 1.9	32.8 $\pm$ 3.0	23.6 $\pm$ 2.4	27.9 $\pm$ 2.1	24.0 $\pm$ 1.9	26.5 $\pm$ 1.5	22.6 $\pm$ 2.2

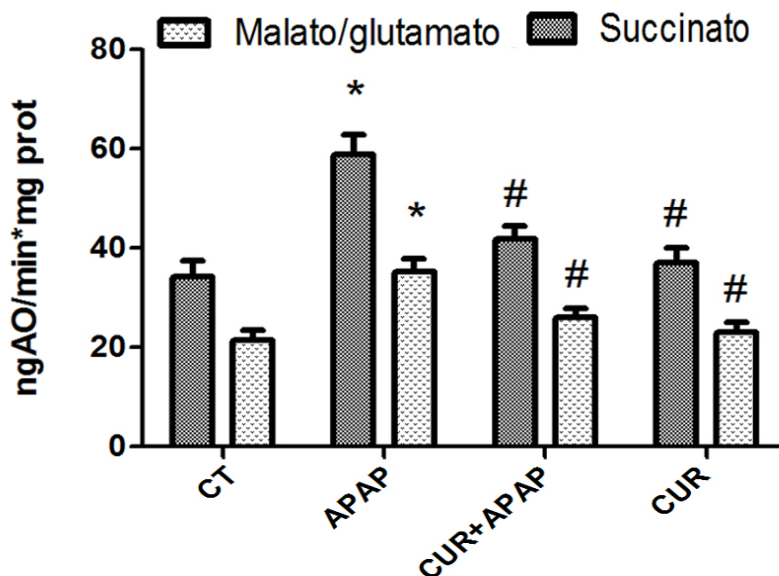
### 6.5 La curcumina previene los efectos del APAP en los estados respiratorios 3 y 4

El tratamiento con APAP indujo una disminución significativa en el estado 3 de la respiración mitocondrial sólo cuando los sustratos fueron dirigidos al complejo I. Se observa que cuando la CTE fue iniciada con succinato no existe diferencia significativa entre ninguno de los grupos analizados, aunque está presente una ligera tendencia a disminuir con la administración de APAP (Figura 11).



**Figura 11.** Efecto de la curcumina en el estado 3, sustentando a la CTE con succinato (complejo II) y con malato glutamato (complejo I). Los resultados se presentan como promedio $\pm$ EEM, n=5. \*p<0.05% vs CT, #p<0.05% vs APAP.

Se produce un aumento en la velocidad de consumo de O<sub>2</sub> en el estado 4 cuando se utilizó succinato y cuando se utilizó malato/glutamato como fuente de e<sup>-</sup>. El tratamiento con curcumina logra prevenir el aumento en este estado de respiración (Figura 12).

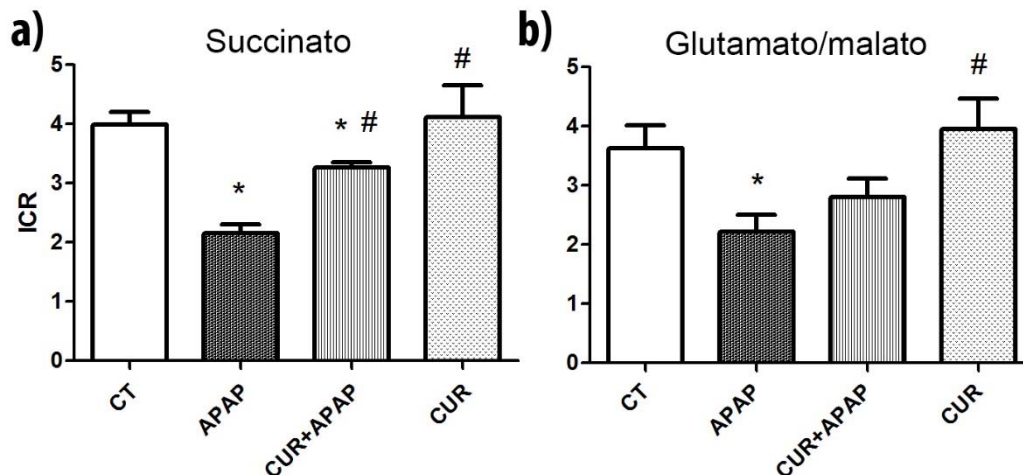


**Figura 12.** Efecto de la curcumina en el estado 4, cuando la CTE se sustentó de e- con succinato (complejo II) y con malato glutamato (complejo I). Los resultados se presentan como promedio±EEM, n=5. \*p<0.05% vs CT, #p<0.05% vs APAP.

### 6.6 Efecto del APAP y la curcumina en el coeficiente respiratorio mitocondrial

El coeficiente respiratorio se calculó dividiendo la respiración en el estado 3 entre la respiración medida en el estado 4. El tratamiento con APAP produce una disminución del coeficiente respiratorio llegando a  $2.21 \pm 0.28$  con malato/glutamato y a  $2.15 \pm 0.29$  con succinato, mientras los valores en el grupo CT fueron  $3.62 \pm 0.77$  y  $3.98 \pm 0.41$ , respectivamente. Para hígado, valores de CR de entre 3 a 5 se reconocen como mitocondrias activas y sanas, valores cercanos o menores a 2 se consideran como mitocondrias desacopladas (Martin, 2011). Se observa que el tratamiento preventivo con curcumina es capaz de atenuar la disminución producida por APAP; sin embargo, la disminución en el ICR mitocondrial es aún marcada en el grupo CUR+APAP, existe diferencia significativa entre el grupo CT y el grupo CUR+APAP cuando se utiliza succinato y cuando se adiciona malato/glutamato como sustratos de oxidación (Figura 13).

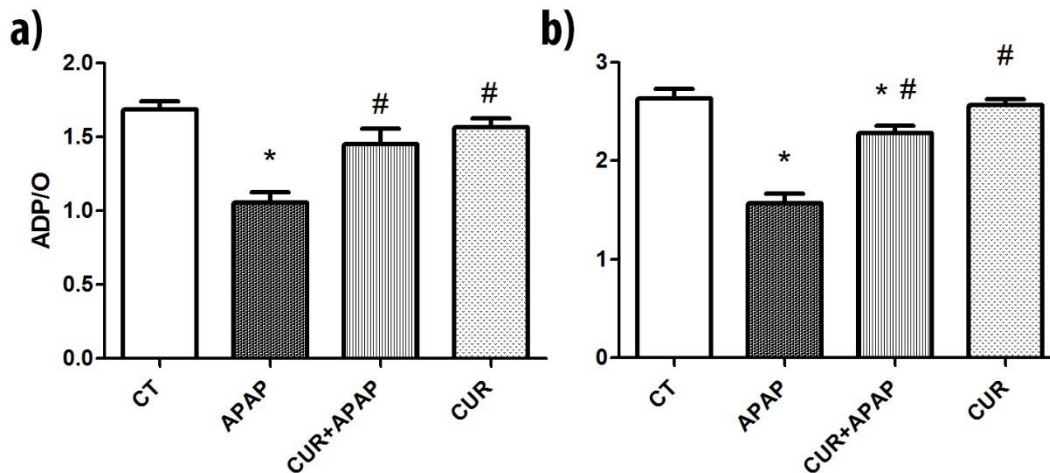




**Figura 13.** Índice de control respiratorio para los grupos estudiados, se calcularon como respiración en el estado 3/respiración en el estado 4. a) Coeficiente respiratorio con succinato, b) Coeficiente respiratorio con malato/glutamato. Los resultados se presentan como promedio±EEM, n=5. \*p<0.05% vs CT, #p<0.05% vs APAP, +p<0.05% vs CUR+APAP.

### 6.7 Determinación del valor ADP/O

El valor ADP/O es la relación entre el oxígeno consumido y el ADP adicionado a la cámara, éste último siendo transformado a ATP. Es otro parámetro para determinar el estado mitocondrial, cuando las mitocondrias consumen más O<sub>2</sub> para convertir el mismo ADP a ATP los valores ADP/O aumentan y se observa una disfunción. Cuando el succinato es utilizado como sustrato en la CTE se esperan valores ADP/O máximos de 2, mientras que para el malato/glutamato el valor máximo es de 3 (Martín, 2011). Claramente la curcumina previene la disminución de esta relación producida por APAP, sin embargo cuando se utiliza malato/glutamato el valor ADP/O no alcanza a regresar a valores del grupo CT (Figura 14).



**Figura 14.** Efecto de la curcumina y el APAP en el valor ADP/O en a) respiración con succinato y b) respiración con malato/glutamato, este valor es calculado dividiendo los mol de O<sub>2</sub> consumido entre los de ADP utilizados en el estado 3. Los resultados se presentan como promedio±EEM, n=5. \*p<0.05% vs CT, #p<0.05% vs APAP.

## 7. Discusión

En este estudio se encontró que el tratamiento con curcumina (100 mg/kg de peso corporal) 90 min antes de una sobredosis con APAP (350 mg/kg de peso corporal) es capaz de prevenir, en parte, el daño hepático producido por APAP, observado por la actividad de las enzimas ALT y AST. La masa del animal y del tejido hepático no varió significativamente en ninguno de los grupos experimentales, aunque se esperaba, no se observó una disminución en la masa hepática debido al daño en los hepatocitos. En la oximetría mitocondrial se observó que el APAP produce una disminución en la respiración del estado 3 sólo cuando las mitocondrias tienen como sustratos al malato/glutamato, estos sustratos producen que la CTE comience en el complejo I, el cual es más propenso a perder actividad cuando la mitocondria se afecta, principalmente por su gran tamaño lo que la hace más frágil a agresiones externas (McGill *et al.*, 2012). Si bien se observa una tendencia a disminuir la respiración en el estado 3 con succinato, ésta no es significativa, por lo que es muy probable que exista un daño importante en complejo I de la CTE ya sea por la presencia de estrés oxidante y nitrante o probablemente por alguna interacción

directa del complejo I con el NAPQI. El tratamiento con curcumina previene el cambio en la respiración del estado 3, regresando los valores de respiración del grupo APAP+CUR a valores similares a los de grupo CT cuando los sustratos son malato/glutamato (Figura 11). En cuanto al Estado 4, éste aumenta significativamente en el grupo APAP tanto con succinato como con malato/glutamato, debido posiblemente a que las membranas están dañadas lo que implicaría: a) que la ATP sintasa, al no estar cerca de una CTE estructuralmente adecuada, sea capaz termodinámicamente de hidrolizar el ATP produciendo ADP lo que se refleja en un estado 3 continuo y por tanto un estado 4 más elevado y b) que el daño estructural produzca una fuga de protones aumentada dando lugar a un consumo de oxígeno mayor para tratar de reponer el potencial perdido por los protones fugados, dando lugar a un consumo de oxígeno mayor aun cuando el ADP se ha consumido y por tanto un estado 4 más alto (Figura 12). El tratamiento con curcumina es capaz de prevenir los efectos ya mencionados producidos por la sobredosis de APAP en el estado 4, si bien se nota que el promedio de los valores de respiración en el grupo CUR+APAP es más alto que en el CT no se observa una diferencia significativa contra el grupo CT ( $p < 0.05$ ). El ICR es un valor que relaciona los dos estados, hasta ahora se ha visto que la curcumina es capaz de prevenir significativamente el cambio en los estados 3 y 4 producido por una sobredosis de APAP, sin embargo en la Figura 13 se observa que no hay una recuperación significativa en los valores de ICR con curcumina para la respiración con malato/glutamato. El ICR es un valor universalmente aceptado para determinar desacoplamiento mitocondrial debido a su alta sensibilidad, se observa que con succinato, sustrato con el cual no había cambios significativos en el estado 3 para ningún grupo, el ICR del grupo APAP disminuye a casi la mitad del valor del grupo CT tan sólo con la variación del estado 4. En la respiración mitocondrial la curcumina es capaz de prevenir en parte la variación del ICR producida por APAP pero sin poder llevarlo a valores basales. En el caso de malato/glutamato, si bien se nota una tendencia del ICR a aumentar en el grupo CUR, no se encontraron diferencias significativas entre el ICR de los grupos APAP y CUR+APAP (contrario a lo visto con succinato); estos datos refuerzan la idea de que el NAPQI daña principalmente

al complejo I. En cuanto al valor ADP/O, se nota que con ambos sustratos disminuye significativamente con una sobredosis de APAP (Figura 14), cuando existe un daño estructural y se aumenta la fuga de protones es de esperarse que el consumo de oxígeno aumente sin la subsecuente producción de ATP, esto disminuye el valor ADP/O; así mismo, puede ser que el estrés oxidante producido por el NAPQI o inclusive el NAPQI mismo estén dañando además al complejo III, el complejo IV y/o al denominado complejo V, lo que produciría también una disminución del valor ADP/O.

Finalmente se observa que los datos del estudio histológico son totalmente compatibles con todos los valores bioquímicos y de respiración mencionados anteriormente. La curcumina tiene una gran capacidad hepatoprotectora en este modelo experimental.

## **8. Conclusiones**

La toma única de curcumina antes de la sobredosis con acetaminofén fue capaz de disminuir el daño hepático y la posterior liberación de transaminasas a la sangre; lo que se asoció, junto con los valores de respiración, a protección a nivel mitocondrial. Los resultados sugieren que el complejo I de la CTE es dañado en la mitocondria por el NAPQ probablemente de una manera irreversible.

## **9. Perspectivas**

Se ha descrito que el complejo I es dañado por la presencia de NAPQI a nivel mitocondrial, también se ha demostrado que es muy probable que la actividad de los demás complejos esté comprometida por sobredosis de acetaminofén, por lo que una caracterización de la actividad enzimática de todos los complejos, un monitoreo de la fuga de protones y un estudio completo de la presencia de ROS en fracción mitocondrial y en homogeneizado de tejido serán muy útiles para ampliar la visión de cómo afecta este fármaco la mitocondria y en dónde es capaz la curcumina de proteger contra el daño producido.



## 10. Referencias

Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H (2007). Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol* 595:1-75.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Braet F, De Zanger R, Baekeland M, Crabbé E, Van Der Smissen P, Wisse E (1995). Structure and dynamics of the fenestrae-associated cytoskeleton of rat liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 21(1):180-189.

Bromer MQ, Black M (2003). Acetaminophen hepatotoxicity. *Clin Liver Dis* 7(2):351-367.

Carmona-Ramírez I, Santamaría A, Tobón-Velasco JC, Orozco-Ibarra M, González-Herrera IG, Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD (2013). Curcumin restores Nrf2 levels and prevents quinolinic acid-induced neurotoxicity. *J Nutr Biochem* 24(1):14-24.

Chen X, Sun CK, Han GZ, Peng JY, Li Y, Liu YX, Lv YY, Liu KX, Zhou Q, Sun HJ (2009). Protective effect of tea polyphenols against paracetamol-induced hepatotoxicity in mice is significantly correlated with cytochrome P450 suppression. *World J Gastroenterol* 15(15):1829-1835.

Cohen-Kerem R, Koren G (2003). Antioxidants and fetal protection against ethanol teratogenicity I. Review of the experimental data and implications to humans. *Neurotoxicol Teratol* 25(1):1-9.

Dudkina NV, Kouril R, Peters K, Braun HP, Boekema EJ (2010). Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochim Biophys Acta* 1797(6-7):664-670.

Espinosa BM, Ruiz AJ, Sánchez RF, Bosch OC (2006). Determination of paracetamol: historical evolution. *J Pharm Biomed Anal* 42(3):291-321.

Gnaiger E (2010). Mitopathways: respiratory states and coupling control ratios. *Mitochondr Physiol Network* 2(1):43-53.

Goel A, Jhurani S, Aggarwal BB (2008). Multi-targeted therapy by curcumin: how spicy is it?. *Mol Nutr Food Res* 52(9):1010-1030.

Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB (2009). Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol* 75(4):787-809.

González-Salazar A, Molina-Jijón E, Correa F, Zarco-Márquez G, Calderón-Oliver M, Tapia E, Zazueta C, Pedraza-Chaverri J (2011). Curcumin protects from cardiac reperfusion damage by attenuation of oxidant stress and mitochondrial dysfunction. *Cardiovasc Toxicol* 11(4):357-64.

González-Calvar S, Coirini H (2004). Control respiratorio: curvas de consumo de oxígeno. Depto de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires 1-12. Facultad de Medicina virtual en <http://www.fmv-uba.org.ar>.

Hansford R, George S, Indies W (2001). En: *Oxidative phosphorylation: Pathway overview; occurrence; the chemiosmotic model*. Editorial John Wiley & Sons. Ency pp 1-8. Chichester.

Hardison WG (1993). En: *Role of canalicular permeability in hepatobiliary transport*. Editorial Raven, pp 571-585. Nueva York.

Hatefi Y (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem* 54:1015-1069.

Heeba GH, Mahmoud ME, El Hanafy AA (2012). Anti-inflammatory potential of curcumin and quercetin in rats: Role of oxidative stress, heme oxygenase-1 and TNF- $\alpha$ . *Toxicol Ind Health*. *Toxicol Ind Health* 29(4):1-10.

Iqbal M, Sharma SD, Okazaki Y, Fujisawa M, Okada S (2003). Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharmacol Toxicol* 92(1):33-8.

Jaeschke H, McGill MR, Williams CD, Ramachandran A (2011). Current issues with acetaminophen hepatotoxicity-a clinically relevant model to test the efficacy of natural products. *Life Sci* 88(17-18):737-745.

Katz I, de Deyn PP, Mintzer J, Greenspan A, Zhu Y, Brodaty H (2007). The efficacy and safety of risperidone in the treatment of psychosis of Alzheimer's disease and mixed dementia: a meta-analysis of 4 placebo-controlled clinical trials. *Int J Geriatr Psychiatry* 22(5):475-484.

Kawada N, Tran-Thi TA, Klein H, Decker K (1993). The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. *Eur J Biochem* 213(2):815-823

Kim HJ, Vaziri ND (2010). Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 298(3):662-671.

Kim MK, Choi GJ, Lee HS. (2003). Fungicidal property of *Curcuma longa* L. rhizome-derived curcumin against phytopathogenic fungi in a greenhouse. *J Agric Food Chem* 51(6):1578-1581.

Konigsberg M. (2008). Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Editorial Manual Moderno pp 331-459.

Krishnamoorthy G, Hinkle PC (1988). Studies on the electron transfer pathway, topography of iron-sulfur centers, and site of coupling in NADH-Q oxidoreductase. *J Biol Chem* 263:17566-17575.

Kuttan R, Bhanumathy P, Nirmala K, George MC. (1985). Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*). *Cancer Lett* 29(2):197–202.

Leysen JE, Gommeren W, Eens A, de Chaffoy de Courcelles D, Stoof JC, Janssen PA (1988). Biochemical profile of risperidone, a new antipsychotic. *J Pharmacol Exp Ther* 247(2):661-670.

Mannens G, Huang ML, Meuldermans W, Hendrickx J, Woestenborghs R, Heykants J (1993). Absorption, metabolism, and excretion of risperidone in humans. *Drug Metab Dispos* 21(6):1134-1141.

Martin D (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* 435:297-312.

McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol* 16(14):R551-R560.

McGill MR, Yan HM, Ramachandran A, Murray GJ, Rollins D, Jaeschke H (2011). HepaRG cells: a human model to study mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology* 53(3):974-982

McGill MR, Sharpe MR, Williams CD, Taha M, Curry SC, Jaeschke H (2012). The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. *J Clin Invest* 122(4):1574-1

Megens AA, Awouters FH, Schotte A, Meert TF, Dugovic C, Niemegeers CJ, Leysen JE (1994). Survey on the pharmacodynamics of the new antipsychotic risperidone. *Psychopharmacology (Berl)* 114(1):9-23.

Menon VP, Sudheer AR (2007). Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol* 595:105-125.

Metzler D. (2003). *Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells*. Editorial Academic Press, 2a, Edición, Massachusetts, USA.

Molina-Jijón E, Tapia E, Zazueta C, El Hafidi M, Zatarain-Barrón ZL, Hernández-Pando R, Medina-Campos ON, Zarco-Márquez G, Torres I, Pedraza-Chaverri J (2011). Curcumin prevents Cr(VI)-induced renal oxidant damage by a mitochondrial pathway. *Free Radic Biol Med* 51(8):1543-57.

Mulder H, Heerdink ER, van Iersel EE, Wilmink FW, Egberts AC (2007). Prevalence of patients using drugs metabolized by cytochrome P450 2D6 in different populations: a cross-sectional study. *Ann Pharmacother* 41(3):408-413.

Myers LL, Beierschmitt WP (1988). Acetaminophen-induced inhibition of hepatic mitochondrial respiration in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 93(3):378-387.

Nelson DL, Cox MM (2004). *Lehninger Principios de Bioquímica*. Editorial OMEGA, 4ta Edición, España.

NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1995, Requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos que se generan en establecimientos que presten atención médica.

Placke ME, Ginsberg GL (1987). Ultrastructural changes during acute acetaminophen- induced hepatotoxicity in the mouse: a time and dose study. *Toxicol Pathol* 15(4):431-438.

Prior TI, Chue PS, Tibbo P, Baker GB (1999). Drug metabolism and atypical antipsychotics. *Eur Neuropsychopharmacol* 9(4):301-309.

Quiñónez B, Reveles A, Acevedo J, Martínez M, Macías M (2008). Consumo de paracetamol en el área de ciencias de la salud de la Universidad Autónoma de Zacatecas. *Infármate* año 3, No. 17.

Reddy RC, Vatsala PG, Keshamouni VG, Padmanaban G, Rangarajan PN (2005). Curcumin for malaria therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 326(2):472-474.

Reyes-Fermín LM, González-Reyes S, Tarco-Álvarez NG, Hernández-Nava M, Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverri J (2012). Neuroprotective effect of  $\alpha$ -mangostin and curcumin against iodoacetate-induced cell death. *Nutr Neurosci* 15(5):34-41.

Rohr HP, Luthy J, Gudat F, Oberholzer M, Gysin C, Stalder G, Bianchi L (1976). En: *Progress in Liver Diseases*. Editorail Grune & Stratton. Volumen V, pp 24-34. Nueva York.

Saito C, Lemasters JJ, Jaeschke H (2010). c-Jun N-terminal kinase modulates oxidant stress and peroxynitrite formation independent of inducible nitric oxide synthase in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 246(1-2):8-17.

Saraste M (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283(5407):1488-1493.

Sasse D (1986). En: *Liver structure and innervation: Regulation of hepatic metabolism*. Editorial Plenum. pp 3-53. Nueva York.

Shehzad A, Lee YS (2013). Molecular mechanisms of curcumin action: Signal transduction. *Biofactors* 39(1):27-36.

Singh S, Hynan LS, Lee WM (2013). Improvements in hepatic serological biomarkers are associated with clinical benefit of intravenous n-acetylcysteine in early stage non-acetaminophen acute liver failure. *Dig Dis Sci* DOI: 10.1007/s10620-012-2512-x (En prensa).

Sreejayan N, Rao MN (1996). Free radical scavenging activity of curcuminoids. *Arzneimittelforschung* 46(2):169-171.

Sreejayan N, Rao MN (1997). Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J Pharm Pharmacol* 49(1):105-107.

Srinivas L, Shalini VK, Shylaja M (1992). Turmerin: a water soluble antioxidant peptide from turmeric (*Curcuma longa*). *Arch Biochem Biophys* 292(2): 617-623.

Syu WJ, Shen CC, Don MJ, Ou JC, Lee GH, Sun CM (1998). Cytotoxicity of curcuminoids and some novel compounds from *Curcuma zedoaria*. *J Nat Prod* 61(12):1531-1534.

Tapia E, Soto V, Ortiz-Vega KM, Zarco-Márquez G, Molina-Jijón E, Cristóbal-García M, Santamaría J, García-Niño WR, Correa F, Zazueta C, Pedraza-Chaverri J (2012). Curcumin induces Nrf2 nuclear translocation and prevents glomerular hypertension, hyperfiltration, oxidant stress, and the decrease in antioxidant enzymes in 5/6 nephrectomized rats. *Oxid Med Cell Longev* ID 269039 1-14.

Toussaint K, Yang XC, Zielinski MA, Reigle KL, Sacavage SD, Nagar S, Raffa RB (2010). What do we (not) know about how paracetamol (acetaminophen) works?. *J Clin Pharm Ther* 35(6):617-638.

Villalobos JJ (1993). En: *Gastroenterología*. Editorial Méndez Editores. Cuarta Edición, Volumen II, pp 155, México.

Wallace DC, Fan W, Procaccio V (2010). Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu Rev Pathol* 5:297-348.

Wang AY, Lian LH, Jiang YZ, Wu YL, Nan JX (2010). *Gentiana manshurica* Kitagawa prevents acetaminophen-induced acute hepatic injury in mice via inhibiting JNK/ERK MAPK pathway. *World J Gastroenterol* 16:384-391.

Wehling M (2013). Paracetamol: Efficacious and safe for all ages. *Schmerz* 27(1):20-25.