



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**“Evaluación del efecto de la *Tilia americana* en la expresión de diferentes enzimas antioxidantes, en hígado de rata, con daño hepático inducido por tetracloruro de carbono”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**EITHAN NUÑEZ RAMIREZ**

**ASESOR: DRA. LILIANA CARMONA APARICIO  
COASESORES: DRA. NOEMÍ CÁRDENAS RODRÍGUEZ  
DR. ESAÚ FLORIANO SÁNCHEZ**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación del efecto de la Tilla americana en la expresión de diferentes enzimas antioxidantes, en hígado de rata, con daño hepático inducido por tetracloruro de carbono

Que presenta el pasante: Eithan Nuñez Ramirez

Con número de cuenta: 305079235 para obtener el Título de la Carrera: Química Farmacéutico Biológica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán (Zcali), Méx. a 28 de Enero de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q. Mario Arturo Morales Delgado	
VOCAL	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	Dra. Liliانا Carmona Aparicio	
1er. SUPLENTE	QFB. Gabriela Escalante Reynoso	
2do. SUPLENTE	MFC. Cecilia Hernández Barba	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HMI/lac

## DEDICATORIAS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme formar parte de ella desde mi formación como estudiante en la Escuela Nacional Preparatoria 4 “Vidal Castañeda y Nájera” hasta mi formación profesional en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1. Es un orgullo formar parte de esta gran institución.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán donde sufrí, reí, disfrute, aprendí y soñé. Por ser mi casa y por darme el privilegio de ser llamado Químico Farmacéutico Biólogo. ¡Gracias por todo!

A todos los profesores que a lo largo de mi carrera se constituyeron en motivo de impulso y en ejemplo de profesionalismo, a ustedes gracias por sus conocimientos, por su tiempo y sobre todo por su amistad, a todos y cada uno de ellos les dedico cada una de estas páginas de mi tesis.

Este trabajo lo dedico a una persona muy especial en mi vida, y aunque ya no se encuentre físicamente conmigo, yo sé que en todo momento al desarrollar este trabajo estuvo conmigo, en las investigaciones, en mis desvelos, en mis momentos más difíciles, por eso a ti, María Gutiérrez Flores, abuela querida, te dedico mi esfuerzo donde te encuentres. Te amo, hasta luego, porque algún día nos volveremos a encontrar.

Para mis padres por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles, y por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos.

## RECONOCIMIENTOS

A Dios por protegerme durante todo mi camino y darme fuerza para superar obstáculos y dificultades a lo largo de toda mi vida.

Con mucho cariño principalmente a mis padres que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento. Gracias papá y mamá, por creer en mí, por todos los sacrificios que hicieron a lo largo de mi carrera, sé que fueron momentos difíciles pero gracias a sus deseos de heredarme una buena educación salí adelante. Gracias por toda su comprensión y paciencia, siempre han estado ahí en todo momento apoyando y brindándome todo su amor de manera incondicional, por todo esto les agradezco de todo corazón, esto es un pequeño regalo de todo lo que han hecho por mí, este título es para ustedes, me siento orgulloso que por fin les entrego este título por cual luché y me esforcé teniendo como motivación y motor el gran amor que me han inculcado, se llega la meta que me había planteado y espero seguir cosechando logros los cuales siempre estarán dedicados a ustedes. Los admiro mucho, siempre los llevo en mi corazón y en mi mente, que dios me los bendiga y me los cuide muchos años.

A mi abuela materna María Gutiérrez Flores (Q.E.P.D.), que a pesar de nuestra distancia física, siento que estás conmigo siempre, cuidándome y guiándome desde el cielo, y aunque nos faltaron muchas cosas por vivir juntos, sé que este momento hubiera sido tan especial para ti como lo es para mí.

A mi hermano Jonathan, por estar siempre presente, acompañándome para poderme realizar.

A mi jurado de tesis, el Q. Mario Arturo Morales Delgado, la QFB. Rosalba Bonilla Sánchez, la Dra. Liliana Carmona Aparicio, la QFB. Gabriela Escalante Reynoso y la MFC Cecilia Hernández Barba, por su disposición y ayuda al leer mi trabajo de tesis, por sus observaciones, sugerencias y correcciones a él.

A mi directora de tesis, Dra. Liliana Carmona Aparicio por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en mí que pueda terminar mis estudios con éxito.

A mis coasesores: Dra. Noemí Cárdenas Rodríguez y Dr. Esaú Floriano Sánchez, gracias por su paciencia, dedicación, motivación, criterio y aliento. Han hecho fácil lo difícil. Ha sido un privilegio poder contar con su guía y ayuda.

A mis amigos y compañeros de laboratorio de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad: Carolina González, Berenice Prestegui, Eduardo Beltrán, Alejandro Márquez, David Comoto, Marcela Naranjo, Jesica Rocha, por la alegría, las experiencias, los buenos momentos y sus consejos.

De manera especial, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) por adquirir de manera directa e indirecta diversos conocimientos de esa bonita carrera. ¡Muchas Gracias hermana Facultad!

A la Escuela Nacional Preparatoria Número 4 “Vidal Castañeda y Nájera” porque en ella inicié este camino profesional en la UNAM, con muchos amigos y maestros que conocí en este lugar: Fabián Hernández, Luis Ángel Perdomo, Oscar Hernández, Yessica Luna, Ricardo Hernández, Stephany y Conni Valdés, Pablo González, Monserrat León. Maestros: José Manuel Díaz Gastine (QEPD), Raúl Osorio, Eduardo Delgadillo, mil gracias por formar parte de mi vida.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por formar parte de él durante mi servicio social de mi carrera técnica en la Prepa 4, bajo la supervisión del Dr. Francisco Morales. Así como a mi compañera y amiga Noemí Monserrat León Pineda, por acompañarme desde el 2007 hasta la fecha y compartir muchos momentos conmigo, ¡¡¡Gracias por todo Monse!!!

Al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) por formar parte del laboratorio de enteroparásitos durante mi servicio social en mi carrera, bajo el apoyo de la M.C. Raquel Tapia. De igual manera, a mi compañera y amiga Ofelia Sánchez, muchas gracias por tus palabras y apoyo durante este tiempo Ofe.

A todos aquéllos maestros por sus grandes conocimientos y amistad: Elia Granados, Judith García, Esther Revuelta, Ricardo Santiago, René Damían, Daniel Raygoza, Leticia Cubillo, Ladislao Palomar, Pablo Labat, Eliseo Hernández, Víctor Zendejas. Y mis mejores amigos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán: Yareli Cruz y Jorge Aguilera, que sin ellos, no sería lo mismo mi estancia en la Facultad.

A mis compañeros y amigos laborales: QFB Verónica Torales Serna e Irán González Carrillo, por la gran amistad que hay entre nosotros, el apoyo, los múltiples consejos y la valiosa compañía de ustedes, ¡gracias por todo, se les estima mucho!

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

## Pensamientos

Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano. *Isaac Newton*

Cada día sabemos más y entendemos menos. *Albert Einstein*

Uno está enamorado cuando se da cuenta de que otra persona es única. *Jorge Luis Borges*

El éxito consiste en obtener lo que se desea. La felicidad, en disfrutar lo que se obtiene. *Emerson*

La posibilidad de realizar un sueño es lo que hace que la vida sea interesante. *Paulo Coelho*

Lo pasado ha huido, lo que esperas está ausente, pero el presente es tuyo. *Proverbio árabe*

La música es para el alma lo que la gimnasia para el cuerpo. *Platón*

El experimentador que no sabe lo que está buscando no comprenderá lo que encuentra. *Claude Bernard*

No hay secretos para el éxito. Éste se alcanza preparándose, trabajando arduamente y aprendiendo del fracaso. *Colin Powell*

La música expresa aquello que no puede decirse con palabras pero no puede permanecer en silencio. *Victor Hugo*

Puedes engañar a todo el mundo algún tiempo. Puedes engañar a algunos todo el tiempo. Pero no puedes engañar a todo el mundo todo el tiempo. *Abraham Lincoln*

Inteligencia es la habilidad de adaptarse a los cambios. *Stephen Hawking*

Soy un hombre de hechos, no de palabras. *Eithan Nuñez Ramirez*

“El tamaño de tu éxito, será el tamaño de tu esfuerzo”

## ÍNDICE

RESUMEN.....	15
1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. Generalidades del hígado.....	17
1.1.1. Fisiología del hígado.....	18
1.1.2. Enfermedades hepáticas.....	19
1.1.3. Mecanismos asociados a daño hepático.....	20
1.2. Generalidades de estrés oxidante.....	20
1.2.1. Vías de producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)..	23
1.2.1.1. Radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ).....	23
1.2.1.2. Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).....	23
1.2.1.3. Radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ).....	23
1.2.2. Reacciones enzimáticas: SOD, CAT y GPX.....	24
1.2.2.1. Superóxido Dismutasa (SOD).....	24
1.2.2.2. Catalasa (CAT).....	24
1.2.2.3. Glutación Peroxidasa (GPx).....	25
1.2.2.3.1. Isoformas de Glutación Peroxidasa (GPx).....	26
1.2.2.4. Glutación Reductasa (GR).....	26
1.2.3. Expresión génica y su relación con el estrés oxidante .....	27
1.3. Tratamiento para enfermedades hepáticas.....	31
1.4. Uso de plantas medicinales para tratar enfermedades hepáticas.....	32
1.5. Generalidades de la <i>Tilia americana var. mexicana</i> ( <i>T. americana</i> ).....	34
1.5.1. Usos de Tilia.....	35
1.5.2. Clasificación de la <i>T. americana</i> .....	35
1.5.3. Características de la planta.....	36

1.6. Ubicación geográfica.....	37
1.7. Otros usos de la <i>Tilia</i> en México y su situación ecológica.....	38
1.8. Metabolitos de la <i>T. americana</i> .....	38
1.9. Efectos biológicos de la <i>T. americana</i> en el animal íntegro y sus mecanismos a nivel central.....	39
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	41
3. JUSTIFICACIÓN.....	41
4. HIPÓTESIS.....	43
5. OBJETIVOS.....	44
5.1. Objetivo general.....	44
5.2. Objetivos particulares.....	44
6. METODOLOGÍA (MATERIALES Y MÉTODOS).....	45
6.1. Procedimientos experimentales.....	45
6.1.1. Sitio de colecta de la planta.....	45
6.1.2. Preparación y obtención de los extractos de la planta.....	46
6.1.3. Animales de experimentación.....	46
6.1.4. Determinación de la expresión génica de GPx y GR.....	47
6.1.4.1. Aislamiento de ARN total.....	48
6.1.4.2. Diseño de oligonucleótidos (primers).....	49
6.1.4.3. Cuantificación de ARN por RT-PCR.....	49
6.1.4.4. Limpieza de muestra mediante ExoSAP.....	50
6.1.4.5. Purificación de fragmentos de ADN por QIAEX.....	50
6.1.5. Análisis Estadístico.....	51
7. RESULTADOS.....	52
8. DISCUSIÓN.....	56

9. CONCLUSIONES.....	64
10. REFERENCIAS.....	65
11. ANEXO.....	83
Materiales.....	83
Reactivos.....	83
Equipos.....	84

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Actividad de la enzima GPx en hígado de rata.....	54
Gráfico 2. Actividad de la enzima GR en hígado de rata. ....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cara posterior inferior del hígado.....	17
Figura 2. Esquema general de producción de ERO .....	20
Figura 3. Reacción enzimática de GSH.....	25
Figura 4. Mecanismo de regulación de respuesta de la fase 2.....	28
Figura 5. Árbol conocido popularmente como Tila.....	37
Figura 6. Distribución natural a nivel nacional de <i>T. americana</i> .....	37
Figura 7. Gel de agarosa con los diferentes tratamientos de <i>T. americana</i> .....	52

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Acción de los radicales libres en las biomoléculas.....	22
Cuadro 2. Algunas características de las diferentes isoformas de GPx.....	26
Cuadro 3. Algunas enfermedades hepáticas y su respectiva terapéutica.....	31
Cuadro 4. Clasificación de la <i>T. americana</i> .....	36
Cuadro 5. Metodología experimental general.....	45
Cuadro 6. Incubación de fragmentos de ADN.....	51
Cuadro 7. Materiales utilizados en la fase experimental.....	83

Cuadro 8. Reactivos utilizados en la fase experimental.....83

Cuadro 9. Equipos utilizados en la fase experimental.....84

## LISTA DE ABREVIATURAS

•OH	Radical Hidroxilo
Ac	Acuoso
AcE	Acetato de Etilo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AGEs	“Advanced Glycation End-Products” / Productos de la Glicación Avanzada
ALT	Alanino Aminotransferasa
AO	Aceite de Oliva
ARE	“Antioxidant Response Element” / Elementos de Respuesta Antioxidante
ARN	Ácido Ribonucleico
AST	Aspartato Aminotransferasa
CAT	Catalasa
CCl <sub>3</sub>	Triclorometilo
CCl <sub>3</sub> O <sup>-</sup>	Triclorometilperoxil
CCl <sub>4</sub>	Tetracloruro de carbono
cDNA	ADN Complementario
EDTA	Ácido Etildiaminotetraacético
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
ERON	Especies Reactivas de Óxidos de Nitrógeno
G6PDH	Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa
GPx	Glutación Peroxidasa
GR	Glutación Reductasa
GSH	Glutación Reducido

GSSG	Glutati3n oxidado
GST	Glutati3n S Transferasa
H	Hexano
<i>H. inuloides</i>	<i>Heterotheca inuloides</i>
<i>H. sabdariffa</i>	<i>Hibiscus sabdariffa</i>
H <sub>2</sub> O	Agua
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Per3xido de Hidr3geno
HDL	Lipoprote3nas de Alta Densidad
HClO	3cido Hipocloroso
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography” / Cromatograf3a L3quida de Alta Resoluci3n
Kb	Kilobase
Keap 1	Prote3na 1
LDL	“Low Density Lipoprotein” / Lipoprote3nas de Baja Densidad
L-OOH	Lipoper3xido
M	Metanol
MAPK	“Mitogen Activated Protein Kinases” / Prote3na Cinasa Activada por Mit3geno
mRNA	3cido Ribonucl3ico mensajero
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucle3tido Fosfato Reducido
NF-kB	“Nuclear Factor kB” / Factor Nuclear kappa B
Nrf2	“Nuclear related factor 2” / Factor nuclear relacionado 2
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Ani3n Super3xido
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
pb	Pares de bases
PCR	“Polymerase Chain Reaction” / Reacci3n en Cadena de la Polimerasa

PTZ	Pentilenetetrazol
qRT-PCR	“quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction” / Transcriptasa Reversa Cuantitativa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa
RT-PCR	"Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction" / Transcripción Reversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	Superóxido Dismutasa
<i>T. americana</i>	<i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i>
TBE	Tris Boratos EDTA
TGO	Transaminasa Glutámico Oxalacética
TGP	Transaminasa Glutámico Pirúvica
TrxR	Tiorredoxina Reductasa

## RESUMEN

El hígado es un órgano prioritario en nuestro organismo, ya que realiza un gran número de reacciones metabólicas necesarias para nuestro existir. Este es susceptible a padecer diversas patologías, de origen viral, bacteriano o parasitario, entre otras. Cuando el hígado es dañado por algún agente etiológico, se desencadenan diferentes mecanismos biológicos para eliminar al causante del daño y poder reparar lo ocasionado en el órgano. Uno de los mecanismos que inducen daño diariamente en el hígado, es el estrés oxidante, el cual ataca a todas las biomoléculas del organismo. Para proteger y/o revertir el daño por estrés oxidante presente en hígado, existen diversas estrategias mediante el uso de fármacos, así como de sustancias de origen natural con efectos antioxidantes. Algunos ejemplos de estas plantas son: uña de gato, sangre de grado y romerillo blanco. En particular, existen otras plantas con efectos terapéuticos atribuidos a sus efectos como antioxidantes, una de ellas es la *Tilia americana* var. *mexicana* (planta endémica de México, *T. americana*), a la cual se le atribuyen efectos en el SNC como: ansiolítico, sedante, hipnótico y antidepresivo. Sin embargo, aún se desconoce si esta planta es capaz de ejercer un efecto terapéutico en el daño al hígado inducido por estrés oxidante, y si este efecto es a nivel molecular, por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo fue determinar el efecto biológico de la *T. americana* mediante la expresión génica de enzimas antioxidantes (GPx y GSR), en hígado de rata con daño hepático inducido por CCl<sub>4</sub>. Para ello, se utilizaron diferentes grupos experimentales donde se les administró CCl<sub>4</sub> (i.p.), aceite de oliva (v.o.), y los extractos hexánico, metanólico, acetato de etilo y acuoso de las inflorescencias de *T. americana* (v.o.). Al término de estos tratamientos los animales fueron sacrificados y el hígado fue extraído para posteriormente ser almacenado a -80°C, hasta ser sometido a los procedimientos de extracción de ARN, y para determinar la expresión génica se realizó la técnica de RT-PCR (PCR-tiempo real). Los datos obtenidos se expresaron en número de copias dependiendo del tratamiento asignado. Resultados: La actividad de GPx, en el grupo de extracto hexánico presentó una disminución significativa de la expresión de la enzima con respecto al resto de los grupos. Esta disminución es menor, en los grupos donde se administraron los extractos

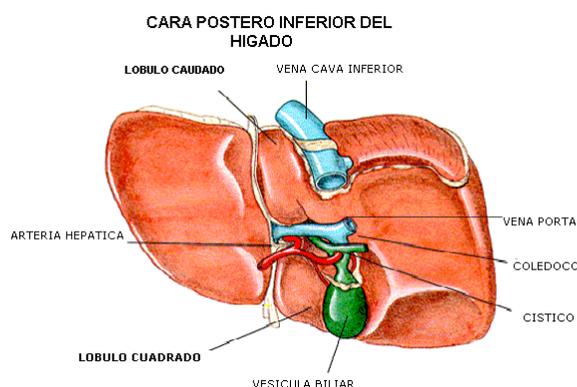
metanólico y acuoso. Para la enzima GR se observó que el CCl<sub>4</sub> y el extracto metanólico indujeron una disminución en la expresión del gen, a diferencia del extracto de acetato de etilo y del extracto acuoso que la incrementaron. Lo cual sugiere, que los diferentes flavonoides presentes en la *T. americana*, como puede ser el caso de la quercetina, están presente en cada uno de los diferentes extractos, y sus fracciones, son los responsables del efecto antioxidante observados en el modelo de CCl<sub>4</sub>. Por lo tanto, podemos decir, que el tratamiento con el extracto de acetato de etilo de *T. americana* atenuó el daño hepático inducido por el CCl<sub>4</sub> en ambas enzimas (GPx y GR). Y de acuerdo, con lo anterior, sugerimos que los flavonoides y compuestos fenólicos que contiene esta planta, pueden inducir significativamente a las enzimas antioxidantes hepáticas e incrementar el estado antioxidante en el hígado, por lo tanto, *T. americana* podría ser utilizada como un potencial fito-fármaco.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Generalidades del hígado

El hígado juega un papel importante en una amplia gama de procesos bioquímicos que permiten el buen funcionamiento del organismo humano. Alrededor del 90% de los macronutrientes del organismo procedentes de los intestinos pasan por el hígado, donde son metabolizados, lo que permite el aprovechamiento de la energía contenida en ellos; además almacena micronutrientes como por ejemplo las vitaminas A, D, B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub>; asimismo, almacena hierro y participa en la conversión del hierro en hemo, un componente de la hemoglobina (Martínez, *et al.*, 2001; Lieber, 2003; Cuningham y Van Horn, 2003).

El 60% de las células que constituyen el hígado humano son hepatocitos, células epiteliales poliédricas, de 20 a 30 micrómetros, con núcleos redondos centrales, o excéntricos (UNAM, 2014).



**Figura 1.** Cara posterior inferior del hígado. (Ilustración tomada de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/anatomia/computo/higado/anaformoligado.html>, 2014).

#### 1.1.1. Fisiología del hígado

El hígado es un órgano versátil que juega un papel importante en una variedad de funciones críticas, este incluye la desintoxicación de la sangre sistémica y portal para la producción y secreción de sangre y componentes de la bilis (Rodés, *et al.*, 2007). El hígado interviene en el metabolismo de proteínas, esteroides, grasas, vitaminas y el hierro, así como en el almacenamiento del azúcar.

La unidad estructural clásica del hígado es el lóbulo hepático (Bioulac-Sage, *et al.*, 2007). Cuando se ve en sección transversal, el lóbulo tiene la forma de un polígono, por lo general un hexágono. En las esquinas del lóbulo poligonal son las tríadas portales que consisten en la arteria hepática, vía biliar, y la vena porta. La estructura central del lóbulo, que atraviesa su eje largo, es la vena central (Bioulac-Sage, *et al.*, 2007).

De especial relevancia tanto en la fisiología y la fisiopatología del hígado es la presencia de radical anión superóxido formado por la NADPH oxidasa (mecanismo asociado de daño hepático). La generación de esta especie reactiva, como donante de electrones y oxígeno molecular, se considera una primera línea de defensa contra patógenos ingeridos (Ray y Shah, 2005). Sin embargo, la NADPH oxidasa se ha involucrado en muchos procesos patológicos como los trastornos cardiovasculares y enfermedades del hígado (Cave, *et al.*, 2006; De Minicis, *et al.*, 2006).

La evidencia acumulada proporcionada en los últimos años demostró claramente el papel de las especies reactivas de oxígeno (ERO), y oxidantes como factores importantes en diversos procesos patológicos, incluyendo a las enfermedades del hígado. El fundamento de este papel en la fisiopatología deriva de la reactividad de estas especies con diferentes componentes celulares, tales como lípidos o ADN, y, más especialmente, con las proteínas, debido a la presencia de residuos de cisteína. En la mayoría de los casos, en experimentos *in vitro*, las ERO y la generación del estado oxidante pueden perturbar las funciones de estos constituyentes celulares vitales, lo que resulta en la disfunción celular o la muerte. Como consecuencia de ello, el tratamiento con antioxidantes se ha demostrado ser beneficioso en condiciones controladas (Poljsak, *et al.*, 2013).

### **1.1.2. Enfermedades hepáticas**

Las enfermedades en hígado son de una amplia variedad etiológica, desde agentes infecciosos como virus (hepatitis A, B, y C), bacterias, y/o parásitos, ingesta de medicamentos (en dosis tóxicas), venenos o toxinas, ingesta de alcohol de forma crónica (en dosis tóxicas). Si el hígado forma tejido cicatricial por una enfermedad, se

denomina cirrosis. La ictericia, o coloración amarilla de la piel, puede ser un signo de enfermedad hepática (MedlinePlus, 2014).

### **1.1.3. Mecanismos asociados a daño hepático**

Los múltiples agentes etiológicos que provocan infecciones hepáticas, desencadenan procesos de inflamación en este órgano, y por consecuencia, la presencia de enzimas asociadas a daño hepático, el cual dependiendo del grado, puede llegar a un estado conocido como estrés oxidante (Horiguchi, *et al.*, 2010).

La lesión hepática se asocia con la inflamación, que se cree puede acelerar la progresión de las enfermedades del hígado; sin embargo, los datos clínicos muestran que la inflamación no siempre se correlaciona con daño hepatocelular en algunos pacientes. La investigación de los mecanismos celulares que subyacen a estos eventos utilizando un modelo animal experimental, nos muestran que la inflamación puede atenuar la necrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) (Horiguchi, *et al.*, 2010).

Los hepatocitos reaccionan a la agresión tóxica mediante la activación de mecanismos de defensa que incluyen, la hipertrofia del retículo endoplásmico, la inducción de sistemas protectores (glutación, GSH), y la síntesis de proteínas de choque térmico y proteínas de fase aguda (Carini, *et al.*, 1999).

Los mecanismos generales de hepatotoxicidad son la formación de aductos reactivos, el abatimiento antioxidante, y la alquilación de proteínas (Jaeschke y Bajt, 2006).

En cuanto a las enzimas asociadas en daño hepático, las aminotransferasas (o transaminasas) son indicadores sensibles al daño hepático (De Broe, *et al.*, 1975; Ellis, *et al.*, 1978). Las determinaciones de las actividades enzimáticas más frecuentes son la Alanino Aminotransferasa (ALT), y la Aspartato Aminotransferasa (AST). La AST se encuentra en hígado, corazón, músculo esquelético, y en menor concentración en riñones, cerebro, páncreas, pulmones, leucocitos y eritrocitos; en tanto la ALT está presente en grandes concentraciones en hígado (Boyde y Latner,

1961; Rej, 1978). El aumento de los valores séricos de ambas enzimas se relaciona con los cambios en la permeabilidad de la membrana que permiten su salida (Tian, *et al.*, 1998).

## 1.2. Generalidades de estrés oxidante

El estrés oxidante se define como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores pro-oxidantes, y los mecanismos antioxidantes, encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de ERO (Figura 2). Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; por lo tanto, se reconoce como mecanismo general de daño celular, asociado con la fisiopatología primaria o la evolución de un número creciente de entidades y síndromes de interés médico-social (Ames, *et al.*, 1993).

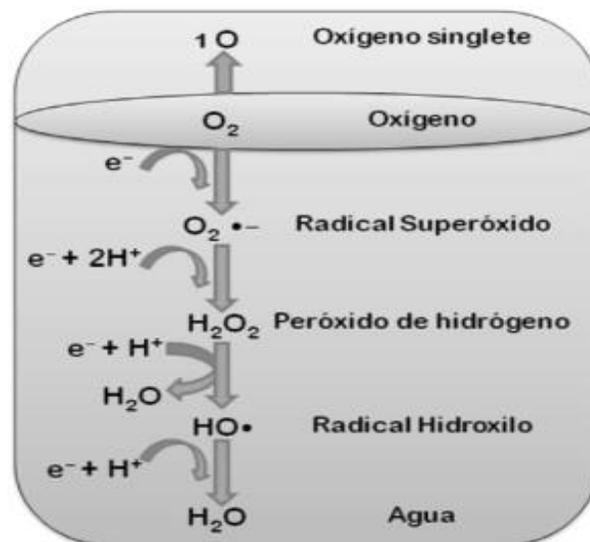


Figura 2. Esquema general de producción de ERO (Ilustración tomada de García, 2013).

El estrés oxidante está mediado por dos sistemas generadores de radicales libres: las ERO y las Especies Reactivas de Óxidos de Nitrógeno (ERON). El concepto de estrés oxidante incluye tanto a los radicales libres como a sus precursores, los cuales pueden provocar daño a las biomoléculas, como los lípidos, ácidos nucleicos, carbohidratos y proteínas (Olivares-Corichi, *et al.*, 2006).

La oxidación de proteínas es definida como la modificación covalente de las mismas. Todos los aminoácidos pueden servir como blanco de ataque por las especies reactivas, aunque algunos aminoácidos como la metionina, triptófano, fenilalanina, tirosina, cisteína, leucina, valina, lisina, arginina, prolina y la histidina son más susceptibles (Olivares-Corichi, *et al.*, 2006).

La modificación de las cadenas laterales de éstos, puede generar alteraciones directamente en la estructura y la función de las proteínas, a la fragmentación química o al incremento en la susceptibilidad a proteólisis (Olivares-Corichi, *et al.*, 2006).

Cuando un radical libre reacciona con una molécula no radical, puede ceder o capturar electrones, o simplemente puede unirse a ella. En cualquiera de estos casos, la molécula radical se convierte en un radical libre y se desata una reacción en cadena, es decir, un radical libre genera a otro radical libre. Solo cuando se encuentran dos radicales libres, la reacción en cadena se detiene (Chihuailaf, *et al.*, 2002; Membrillo, *et al.*, 2003).

Los radicales libres provocan una reducción de la fluidez de la membrana, la cual es esencial para preservar la función celular (traducción de señales, secreción y endocitosis) (Pérez-Ortega, *et al.*, 2008).

Además, los radicales libres, inducen modificaciones covalentes de las proteínas por hidroxinonenal, producido por la oxidación de lípidos o por la introducción de grupos carbonilo (aldehídos y cetonas) dentro de las proteínas (Requena, *et al.*, 2001; Hicks, *et al.*, 2005).

**Cuadro 1.** Acción de los radicales libres en las biomoléculas.

<b>Acción de los radicales libres</b>	<b>Descripción</b>
Daño a lípidos	El radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) puede atacar directamente a los lípidos de membrana e iniciar su peroxidación, proceso que tiene como consecuencia la disminución en la fluidez de la membrana y con ello, la alteración de sus propiedades e interacción con otras proteínas (Gutteridge y Halliwell, 1990).
Daño a proteínas	En las proteínas pueden oxidarse de manera preferente los aminoácidos como: cisteína, fenilalanina, tirosina, histidina y metionina, induciendo como consecuencia el entrecruzamiento de cadenas peptídicas, la fragmentación de la proteína y la formación de grupos carbonilos (Berlett y Stadtman, 1997).
Daño al DNA	El radical $\cdot\text{OH}$ tiene la capacidad de no sólo de capturar átomos de hidrógeno de las moléculas de ADN, sino también de pegarse a las bases formando aductos, lo cual produce una gran diversidad de daños como: daño a las bases, azúcares, entrecruzamientos de proteínas con el ADN, así como rupturas de doble cadena y sencilla (Cadet, <i>et al.</i> , 1999).

Los antioxidantes pueden disminuir el daño oxidante directamente a través de la reacción con radicales libres o indirectamente mediante la inhibición de la actividad o expresión de enzimas generadoras de radicales libres o la mejora de la actividad o expresión de enzimas antioxidantes intracelulares (Lü, *et al.*, 2010).

Las células son capaces de defenderse contra el daño de ERO, a través de la utilización de enzimas intracelulares para mantener la homeostasis de ERO en un nivel bajo. Sin embargo, durante los momentos de estrés ambiental y disfunción de las células, los niveles de ERO pueden aumentar drásticamente, y causar daño celular importante en el cuerpo (Lü, *et al.*, 2010).

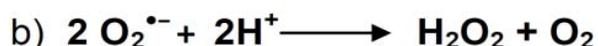
### 1.2.1. Vías de producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

**1.2.1.1. Radical anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ).**-Un predominante radical libre celular, está implicado en un gran número de cambios deletéreos asociados a menudo con un aumento en los procesos peroxidativos y vinculados a una concentración de antioxidante bajo. En los fagocitos, el  $O_2^{\bullet-}$  se produce en grandes cantidades por la NADPH oxidasa, enzima para la eliminación de patógenos. El  $O_2^{\bullet-}$  es también un subproducto de la respiración mitocondrial, así como varias otras enzimas tales como la NADH oxidasa, xantina oxidasa, monooxigenasas y las ciclooxigenasas (Steinbeck, *et al.*, 1991).

Puede formarse por dos vías, una enzimática y otra no enzimática. En la vía enzimática, las enzimas que participan son la xantina oxidasa, la citocromo P-450 y la NADPH-oxidasa (Venereo, 2002).

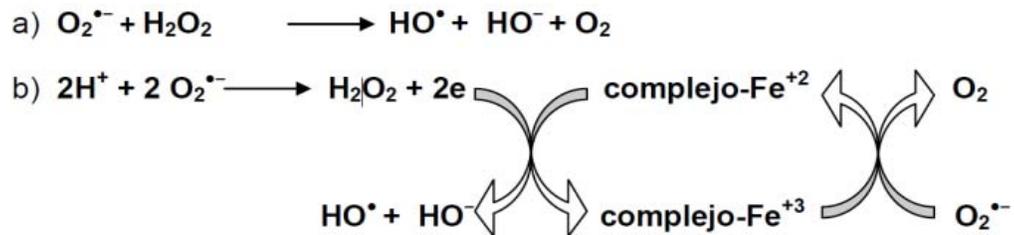


**1.2.1.2. Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).**- Puede generarse por reducción enzimática del oxígeno (a) o por dismutación del superóxido ya sea espontáneamente o catalizada por la Superóxido Dismutasa (SOD) (b) (Venereo, 2002).



**1.2.1.3. Radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ).**- Es la especie más oxidante que puede afectar ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, principalmente uniéndose a los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados. Puede formarse mediante dos reacciones, una es

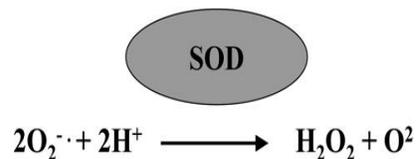
la de Haber-Weiss (a) y la otra la de Fenton, (b) de mayor relevancia biológica (Venereo, 2002).



## 1.2.2. Reacciones enzimáticas: SOD, CAT y GPx

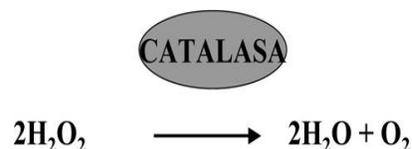
### 1.2.2.1. Superóxido Dismutasa (SOD)

Es una enzima antioxidante natural de nuestro organismo, una proteína que se encuentra en los glóbulos rojos de la sangre. Existen tres variantes de SOD: SOD1 se encuentra en el citoplasma celular, SOD2 en las mitocondrias y SOD3 en el líquido extracelular. Para que esta enzima proteica pueda funcionar adecuadamente, necesita la participación de los minerales cobre, magnesio, zinc y selenio (Botanical, 2014). Esta enzima tiene como cometido la descomposición del superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).



### 1.2.2.2. Catalasa (CAT)

Es una enzima que la podemos encontrar en muchos organismos vivos, y cataliza la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (González, 2010).



El peróxido de hidrógeno es uno de los productos del metabolismo celular en diversos organismos, pero dada su potencial toxicidad, es transformado enseguida por la enzima catalasa (González, 2010).

### 1.2.2.3. Glutación Peroxidasa (GPx)

Es una de las enzimas que participan en las transformaciones de ERO, esta cataliza la reducción del peróxido o lipoperóxido, para lo cual utiliza como agente reductor al glutatión reducido. Esta enzima desempeña un importante papel en la defensa antioxidante por su localización en todos los órganos y tejidos, como parte del sistema antioxidante del glutatión, por lo que está involucrada en la fisiopatología de varias enfermedades (Cisneros, *et al.*, 1997).



**Figura 3.** Reacción enzimática de GSH: Se describe la reacción de 2 moléculas de glutatión reducido (GSH) más 1 molécula de peróxido de hidrógeno, reaccionan entre sí, para formar 1 molécula de glutatión oxidado (GSSG) y 2 moléculas de agua.

La GPx es una proteína tetramérica que posee 4 átomos de selenio y necesita como sustrato esencial al glutatión (GSH), el cual es capaz de conjugarse con compuestos potencialmente tóxicos, solubilizar y facilitar su excreción biliar. Por esta razón, es importante mantener niveles altos de GSH, lo cual puede facilitarse mediante la ingesta de aminoácidos sulfurados (metionina, cisteína)(Zorrilla, 2002). Se han identificado cinco enzimas glutatión peroxidadas (GPx) con selenio: la GPx clásica o celular, la GPx plasmática o extracelular, la GPx fosfolípido hidroperóxido, la Gpx gastrointestinal, y la Gpx olfatoria (Gladyshev, 2006).

La GPx se localiza en la mitocondria y el citosol de la célula hepática; en el citosol de los eritrocitos formando complejos con la hemoglobina y en el lisosoma de neutrófilos, macrófagos y otras células fagocíticas del sistema inmune. GPx es una enzima selenio dependiente que cataliza la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a lipoperóxido (L-OOH), usa como agente reductor el GSH (Loza, 2010).

La GPx dependiente de selenio actúa en asociación con un tripéptido (glutamina, cisteína y glicina) y GSH, el cual está presente en altas concentraciones en las células y cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno o peróxido orgánico a agua o alcohol, al mismo tiempo se oxida GSH (Chaudière y Ferrari-Iliou, 1999). Además, este compite con CAT para el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato y es la fuente principal de protección contra niveles bajos de estrés oxidante (Chaudière y Ferrari-Iliou, 1999).

La GPx se encarga de la reducción de hidroperóxidos intracelulares, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, grandes moléculas de peróxidos lipídicos, procedentes del ataque de los radicales libres de oxígeno sobre los lípidos poliinsaturados de las membranas y sobre productos derivados de las reacciones catalizadas por la enzima lipooxigenasa (Chaudière y Ferrari-Iliou, 1999).

De las 25 selenoproteínas mostradas para ser codificada por el genoma humano (Kryukov, *et al.*, 2003), las dependientes de selenio, la forma citosólica de la GPx (GPx-1), está en la etiología del cáncer (Diwadkar-Navsariwala y Diamond, 2004).

Para reducir el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O, la GPx cataliza la oxidación del GSH a GSSG, el cual, a su vez, es reducido a GSH por la enzima glutatión reductasa en presencia de NADPH, formándose un ciclo redox e impidiendo que se agoten las reservas de GSH. Los niveles de NADPH son regenerados por la acción de las enzimas málicas y Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa (G6PDH) (Muñoz, 2003).

#### 1.2.2.3.1. Isoformas de Glutatión Peroxidasa (GPx)

Cuadro 2. Algunas características de las diferentes isoformas de GPx (Chu, *et al.*, 1993).

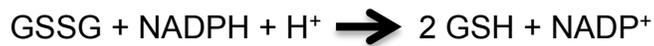
Isoforma	Localización	Estructura	Peso molecular
GPx citosólica	Citosol	Tetrámero	84 KDa (rata)
GPx extracelular	Extracelular	Tetrámero	100 KDa (rata)
GPx gastrointestinal	Gastrointestinal	Tetrámero	75 KDa (rata y humano)
GPx de fosfolípidos	Membranas	Monómero	21 KDa (rata)

#### 1.2.2.4. Glutatión Reductasa (GR)

La GR es una flavoenzima dependiente del Nicotinamín Adenín Dinucleótido Fosfato Reducido (NADPH), que cataliza la reducción del GSSG a glutatión reducido GSH, este es utilizado por la GPx para la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de lipoperóxidos (L-OOH), los cuales son elementos tóxicos. Es decir, específicamente tiene una función de pivoteo en el estrés oxidante. Esta se encuentra en todos los organismos aeróbicos,

así como en algunas plantas superiores, por lo que aparenta ser una enzima casi universal (Cisneros, 1995).

La GR está bien conservada en las plantas, bacterias, hongos, levaduras, y los mamíferos, lo que sugiere que es importante para la supervivencia en ambientes aeróbicos (Carlberg y Mannervik, 1985). Esta es crítica para la supervivencia celular, y ratones con niveles subóptimos de GR son más propensos al estrés oxidante y sus enfermedades asociadas (Yang, *et al.*, 2006). Sin embargo, las deficiencias de GR son poco comunes entre los seres humanos, y son causadas principalmente por deficiencias de riboflavina en la dieta (el-Hazmi y Warsy, 1989; el-Hazmi y Warsy, 1989).



El sistema antioxidante GPx/GR está relacionado con otros sistemas antioxidantes como el SOD/CAT. Se ha observado que ambos sistemas no actúan a la par, la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y a bajas concentraciones actúa la GPx. La actividad de la CAT y de la GPx está inversamente correlacionada, mientras que la CAT y la GR presentan correlación positiva (Cisneros, 1995).

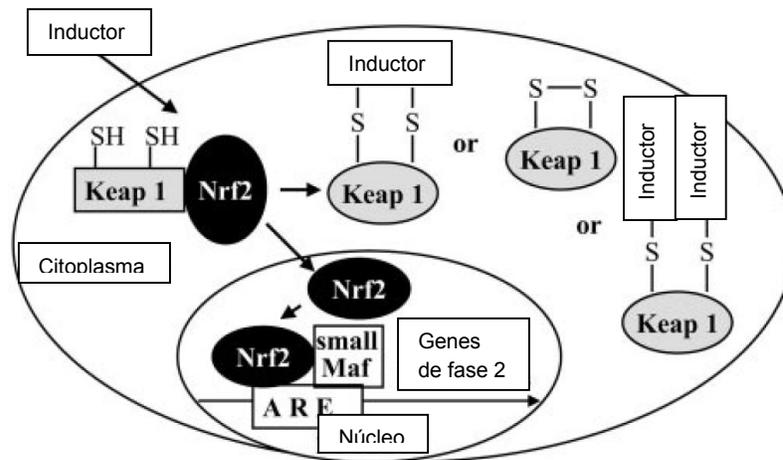
### **1.2.3. Expresión génica y su relación con el estrés oxidante**

Varias fosfatasas contienen residuos de tiol sensibles que son inhibidas en la oxidación (Caselli, *et al.*, 1998). El estado de fosforilación de una proteína es un nivel de estado estacionario fijado por las tasas relativas de cinasas y fosfatasas. Como los niveles de estado estacionario de oxidantes aumenta, se produce un aumento en la inactivación de las fosfatasas y un aumento correspondiente en los niveles y la duración de las proteínas fosforiladas (Forman, *et al.*, 2002; Suzuky, *et al.*, 1997). Un aumento en el estado de equilibrio de ERO resulta en la alteración del par redox GSH/GSSG, que a su vez puede alterar el estado de oxidación relativa de tioles de proteínas (Forman, *et al.*, 2002; Suzuky, *et al.*, 1997).

Además, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> altera la señalización celular directamente, esto permite la reacción con los tioles de los factores de transcripción, tales como la reducción del factor-1,

activador de la proteína-1, y la inhibición del factor-κB (Iles, *et al.*, 2002; Kaul y Forman, 1996).

Cuando un factor de estrés oxidante se encuentra por las células, las ERO y los potenciales redox, pueden inicialmente desviarse de sus niveles basales. La desviación, especialmente en los niveles de ERO, es detectado por el módulo transductor que comprende dos proteínas clave: a) Kelch, como proteína asociada a la ECH (Keap1) y b) Nrf2-Keap1, la cual funciona como la molécula de sensor real y Nrf2 retransmite la señal redox recogida por Keap1 al módulo controlador. Keap1 es una proteína rica en cisteína que está anclado a la actina del citoesqueleto en el citosol (Dinkova-Kostova, *et al.*, 2002). Al interactuar físicamente con Nrf2 y que actúa como una proteína adaptadora para una ubiquitina ligasa E3 complejo Cul3-dependiente, Keap1 promueve la ubiquitinación de Nrf2 y su eventual degradación por el proteasoma (McMahon, *et al.*, 2003; Stewart, *et al.*, 2003; Hong, *et al.*, 2005; Kobayashi, *et al.*, 2006). Ver figura 4.



**Figura 4.** Mecanismo de regulación de respuesta de la fase 2. Nrf2 está anclado en el citoplasma mediante la unión a Keap1, que se adjunta al citoesqueleto de actina. Inductores interrumpen el complejo Keap1-Nrf2, y Nrf2 migra al núcleo donde forma heterodímeros con otros factores de transcripción tales como small maf que se unen a regiones de ARE de genes de fase 2 y acelera su transcripción. Se muestran varios tipos de modificaciones de Keap1 por inductores (Modificado de Dinkova-Kostova, *et al.*, 2002).

Los múltiples residuos de cisteína contenidos en la secuencia de aminoácidos de Keap1 hacen que pueda funcionar como un sensor de cambios moleculares, detectando el estado redox celular. Un aumento en los niveles intracelulares de ERO o electrófilos, da como resultado, un aumento en la oxidación o la conjugación de residuos de cisteína claves en la molécula Keap1 (Zhang y Hannink, 2003; Levonen,

*et al.*, 2004). Aunque los residuos de cisteína exactos que se oxidan y la naturaleza de la oxidación parecen ser específicos de agente químico (Kobayashi, *et al.*, 2009), modificaciones de la molécula Keap1 en múltiples residuos de cisteína en general, debilitan su actividad como un adaptador de ligasa E3 (Yamamoto, *et al.*, 2008).

Como resultado, Keap1 se vuelve menos capaz de promover la degradación de Nrf2, que conduce a la estabilización de Nrf2, su vida media se puede extender a 100 ~ 200 min, bajo altos niveles de estrés oxidante (Hong, *et al.*, 2005; Kobayashi, *et al.*, 2006). Con la degradación más lenta, Nrf2 citosólica se incrementa desde la síntesis *de novo* de proteínas antes de entrar en el núcleo. Antes se pensaba que el estrés oxidante activaba Nrf2 mediante la promoción de su disociación del secuestro de Keap1, estudios posteriores indicaron que este no es el caso, ya que la afinidad de unión entre Keap1 y Nrf2 no se vio afectada por la exposición a factores de estrés oxidante (Egglar, *et al.*, 2005; He, *et al.*, 2006; Kobayashi, *et al.*, 2006; Tong, *et al.*, 2006).

Aunque Keap1 es el sensor de redox de alto perfil y el bucle de realimentación de la transcripción mediada por Nrf2 es la arquitectura de la unidad central del sistema de control, el transductor Keap1/Nrf2 no es el único sensor de redox, ya que este media la respuesta antioxidante. Ciertas enzimas antioxidantes en sí son sensores redox de cambios en el estado redox celular, que pueden modificar directamente las estructuras y actividades de las moléculas de la enzima (Ochi, 1995; Ochi, 1996). Al igual que Keap1, los antioxidantes sensibles a redox y enzimas relacionadas, todas contienen residuos de cisteína en sus sitios activos que pueden ser modificados de forma reversible por ERO (Schuppe-Koistinen, *et al.*, 1994; Tu y Anders, 1998).

Además de la activación transcripcional mediada por Nrf2, los niveles de ciertas enzimas antioxidantes también están regulados de post-transcripcionalmente de una manera sensible a redox. En particular, la estabilidad del mRNA de la subunidad catalítica de la haloenzima GCLC y la subunidad moduladora de la haloenzima GCLM son reguladas por estados redox. Sus vidas medias pueden duplicarse cuando las células se expusieron a diferentes prooxidantes (Sekhar, *et al.*, 1997; Liu, *et al.*, 1998; Song, *et al.*, 2005). El mecanismo para esta respuesta sensible a redox

no se entiende bien. La estabilización del mRNA de GCLC inducida en las células de cáncer de colon parece implicar un estado redox de detección a través de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) p38 y la acumulación de HuR, un factor de estabilización de mRNA (Song, *et al.*, 2005).

La regulación por incremento de la expresión de la proteína, como resultado de la estabilización del mRNA, es un proceso lento; sin embargo, el tiempo para llegar a un nuevo estado de equilibrio que está en el orden de horas o incluso de más tiempo, depende de los valores de vida media alargadas. Desde el estado redox de detección a través de la estabilización de mRNA antioxidante, no pasa por el transductor Keap1/Nrf2, su estructura es un bucle de realimentación anidada. Debido a su tiempo de respuesta, nos referimos a él como el circuito interno de realimentación lenta (Zhang, *et al.*, 2010).

GPx-1 es regulada transcripcionalmente, como parte de la respuesta celular al estrés oxidante. El paraquat, un ciclador redox que produce  $O_2^{\cdot-}$ , estimula la actividad promotora de GPx-1 (de Haan, *et al.*, 1998), y p53 regula la transcripción de GPx-1, a través de su acción en un sitio de unión de p53 (Hussain, *et al.*, 2004; Tan, *et al.*, 1999). p53 es un supresor de tumor, que modula la apoptosis, la detención del crecimiento, la reparación del ADN, y la senescencia celular en respuesta a muchos tipos de estrés celular (Hussain y Harris, 2006; Polyak, *et al.*, 1997). Los datos recientes también sugieren que la hidroxiurea regula la expresión de GPx-1, en varias líneas celulares y en los eritrocitos circulantes, en parte, por una vía dependiente de p53, proporcionando evidencia de que los mecanismos de p53 modulan la expresión *in vivo* de la GPx-1 (Cho, *et al.*, 2010).

La regulación de los sitios en AP-1 en el promotor de GPx-1, implica una serie de factores nucleares. Algunos de ellos, tales como c-jun y c-fos, son conocidos por ser sensibles a redox y son inactivados por la oxidación en los residuos de Cys críticos, necesarios para su actividad de unión al ADN (Abate, *et al.*, 1990).

Un incremento en los ácidos grasos insaturados, lipoperóxidos y las concentraciones de radicales libres de peróxido (Khan, *et al.*, 2009; Khan y Daud, *et al.*, 2009),

inducen alteraciones en el perfil de colesterol y la disminución de enzimas antioxidantes hepáticas (Adewole, *et al.*, 2007), además de la inducción de daño oxidante al ADN, esto incluye la formación de aductos, mutaciones genéticas, rotura de cadenas y alteraciones cromosómicas (Jia, *et al.*, 2002). Estos radicales libres causan el agotamiento de la actividad del citocromo P450 CYP2E1 (Fahmy, *et al.*, 2009) y un aumento de concentración de 8 oxo-desoxiguanosina (oxo8dG) en los tejidos de animales de experimentación (Sai, *et al.*, 1994). La fragmentación del DNA induce la expresión del gen p53, bloques de células en la fase G del ciclo celular, y da tiempo adicional para la reparación del ADN, cuando el daño del ADN es severo se desencadena la apoptosis (Khan, 2012).

### 1.3 Tratamiento para enfermedades hepáticas

El hígado, como cualquier otro órgano de nuestro cuerpo, es susceptible a múltiples enfermedades, sin embargo, existen muchas terapéuticas para contrarrestar los efectos ocasionados por el daño. A continuación, se mencionan algunas condiciones patológicas en hígado, con sus respectivas terapéuticas.

**Cuadro 3.** Algunas enfermedades hepáticas y su respectiva terapéutica.

<b>Enfermedad</b>	<b>Terapéutica</b>
Cirrosis en adultos y la hemocromatosis en los recién nacidos.	Trasplante ortotópico de hígado (Shupe y Petersen, 2011).
Trasplante de hígado	Terapia basada en el trasplante de células progenitoras hepáticas (Shupe y Petersen, 2011).
Trastornos metabólicos congénitos	Terapia de células progenitoras de hígado (Shupe y Petersen, 2011).
Pacientes críticos	Siembra de la matriz de hígado bioartificial (Shupe y Petersen, 2011).
Efecto del alcohol en la lesión hepática	Tratamiento probiótico (Nanji, <i>et al.</i> , 1994).

#### 1.4. Uso de plantas medicinales para tratar enfermedades hepáticas

Aunque se puede pensar que existen solamente medicamentos para el tratamiento de las enfermedades hepáticas, se encuentra alternativas, como la medicina tradicional, donde el uso de plantas para el tratamiento de diferentes enfermedades y el hígado no es la excepción. Las siguientes plantas presentan propiedades terapéuticas, en patologías relacionadas al hígado.

a) *Uncariaguianensis* (uña de gato).- Para abortar, osteoartritis, cáncer, frío, inflamación, quejas de riñón-hígado, inflamación en ovarios, próstata, dolor de estómago, úlceras (Luziatelli, *et al.*, 2010).

b) *Crotonlechleri* (sangre de grado o de drago).- En la cicatrización de heridas, úlceras, quejas del hígado, Uta (leishmaniasis), disentería, desinflamación después del parto (Luziatelli, *et al.*, 2010).

c) *Bidens pilosa* (romerillo blanco).- Se utiliza para la gripe, dolor muscular, dolor de hígado, fiebre, malaria, infecciones urinarias y uterinas (Luziatelli, *et al.*, 2010).

d) *Ocimumsanctum Linn* (tulsi).- Para la fiebre, vómitos, problemas del hígado, purificador de la sangre (Kala, *et al.*, 2006).

e) *Hippophaerhamnoides* (espino amarillo).- Utilizado para heridas, epitelización, esclerosis, profilaxis de la infección, daño por radiación, tales como los dañinos rayos, quemaduras solares, tratamiento de heridas (Fleming, 1998), actividades antioxidantes (Narayanan, *et al.*, 2005), la prevención de la úlcera inducida por etanol en ratas (Süleyman, *et al.*, 2001), enfermedades cardiovasculares, el tratamiento de las úlceras gastrointestinales, y como un agente protector del hígado (Zeb, 2004).

Una de las razones, por las cuales las plantas pueden ejercer sus efectos terapéuticos en el tratamiento de las enfermedades hepáticas, es debido a que median los mecanismos de estrés oxidante a través de sus propiedades como antioxidantes.

De tal manera que, en humanos, el tratamiento con colchicina a pacientes cirróticos mejoran algunas de sus manifestaciones clínicas como ascitis, edema y encefalopatía (Kershenobish, *et al.*, 1979).

Por otro lado, *Heterotheca inuloides* (*H. inuloides*) o árnica, es conocida por sus efectos antioxidantes (Kubo, *et al.*, 1996; Haraguchi, *et al.*, 1997; Coballase-Urrutia, *et al.*, 2011). Actualmente se ha confirmado que todas estas propiedades pueden proteger al hígado del daño oxidante inducido por la administración de CCl<sub>4</sub> (agente oxidante) (Coballase-Urrutia, *et al.*, 2011).

Además, el extracto de ajo envejecido por más de 20 meses, presenta compuestos olorosos, fuertes e irritantes en compuestos sulfurados estables y seguros (Amagase, *et al.*, 2001). Este extracto se caracteriza por contener compuestos sulfurados solubles en agua, incluyendo la S-alil-cisteína y la S-alil-mercaptocisteína, y posee propiedades hepatoprotectoras y actividades anticancerígenas, así como efectos antioxidantes (Imai, *et al.*, 1994).

Los flavonoides presentes en el ajo, el té verde, la silibinina, la curcumina, el árnica tienen propiedades preventivas contra el cáncer (Rahman, 2003; Mandel, *et al.*, 2005; Coballase-Urrutia, *et al.*, 2010).

Existen evidencias del efecto antioxidante de compuestos derivados de plantas como son los polifenoles y antocianinas, un ejemplo es *Hibiscus sabdariffa* (*H. sabdariffa*), mejor conocida como jamaica. Las antocianinas que se encuentran en el extracto de esta planta, son las responsables de su capacidad antioxidante ya que tienden a disminuir la formación de radicales libres (Suboh, *et al.*, 2004), y la formación de malondialdehído, producto final de la lipoperoxidación (Farombi e Ige, 2007).

El extracto con los polifenoles de *H. sabdariffa* protege a los componentes celulares de los daños por oxidación, esta disminuye la peroxidación de los lípidos por captura de radicales libres, incrementa la actividad de las enzimas CAT, GPx y SOD, participa en la regeneración de otros antioxidantes (vitamina C y E) (Wang, *et al.*, 2009). Baja los niveles séricos de triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad (LDL)

e incrementa la concentración de lipoproteínas de alta densidad (HDL), aminora la hiperglucemia y el depósito de los productos de la glicación avanzada (AGEs); con lo que abate el desarrollo y/o la progresión de la aterosclerosis (Wang, *et al.*, 2009).

Otra planta en estudio es la *Tilia americana* var. *mexicana*, también conocida como *T. americana*, la cual presenta actividad como antioxidante (Carmona-Aparicio, *et al.*, 2013; 2014), y que puede ser un nuevo agente terapéutico para el tratamiento de las patologías en hígado, donde el estado oxidante sea un mecanismo desencadenante de dicha enfermedad.

### **1.5. Generalidades de la *Tilia americana* var. *mexicana* (*T. americana*)**

Desde el año 1837, el botánico alemán Schlechtendal hizo una descripción botánica de *Tilia mexicana*, basada en ejemplares colectados en Chiconquiaco, Veracruz (Bush, 1929). Bush, reportó 15 especies de *T. americana* en México (*T. ambigua*, *T. arsenei*, *T. coahuilana*, *T. floridana*, *T. houghi*, *T. longipes*, *T. mexicana*, *T. moreliana*, *T. nelsoni*, *T. occidentalis*, *T. pertomentosa*, *T. prinle*, *T. roseana*, *T. rotunda* y *T. sargentiana*) (Bush, 1929). Jones, con base en diferencias en la cantidad y tipo de pubescencia en el envés de la hoja, agrupa a todas las Tílias mexicanas en una sola especie: *Tilia mexicana* (Jones, 1968).

Posteriormente, Hardin reduce el número de especies de Estados Unidos y México a solamente una: *Tilia americana* con cuatro variedades (*americana*, *heterophylla*, *carolianna* y *mexicana*). Por lo tanto, únicamente *Tilia americana* L. var. *mexicana* es conocida para México (Hardin, 1990).

Es importante destacar que se puede confundir con plantas del género *Ternstroemia*, también conocidas como tila y en las que se reportan efectos ansiolíticos (Sollozo-Dupont, *et al.*, 2011).

En la medicina tradicional mexicana, las flores y brácteas de tila (*Tilia americana* var. *mexicana*) son tomadas en infusión para el tratamiento de trastornos nerviosos. Además, los efectos sedantes, antiepilépticos, ansiolíticos y antidepresivos de brácteas, se han confirmado en modelos animales (Avilés, 2008).

Durante muchos años, en México se ha bebido una infusión de las brácteas de una planta comúnmente conocida como tila para aliviar trastornos nerviosos. En la literatura científica se encuentra reportado que esta planta tiene compuestos que presentan efecto ansiolítico, efecto sedante, efecto hipnótico y efecto antidepresivo, los cuales se han probado en diferentes modelos farmacológicos, demostrándose su efecto depresor del SNC. Estos resultados avalan el uso de tila en la medicina tradicional mexicana. Pero el uso desmedido de las brácteas, en donde se encuentra el fruto y por tanto las semillas, es un factor que limita la propagación sexual, disminuyendo drásticamente el número de semillas disponibles para tal efecto (Avilés, 2008).

### **1.5.1. Usos de Tilia**

El “té de tila”, como popularmente se le conoce a esta especie, es una planta endémica de México, utilizada para calmar los nervios, la ansiedad y para aliviar los problemas de insomnio; esta planta es usada con mucha frecuencia, sobre todo en los estados del centro de la República Mexicana como: Hidalgo, Michoacán, Morelos, Puebla, Tlaxcala y Veracruz (Pérez-Ortega, *et al.*, 2008).

Asimismo, con frecuencia es utilizada contra enfermedades del corazón y presión arterial. Además, se menciona su uso para aliviar el cólico menstrual. En general, se recomienda tomar la cocción de la flor como tratamiento de todos estos padecimientos (UNAM, 2009).

### **1.5.2. Clasificación de la *T. americana***

El nombre botánico de esta especie es *Tilia americana* var. *mexicana* (Schltdl.) J. W. Hardin [sinónimo: *Tilia mexicana* (Schltdl.)]. A continuación se presenta la clasificación taxonómica de esta especie (Brands, 2008)

**Cuadro 4.** Clasificación de la *T. americana*.

<b>Dominio</b>	Eukaryota
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Viridaeplantae
<b>Phylum</b>	Tracheophyta
<b>Subphylum</b>	Euphyllophytina
<b>Infraphylum</b>	Radiatopses
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase</b>	Dilleniidae
<b>Superorden</b>	Malvanae
<b>Orden</b>	Malvales
<b>Familia</b>	Tiliaceae
<b>Subfamilia</b>	Tilioideae
<b>Tribu</b>	Tilieae
<b>Género</b>	<i>Tilia</i>
<b>Especie</b>	<i>Tilia americana</i>
<b>Variedad:</b>	<i>Mexicana</i>

Esta especie tiene varios nombres comunes de acuerdo a la región donde se encuentre la planta: Cirimo, Tila, Tilia, Tirimo, Tzirimo y Tzirimu (Michoacán y Jalisco), Yaca y Yaco (Oaxaca), Tilia (Morelos, Hidalgo) (Martínez, 1979).

### **1.5.3. Características de la planta**

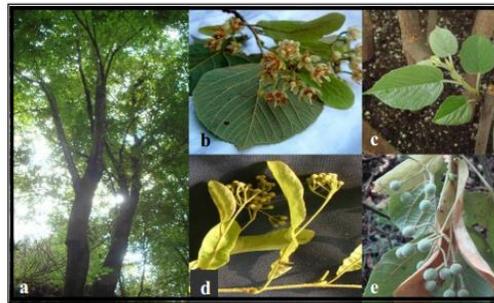
Es un árbol de tallo recto con corteza lisa (Figura 4a), de 18 a 35 m altura y 1 m de diámetro, que presenta follaje vistoso, tiene hojas simples en posición alterna, dentadas o lobadas, de color verde claro a verde oscuro, glabras en el haz, más pálidas y menudamente vellosas en el envés de la hoja, donde resalta mucho la nervadura que es palmeada, con nervios secundarios o laterales (Avilés, 2008).

Las hojas son de 8 a 14 cm de largo, en forma de corazón, con los lados desiguales en la base y el ápice puntiagudo, de bordes irregularmente dentados (Figura 4b, 4c). Las flores son fragantes, aparecen en cimas y nacen de una bráctea angosta (Figura

4d), cuando son jóvenes los pétalos son blancos con un tono rosado en la parte ventral- dorsal y se tornan amarillentos con la madurez (Figura 4b); presenta un fruto globoso de unos 7 mm, con una o dos semillas viables (Figura 4e). La época de floración se da entre los meses de Abril a Junio (Martínez, 1987; Argueta, 1994; Martínez y Matuda, 1979; Pavón, 2000).

### 1.6. Ubicación geográfica

Esta planta es originaria de México; se le encuentra en diversos tipos de suelo entre ellos los andosoles y litosoles, crece en bosques mesófilo de montaña, bosque de pino, bosque de encino, entre los 1300 y los 2400 msnm. En la figura 5 se muestra un mapa de la distribución espacial de esta especie en la República Mexicana. Se le encuentra desde los estados de Chihuahua y Coahuila en el norte del país hasta los estados de Guerrero, Oaxaca y Chiapas. Esta especie vegetal se asocia a algunas de las principales cadenas montañosas de la república mexicana y es restringida a menos del 1% de la superficie total del país (Pavón, 2000).



**Figura 5.** Árbol conocido popularmente como Tila. Fotografía de un ejemplar y sus diversas partes a) tallo, b) flores, c) hojas, d) brácteas, e) frutos (Pavón, 2000).



**Figura 6.** Distribución natural a nivel nacional de *T. americana* (Pavón, 2000).

### **1.7. Otros usos de la Tilia en México y su situación ecológica**

Otros usos de la infusión de flores de esta planta reportados son como: antiespasmódica y contra la tos (Martínez, 1969), para tratar la enterocolitis, gastroenteritis, hemorroides, cólicos hepáticos y nefríticos, dolores de la vejiga inflamada y el corazón (Pavón, 2000). Se bebe el té si se hacen corajes o se riega la bilis, así como cuando se tiene una enfermedad del hígado, y después de la comida para mejorar la digestión (Monroy-Ortiz y Castillo-España, 2007).

Además de los usos medicinales, la planta ha sufrido sobreexplotación, debido a que su madera es muy suave y se elaboran con ella diversas artesanías como: guitarras, utensilios de cocina y herramientas. Aunado a esto, el hábitat de la tila se ha reducido de manera alarmante, debido al cambio de uso del suelo y el crecimiento desmedido de las zonas urbanas.

### **1.8. Metabolitos de la *T. americana***

La tila se compone de flavonoides (tilirósido, rutina, quercitrina, kaempferol y quercetina), los cuales constituyen un grupo extenso de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos y comunes en todo el reino vegetal, particularmente en las partes aéreas. Su contenido es abundante en mucílagos y flavonoides (1%) como: la quercetina, kenferitrina, afzelina, astragalina, tilirósido, hesperidina, rutina, heterosidos de kaempferol) y ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico (ácido clorogénico, ácido caféico y p-cumárico) y taninos catequinas (2%), Polisacáridos heterogéneos en forma de mucílagos (3-10%) como arabinogalactanos. En su corteza se identificaron distintos polifenoles y compuestos derivados de la cumarina (Botanical, 2014).

Se pueden presentar tanto libres como en forma de glicósidos (O- y C-glicósidos). Estos últimos se localizan comúnmente dentro de las estructuras celulares (ejemplo: vacuolas) de hojas, flores y tallos. Las formas libres de sus derivados sencillos son comunes en exudados vegetales (ejemplo: ceras, mucílagos, aceites, savia). Presentan en común un esqueleto hidrocarbonado básico del tipo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> derivado del ácido shikímico y tres restos de acetatos. Numerosos extractos vegetales y

formulaciones farmacocinéticas que contienen flavonoides se encuentran hoy en día en el mercado (Closa, *et al.*, 1997).

La quercetina es un flavonoide que modula la biosíntesis de eicosanoides, lo que favorece un efecto antiinflamatorio, evita la agregación plaquetaria, protege a las proteínas de baja densidad (LDL) de la oxidación, disminuye la formación de malondialdehído y promueve la relajación del músculo liso vascular. Además, experimentos *in vitro* han mostrado que la quercetina tiene propiedades antoproliferativas y antimutagénicas(Sánchez, 2009).

### **1.9. Efectos biológicos de la *T. americana* en el animal íntegro y sus mecanismos a nivel central**

En diferentes experimentos en modelos murinos se observó, que los extractos hexánico y metanólico de las inflorescencias de la *T.americana*, aumentan la duración del efecto hipnótico inducido por el pentobarbital sódico, (Gyamfi, *et al.*, 2000; Aguirre-Hernández, *et al.*, 2010). Así como, los extractos metanólico y hexánico de esta planta aumentan el efecto ansiolítico, inducido por esta sustancia (Pérez-Ortega, *et al.*, 2008).

Los efectos de pentobarbital sobre el SNC implican una activación del sistema GABAérgico inhibitorio (Steinbach y Akk, 2001; Sivam, *et al.*, 1982). Actualmente, se ha descrito que el efecto de la *T. americana* en modelos murinos puede atribuirse a la capacidad de esta, y sus metabolitos (como el kaempferol) de modular los sistemas GABAérgico (Viola, *et al.*, 1994), y serotoninérgico (Viola, *et al.*, 1994). Por lo que, la *T. americana* puede favorecer el efecto del pentobarbital al potenciar su efecto sobre la activación del sistema GABAérgico.

Por otra parte, en estudios *in vitro* los extractos de *T. americana* ejercen efectos de inhibición de diversas líneas cancerígenas, por ejemplo, el extracto de acetato de etilo a partir de las hojas e inflorescencias de *T. americana* posee una actividad secuestradora a diferentes especies reactivas. Pero también, en el caso de las inflorescencias, el extracto de acetato de etilo demostró una actividad antiproliferativa significativa en la línea celular en la leucemia (K-562), esto sugiere que los efectos

citotóxicos pueden estar asociados a la actividad de eliminación de radicales libre, como según lo informaron por otros extractos de plantas del género *T. americana*. Por lo tanto, esta es la primera evidencia experimental que sugiere que el extracto de acetato de etilo de *T. americana* puede ser considerado como un antioxidante y agente citotóxico. Por lo tanto, los resultados demuestran que las inflorescencias de *T. americana* inducen la actividad antitumoral significativa para la leucemia y las inflorescencias y las hojas poseen actividad antioxidante (Carmona-Aparicio, *et al.*, 2014).

En un estudio realizado por la Dra. Cárdenas Rodríguez y colaboradores, evaluaron la actividad anticonvulsiva de las inflorescencias y las hojas de *T. mexicana*, para ello, se analizaron extractos orgánicos y acuosos (100, 300, y 600 mg / kg, i.p.) y algunos flavonoides en la convulsiones inducidas por pentilene-tetrazol (PTZ) en ratones. El efecto antioxidante de estos extractos y flavonoides se examinaron en un estudio *in vitro* mediante el uso de la técnica espectrofotométrica. Una actividad significativa observaron en el extracto de metanol de las inflorescencias. Un análisis de HPLC del extracto de metanol a partir de inflorescencias y las hojas de *Tilia* permitieron demostrar la respectiva presencia de algunos flavonoides: quercetina ( $20,09 \pm 1,20$  mg / mg y  $3,39 \pm 0,10$  mg / mg), la rutina ( $3,52 \pm 0,21$  mg / mg y  $8,94 \pm 0,45$  mg / mg), y isoquercitrina ( $1,74 \pm 0,01$  mg / mg y  $1,24 \pm 0,13$  mg / mg). Estos resultados proporcionan la evidencia de la actividad anticonvulsivante de *T. americana*, reforzando su utilidad para las enfermedades del sistema nervioso central, cuyo mecanismo de acción podría implicar parcialmente efectos antioxidantes debido a la presencia de flavonoides (Cárdenas-Rodríguez, *et al.*, 2014).

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el hígado, el principal agente inductor de daño tisular es el estrés oxidante, el cual causa alteraciones en las biomoléculas a nivel de: lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. El GSH proporciona una primera línea de defensa y atrapadores libres de ERO. La disminución en la concentración de GSH en el hígado, puede ser debido a la reducción de NADPH o la utilización de GSH en la exclusión de peróxidos (Yadav, *et al.*, 1997). Las enzimas GSH-dependientes ofrecen una segunda línea de protección, ya que desintoxican principalmente subproductos nocivos generados por ERO y contribuye a evitar la difusión de los radicales libres (Gumieniczek, 2005). GPx desintoxica los peróxidos por reacción con GSH y convertirla en GSSG, el cual es reducido a GSH por GR (Maritim, *et al.*, 2003). Una de las estrategias terapéuticas que se busca para inhibir la producción de radicales libres y los efectos secundarios que éstos pueden ocasionar, pudiera ser mediante la administración de los extractos de la planta *T. americana*, ya que por su contenido en flavonoides, sugiere propiedades antioxidantes, y por lo tanto, puede hacer frente al daño ocasionado por el estrés oxidante y hasta el momento se desconoce el efecto de dicha planta en el daño hepático.

## 3. JUSTIFICACIÓN

El contenido de las enzimas antioxidantes GPx y GR, varía considerablemente en los diferentes tejidos que conforman a un organismo. Por ejemplo, se ha descrito que el hígado es uno de los órganos con elevado contenido de GSH, a diferencia del riñón, que contiene una concentración moderada, o baja como en el caso del cerebro, donde el contenido de GSH es menor que el de los órganos ya antes mencionados.

Los antioxidantes pueden prevenir el cáncer mediante la inducción de enzimas de fase II de desintoxicación y activación de factores de transcripción y las enzimas antioxidantes endógenas como: la GPx y la CAT. Se sabe que los niveles alterados de las enzimas antioxidantes y antioxidantes no enzimáticos, así como los cambios

en las vías de señalización relacionadas son evidentes en muchos tipos de cáncer humanos.

Por lo tanto, con el presente trabajo, se pretende evaluar el efecto biológico de la *T. americana* por la producción de estrés oxidante ocasionado por la administración intraperitoneal de CCl<sub>4</sub>.

La “Tila”, como se le conoce popularmente, es una planta endémica de nuestro país, utilizada con mucha frecuencia como: ansiolítico, anticonvulsivante y anti-inflamatorio. Actualmente, estudios realizados por el grupo de trabajo determinaron que, el extracto de acetato de etilo, de la *T. americana*, posee propiedades como citotóxico y como antioxidante. Por lo que, las propiedades terapéuticas de la Tilia pueden estar mediadas por su capacidad de modular el estrés oxidante.

El CCl<sub>4</sub> es un modelo de daño hepático, éste produce estrés oxidante, peroxidación lipídica y daño al ADN, esto al metabolizarse en el radical tricloro metilo por acción de las isoenzimas 2E1, 2B1 y 2B2 pertenecientes a la super familia del Citocromo P450. El hígado es uno de los órganos más afectados por reacciones de oxidación, debido a la importancia que tiene el metabolismo en el origen de estos radicales libres. Los radicales libres entre otras cosas, provocan una reducción de la fluidez de la membrana, la cual es esencial para preservar la función celular (traducción de señales, secreción y endocitosis).

Proteger al hígado de los efectos nocivos de hepatotoxinas que el hombre puede ingerir, es de suma importancia, por lo que, el uso de agentes de origen natural cada vez es más frecuente. En particular, considerando que la tilia ejerce acciones como antioxidante, esta podría ser una alternativa para ser utilizada en las alteraciones inducidas en hígado por la administración de CCl<sub>4</sub>, y la expresión génica de las enzimas presentes en este órgano pueden ser modificadas. Por lo que, en este estudio, se propone investigar el efecto de diferentes extractos de la Tilia en éste órgano, posterior de la inducción del daño hepatotóxico inducido por CCl<sub>4</sub>, y a nivel génico, se va a determinar la participación de dos de las principales enzimas que regulan el estrés oxidante en este órgano (GPx y GR).

#### **4. HIPÓTESIS**

H1: Las propiedades fitoquímicas de los extractos de *T. americana* disminuirán el estrés oxidante hepático observado en un modelo de CCl<sub>4</sub> en rata Wistar.

H2: Si el daño hepático inducido por el CCl<sub>4</sub> está relacionado con la formación de ERO, es de esperar que las enzimas antioxidantes se encuentren alteradas y que el extracto de *T. americana*, agente antioxidante, proteja contra el daño hepático producido por el CCl<sub>4</sub>, lo cual podría estar asociado a cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes.

H3: Al realizar una administración intraperitoneal de CCl<sub>4</sub> a ratas tipo Wistar, provocará una alteración en los niveles génicos de enzimas antioxidantes en el hígado, los cuales son generados por la inducción del estrés oxidante.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general**

Determinar el efecto de *T. americana* en la expresión génica de enzimas antioxidantes GPx y GR en hígado de rata con daño inducido por CCl<sub>4</sub>.

### **5.2. Objetivos particulares**

1.- Implementar los procedimientos moleculares para determinar la expresión génica de GPx y GR.

2.- Evaluar el efecto de diferentes extractos de *T. americana* en la expresión génica de GPx.

3.- Determinar el efecto de diferentes extractos de *T. americana* en la expresión génica de GR.

## 6. METODOLOGÍA (MATERIALES Y MÉTODOS)

Este es un estudio prospectivo, transversal, analítico y experimental a realizarse en el Instituto Nacional de Pediatría (INP) y en la Escuela Militar de Graduados de Sanidad (EMGS).

### 6.1. Procedimientos experimentales

#### Diagrama de flujo



Cuadro 5. Metodología experimental general.

#### 6.1.1. Sitio de colecta de la planta

Las inflorescencias de *T. americana* se recolectaron en Omiltemi, Chilpancingo, Guerrero, en los meses de mayo y junio. Un espécimen de la planta se depositó en el herbario de la Instituto Mexicano del Seguro Social, México, Distrito Federal, para referencias futuras (No. de catálogo: 131613).

### **6.1.2. Preparación y obtención de los extractos de la planta**

Las inflorescencias se secaron y trituraron, para posteriormente realizar extractos por maceración con diferentes solventes, de polaridad creciente: 1) hexano (3 x 4 L); 2) acetato de etilo (3 x 4 L); 3) metanol (3 x 4 L); a temperatura ambiente (22°C); y por infusión con agua, donde a una cantidad de 10 g de las inflorescencias se hirvieron en 500 mL, durante una hora. Los disolventes se separaron de los residuos por filtración por gravedad y luego se evaporó en vacío. El extracto final se obtuvo en porcentaje del peso seco.

### **6.1.3. Animales de experimentación**

Se utilizaron 18 ratas Wistar macho (200 g), que se dividieron aleatoriamente en 6 grupos (n=3).

El daño hepático se indujo al provocar estrés oxidante, mediante la administración de CCl<sub>4</sub> (i.p. 1.5 mL/Kg), en los animales de experimentación. El CCl<sub>4</sub> se disolvió con aceite de oliva 1:1 (v/v). Los grupos experimentales fueron sujetos a diferentes regímenes de acuerdo a lo siguiente:

- a) Grupo 1: Aceite de oliva (0.1 mL/Kg) v.o. por 6 días + CCl<sub>4</sub> (1.5 mL/Kg) i.p. 3 días antes de terminar el experimento
- b) Grupo 2: Extracto de *T. americana* en acetato de etilo (100 mg/Kg v.o. por 6 días + CCl<sub>4</sub> (1.5 mL/Kg) i.p. 3 días antes de terminar el experimento
- c) Grupo 3: Extracto de *T. americana* en metanol (100 mg/Kg v.o. por 6 días + CCl<sub>4</sub> (1.5 mL/Kg) i.p. 3 días antes de terminar el experimento
- d) Grupo 4: Extracto de *T. americana* en hexano (100 mg/Kg v.o. por 6 días + CCl<sub>4</sub> (1.5 mL/Kg) i.p. 3 días antes de terminar el experimento
- e) Grupo 5: Extracto de *T. americana* en medio acuoso (100 mg/Kg v.o. por 6 días + CCl<sub>4</sub> (1.5 mL/Kg) i.p. 3 días antes de terminar el experimento
- f) Grupo 6: Control CCl<sub>4</sub> (1.5 mL/Kg) i.p. 3 días antes de terminar el experimento.

Al término de los tratamientos los animales se sacrificaron y el hígado fue extraído y conservado a -70°C, hasta las determinaciones de la expresión génica.

El  $\text{CCl}_4$  es uno de los modelos más utilizados para inducir un daño hepático, éste produce estrés oxidante, peroxidación lipídica y daño al ADN, esto al metabolizarse en el radical tricloro metilo ( $\text{CCl}_3^\bullet$ ) por acción de las isoenzimas 2E1, 2B1 y 2B2 pertenecientes a la familia del Citocromo P450.

La administración oral de una sola dosis de este solvente provoca un daño hepático agudo semejante a la hepatitis tóxica humana y la administración crónica de  $\text{CCl}_4$  asemeja a una cirrosis alcohólica en los humanos (Muriel, 2014). El  $\text{CCl}_4$  es capaz de provocar diversos tipos de lesiones sobre el tejido hepático como son la fibrosis, necrosis hepatocelular y la esteatosis, entre otros (Costa y Trudell, 1989; Muñoz, *et al.*, 1988). Este efecto hepatotóxico está mediado por la formación de radicales libres (Popper, 1977; Pérez-Tamayo, 1983). Debido a que  $\text{CCl}_4$  se convierte en  $\text{CCl}_3^\bullet$ , por la acción del complejo enzimático citocromo P450, que se combinan con los lípidos y proteínas de la célula en presencia de oxígeno para formar el radical triclorometilperoxil ( $\text{CCl}_3\text{O}^\bullet$ ), el cual ataca a las células (Vidya, *et al.*, 2007).

#### **6.1.4. Determinación de la expresión génica de GPx y GR**

Para evaluar el nivel de expresión génica de las enzimas antioxidantes GPx y GR, se utilizó la técnica de PCR en tiempo real, también llamada PCR cuantitativa en tiempo real. Esta técnica está basada en la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y se usa para amplificar y al mismo tiempo cuantificar moléculas de ADN complementario (cDNA) específicas (Heid, *et al.*, 1996). La detección génica se logró mediante la utilización de colorantes que se unen a todas las secuencias de doble cadena de ADN en una reacción de PCR. Una vez que el colorante se une al ácido nucleico formado en la reacción, este emite una señal fluorescente que se procesa en tiempo real (Walker, 2002).

Por lo tanto, un aumento del producto de la PCR conduce a un aumento de la fluorescencia detectada en cada ciclo de la PCR; esto permite que las concentraciones de cADN o ADN puedan ser cuantificadas (Ririe, *et al.*, 1997). Para llevar a cabo este paso, se utilizó el marcador SYBR<sup>®</sup> Green. La principal limitación de este marcador, es que al unirse al total de ácidos nucleídos en la reacción de la PCR, emite una señal luminosa tanto para productos específicos como para aquellos

que no lo son (primer-dimers). Para hacer frente a esta situación se realizó un análisis de los resultados en la curva de fusión (Melt Curve). Este análisis permite que los productos no específicos puedan ser discriminados de los productos de PCR específicos (Ririe, *et al.*, 1997).

#### **6.1.4.1. Aislamiento de ARN total**

Para el aislamiento, se utilizó por cada 100 mg de tejido 1 mL de Trizol® y se homogenizó con un rotor, enjuagando cada cambio con agua destilada estéril (2 veces) y con agua molecular estéril (1 sola vez). Las muestras homogenizadas se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12,000 x g durante 10 min a 4°C. Se obtuvieron 2 fases, de las cuales solamente se recuperó el sobrenadante (aproximadamente 950 µl) y se agregaron 200 µl de Cloroformo, se mezcló fuertemente por 10 segundos con ayuda de un vórtex. Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 10 min a 12,000 x g a 4°C.

De nuevo se recuperó la fase acuosa (alrededor de 450 µl) y se agregaron 200 µl de cloroformo nuevamente, hasta ver limpio el ARN, se centrifugó durante 10 min a 12,000 x g a 4°C y se recuperó la fase acuosa (alrededor de 370 µl). Se agregaron 500 µl de isopropanol a -20°C mezclando fuertemente con ayuda de un vórtex, centrifugando durante 10 min a 8,000 x g a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Por inversión, se lavó el pellet (ARN) con 1 mL de etanol al 75%. Posteriormente se centrifugó durante 5 min a 7,600 x g a 4°C. Por último, se dejó secar el pellet (ARN) evitando deshidratación total. Se resuspendió el pellet (ARN) con 60-80 µl de agua libre de nucleasas, y se conservó a -80°C en el REVCO, hasta su uso (se realizaron alícuotas para tomar de ellas y no directamente del stock).

Para verificar la integridad del mRNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (con amortiguador Tris-Borato EDTA 0.5X). Se preparó al 1% un gel de agarosa: en 13 mL de TBE 0.5X se agregaron 0.13 g de agarosa, en adición de 1 µl de bromuro de etidio, al formarse el gel, éste se colocó en la cámara de electroforesis con Buffer TBE 1X. Se colocó en el primer pozo del gel: 1 µl de Buffer de carga (Cyan Orange Loading Buffer. Invitrogen, USA) más 2 µl de marcador de

peso molecular (1Kb) y 3 µl de agua free; en los siguientes pozos se colocaron las muestras, 5 µl de éstas, más 1µl de Buffer de carga. Para el corrimiento se utilizó Buffer de TBE a 1X, a  $\pm 70$  Volts, con 24-29 mA durante 25 min. Posteriormente se reveló el gel en el foto documentador Kodak®.

#### **6.1.4.2. Diseño de oligonucleótidos (primers)**

Para el desarrollo de la técnica de PCR para identificar la expresión génica de los genes problema GR y GPx fueron diseñados los pares de primers correspondientes. Además fueron diseñados los primers para un gen endógeno (G6PDH). Se tomaron las secuencias de mRNA de la base de datos GenBank, las cuales corresponden a los números de acceso siguientes: GSR NM\_000637, GPxNM\_000581 y G6PDH NM\_000402. Para el diseño de cada par de primers se emplearon los programas pDraw, OligoExplorer y OligoAnalyzer. La búsqueda de las secuencias fue realizada en BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para verificar la especificidad de cada una. Los primers fueron sintetizados libres de sales, a concentración de 25N y optimizados a una temperatura de alineamiento de 60°C (Invitrogen, Life Technologies).

#### **6.1.4.3. Cuantificación de ARN por RT-PCR**

Las condiciones para las reacciones de qRT-PCR fueron optimizadas con el termociclador de gradiente (Corbett Life Science, Sydney City, Australia) empleando el Kit KAPPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR (Kappa Biosystems, USA). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20 µL.

Las condiciones de reacción en el termociclador se programaron como sigue: un ciclo de 50°C por 3 min para activar a la M-MuIV transcriptasa reversa, un ciclo de 95°C por 2 min para desactivar a la enzima transcriptasa reversa, 35 ciclos de 95°C por 3 s para la desnaturalización de ADN y una fase a 60°C por 10 s para la etapa de alineamiento y extensión. Las condiciones de temperatura y volúmenes fueron transferidas al protocolo de amplificación del sistema de detección Rotor Gene 6.0 (CorbettLife Science, Sydney City, Australia).

Los productos de PCR se verificaron, visualizando su tamaño en pares de bases (pb) por electroforesis en un gel de agarosa al 2%, utilizando un marcador de 100 pb ADN Ladder (Invitrogen, CA, USA) y se estudió con el sistema de análisis de electroforesis (Bio-Rad, China). Todas las reacciones fueron realizadas por duplicado.

#### **6.1.4.4. Limpieza de muestra mediante ExoSAP**

Los productos de la RT-PCR se limpiaron con el reactivo de ExoSAP, por medio de la relación de 2 µl de solución de ExoSAP por cada 5 µl de producto de PCR. Se llevaron al termociclador con las condiciones siguientes: 37°C/15 min, 80°C/15 min y se enfriaron a 4°C. Para la extracción de fragmentos de ADN de 40–50 Kb de los productos limpios de la RT-PCR se utilizó el reactivo de QIAEX. Las muestras se almacenaron a -20°C.

#### **6.1.4.5. Purificación de fragmentos de ADN por QIAEX**

Para la extracción de fragmentos de ADN de 40 pb – 50 Kb, se realizó un gel de agarosa al 2.5% en un volumen de 20 mL de TBE 0.5X. Se colocó todo el producto de PCR (limpiado con ExoSAP previamente) más 1 µl de buffer de carga en el pozo. Se corrió el gel a 90 Volts hasta que las bandas se fueron separando. Se cortó la banda del gel de agarosa y se colocó en tubo eppendorf. Para observar el corrimiento de las bandas y el corte de las mismas se utilizó luz UV. Se pesó el gel y se agregaron volúmenes de buffer QX1 por un volumen de gel: 300µl de buffer QX1 por cada 100 mg de gel. Se agregó QIAEX mediante reglas: <2µg ADN+10 µl QIAEX, 2-10µg ADN+30 µl QIAEX, >10µg ADN+30 µl QIAEX; y re-suspendió con ayuda de un vórtex.

Se incubó a 50°C durante 10min para solubilizar la agarosa, agitándolo cada 2min. El color de la mezcla tiene que ser amarillo (si no es así se debe agregar 10 µl de Acetato de sodio 3M a pH 5, se mezcla y se continúa por 5 min más de incubación). Se centrifugó a 17,900 x g durante 30 s y se eliminó el sobrenadante. El pellet se lavó nuevamente con 500 µl de buffer QX1 y se centrifugó a 17,900 x g durante 30 s para eliminar el sobrenadante. Se lava el pellet 2 veces más con 500 µl de buffer PE

y se mezcla, para posteriormente centrifugar a 17,900 x g durante 30 s, se elimina el sobrenadante para dejarlo secar de 10 a 15 min. Por último, se realizó una elución, se agregaron 20µl de Tris-HCl 10mM pH 8.5 o H<sub>2</sub>O libre de nucleasas y se mezcló.

Se incubó de acuerdo al siguiente cuadro:

**Cuadro6.** Incubación de fragmentos de ADN

Fragmento de DNA	Temperatura	Tiempo (min)
<4 Kb	Ambiente	5
4-10 Kb	50°C	5
>10 Kb	50°C	10

Por último, se centrifugó a 17,900 x g durante 30 s, se colocó el sobrenadante en un tubo nuevo.

#### **6.1.5. Análisis Estadístico**

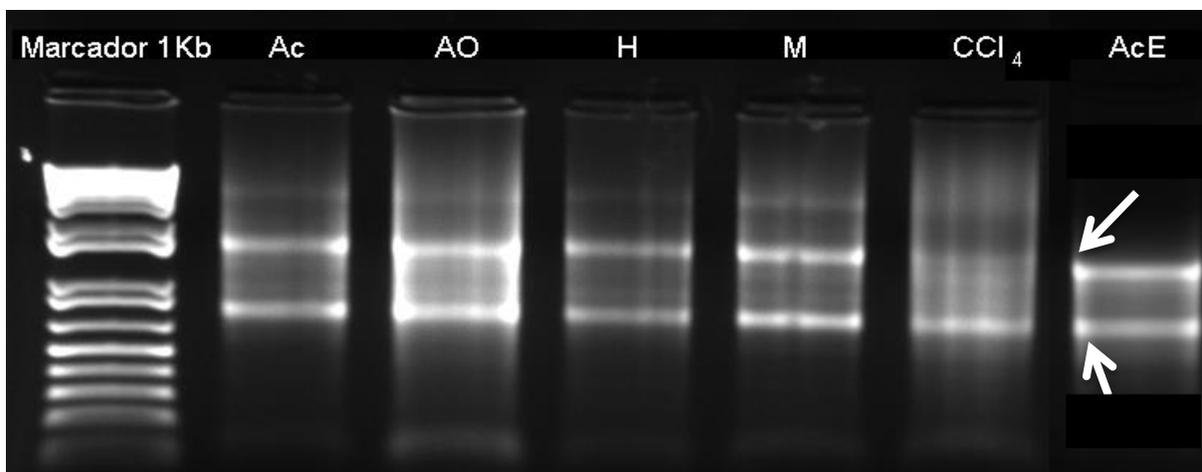
Todos los datos se analizaron por medio de la prueba de Kruskal-Wallis seguido de una prueba de rangos múltiples de Duncan. Se consideró una  $p < 0.05$  como significativa.

## 7. RESULTADOS

Para llevar a cabo la obtención de la expresión génica de las enzimas antioxidantes GPx y GR, se realizó un método de estandarización, el cual se siguió paso a paso como se mencionó anteriormente y el cual viene especificado en la parte metodológica.

Este estudio se dividió en 6 grupos diferentes, los cuales fueron conformados por: grupo control sin tratamiento ( $\text{CCl}_4$ ), grupo con tratamiento (AO) y 4 grupos con tratamiento de extractos de la planta *T. americana* (H, M, Ac y AcE).

El ARN de las muestras biológicas de los diferentes grupos experimentales fue extraído y se le evaluó su integridad, para ello, se utilizó un gel de agarosa de acuerdo a la metodología descrita previamente. De este se observaron la presencia de bandas en los diferentes carriles del gel de agarosa, dependiendo del tratamiento aplicado, nótese que las bandas son definidas y corresponden al peso molecular esperado para el ARN total (800-900 pb), prueba de su integridad (figura 6).



**Figura 7.** Gel de agarosa con los diferentes tratamientos de *T. americana*. La gráfica representa el material genético extraído (ARN) extraído en el hígado de rata, en los diferentes grupos de estudio: Tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ), Aceite de Oliva (AO), Extracto Hexánico (H), Extracto Metanólico (M), Acuoso (Ac) y Acetato de Etilo (AcE) de inflorescencias de *T. americana*. Nota: El marcador de peso molecular utilizado es un marcador de ADN, de doble cadena, el cual fue usado solo como referencia.

### A) Actividad de la enzima GPx en hígado de rata.

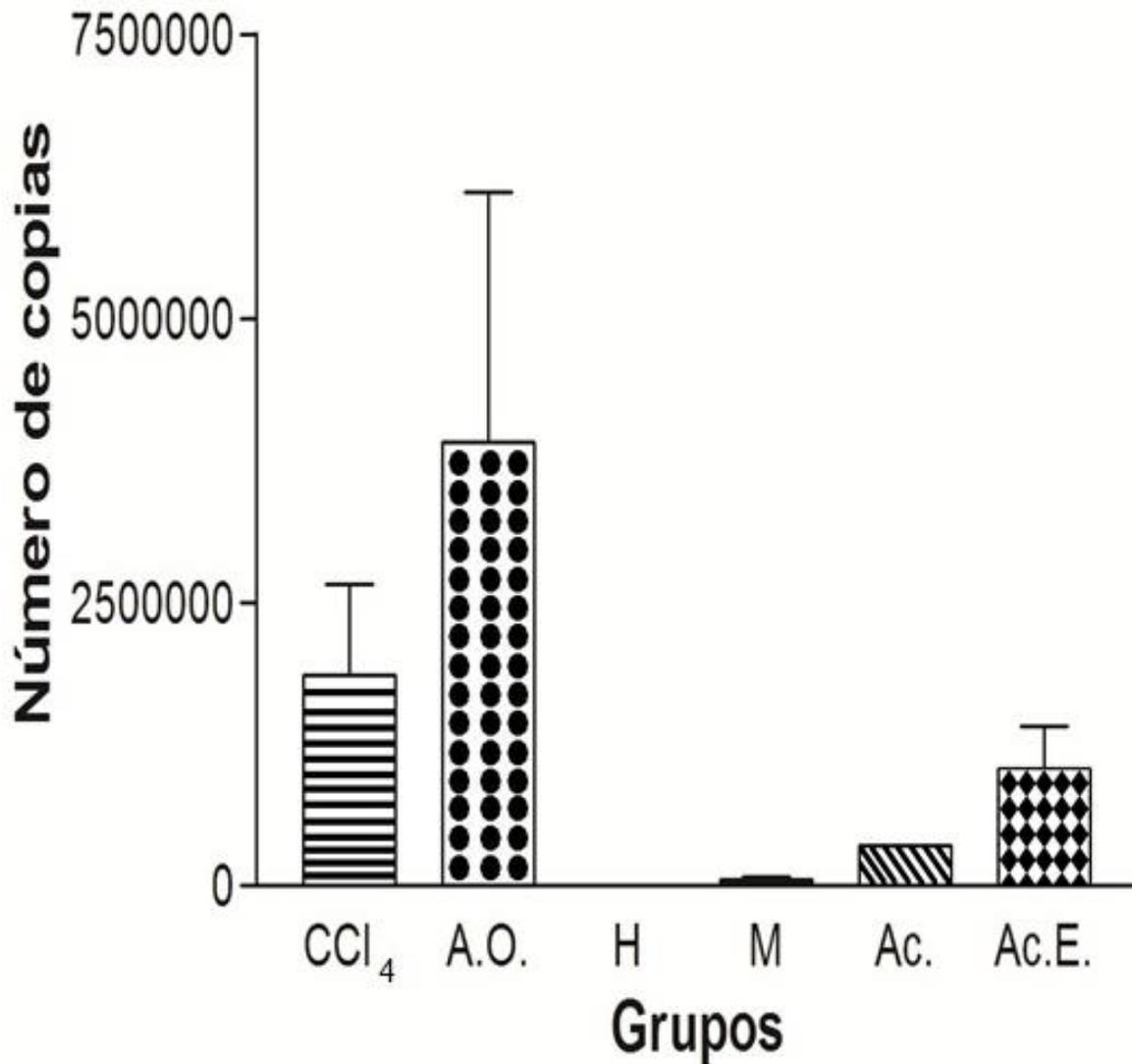
En la gráfica 1, se puede observar que el grupo de aceite de oliva induce un incremento en el número de copias, en contraste con el grupo de  $\text{CCl}_4$ , en el que se observa una menor expresión génica. En cuanto a los extractos utilizados, se puede

observar una mayor expresión del grupo acetato de etilo si lo comparamos con los valores que nos da el grupo de hexano.

*B) Actividad de la enzima GR en hígado de rata.*

Al igual que con la enzima antioxidante GPx, se midió de la misma forma, la actividad enzimática de la GR en los diferentes tratamientos, la cual se muestra en la gráfica 2. En la gráfica 2, se puede observar una ligera mayor expresión en el grupo de aceite de oliva en comparación con el grupo de CCl<sub>4</sub>. Mientras que, en cuanto a los extractos utilizados, se puede observar que el grupo acetato de etilo induce un incremento en el número de copias, en contraste con el grupo de metanol, con el valor más bajo en cuanto al número de copias reportado entre los 6 grupos experimentales.

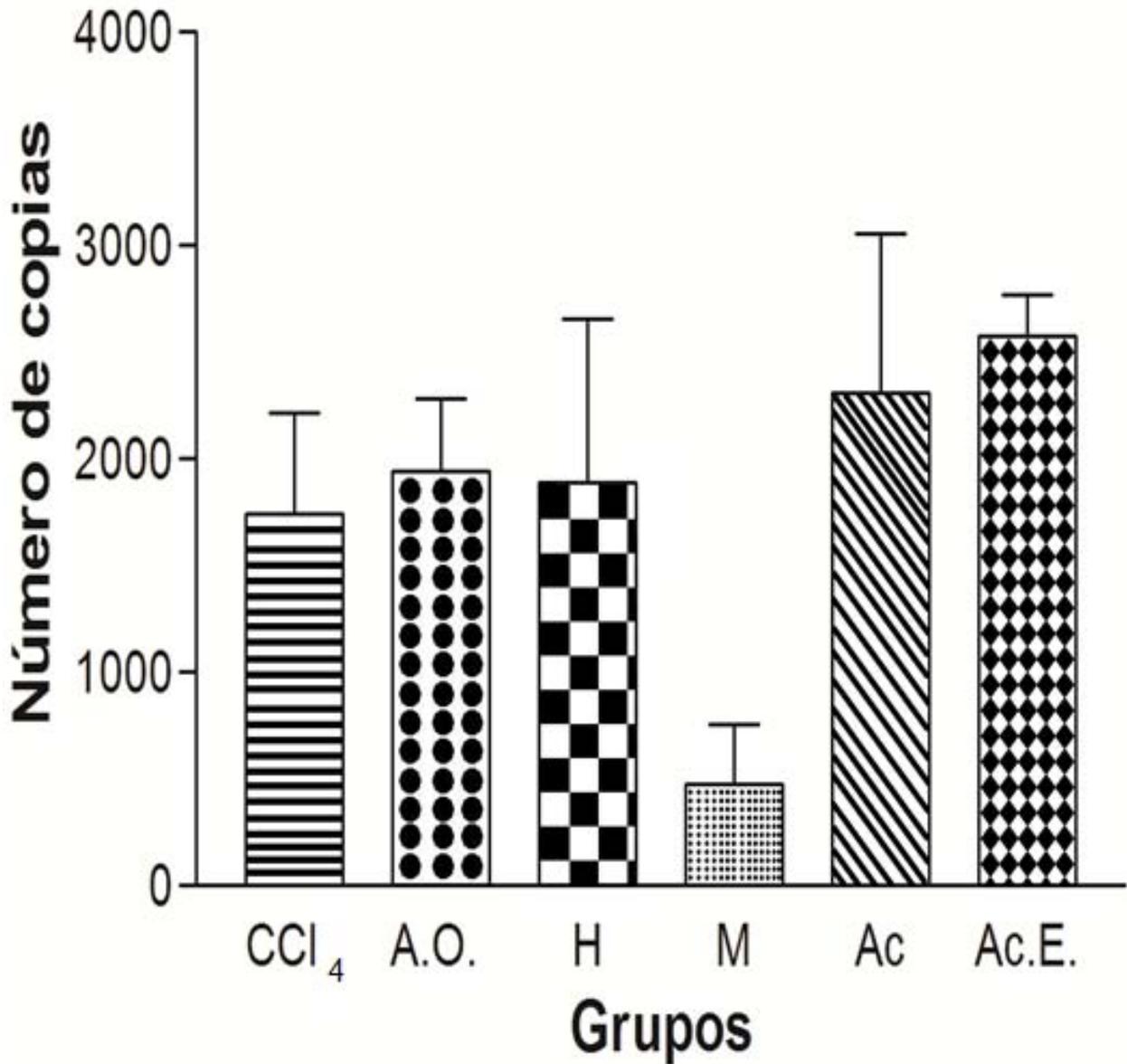
# Niveles de expresión génica de GPx en hígado de rata



1) Tetracloruro de carbono 2) Aceite de Oliva 3) Hexano 4) Metanol 5) Acuoso 6) Acetato de Etilo

**Gráfico 1.** La gráfica representa la actividad de la expresión génica de la enzima antioxidante GPx en hígado de rata, en los diferentes grupos de estudio: Tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>), Aceite de Oliva (AO), Extracto Hexánico (H), Extracto Metanólico (M), Acuoso (Ac) y Acetato de Etilo (AcE) de inflorescencias de *T. americana*. Los valores representan la media +/- la desviación estándar.

# Niveles de expresión génica de GR en hígado de rata



1) Tetracloruro de carbono 2) Aceite de Oliva 3) Hexano 4) Metanol 5) Acuoso 6) Acetato de Etilo

**Gráfico 2.** La gráfica representa la actividad de la expresión de la enzima antioxidante GR en hígado de rata, en los diferentes grupos de estudio: Tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>), Aceite de Oliva (AO), Extracto Hexánico (H), Extracto Metanólico (M), Acuoso (Ac) y Acetato de Etilo (AcE) de inflorescencias de *T. americana*. Los valores representan la media +/- la desviación estándar.

## 8. Discusión

Durante el metabolismo, las ERO como  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , y  $\cdot\text{OH}$ , se producen de forma irreversible (Scandalios, 2005). Por lo tanto, los métodos para reducir el daño inducido por el estrés oxidante son ampliamente investigados. Las enzimas antioxidantes intracelulares son un importante mecanismo protector contra las ERO. Estas enzimas se producen en la célula y proporcionan una defensa importante contra los radicales libres. SOD, CAT, GPx, GR, Glutación S-Transferasa (GST), tiorredoxina reductasa (TrxR), hemooxigenasa y la biliverdina reductasa, son las enzimas antioxidantes más importantes. La enzima SOD convierte dos  $\text{O}_2^{\cdot-}$  en una  $\text{H}_2\text{O}_2$  y una molécula de oxígeno (Lü, *et al.*, 2010).

Las ERO son elementos esenciales en procesos de señalización como la apoptosis, producción de citocinas, expresión de genes, entre otros (Baran, *et al.*, 2004; Bartosz, 2009). Sin embargo, un exceso de ERO puede generar daño por oxidación de macromoléculas. Para poder mantener la homeostasis en el sistema redox, las células poseen un sistema antioxidante endógeno conformado por superóxido dismutasas, catalasas y la glutación peroxidasa, entre otras, las cuales disminuyen la concentración de ERO (Valko, *et al.*, 2007). De hecho, el estrés oxidante se ha vinculado con diversas patologías como el cáncer, diabetes, aterosclerosis, asma, Alzheimer; además la producción de ERO se asocia con el envejecimiento (Nishikawa, *et al.*, 2009; MacNee, 2001; Harrison, *et al.*, 2003; Crimi, *et al.*, 2006; Dumont y Beal, 2011; Harman, 1992).

Los antioxidantes pueden reaccionar directamente con los radicales reactivos y destruirlos al aceptar o donar electrones para eliminar la condición desapareada del radical. Existen reportes de que los flavonoides (tilirósido, rutina, quercitrina, kaempferol y quercetina) tienen una actividad antioxidante, estos flavonoides están presentes en los extractos de *T. americana*. Determinando de ésta manera, su capacidad antioxidante y hepatoprotectora frente al estrés oxidante (Häberlein, *et al.*, 1994).

La relación entre los antioxidantes y la expresión génica también se ha estado investigando y la evidencia está emergiendo de que los antioxidantes pueden

prevenir enfermedades cardiovasculares influenciados directamente en la expresión génica o a través de promotores de genes, a través de control de las señales de regulación, ya través de la vía post-transcripcional (Kaliora, *et al.*, 2006). El papel de los fitoquímicos en la inhibición del cáncer y de la inflamación también ha sido ampliamente estudiado, y ahora está claro que estos ejercen su acción por la modulación de las enzimas de la fase I y de la fase II, así como por la modulación de las vías de señalización celular implicadas en la inflamación (Issa, *et al.*, 2006).

Una revisión por Stevenson y Hurst discutieron la evidencia reciente de que los polifenoles, también tienen efectos antioxidantes indirectos a través de la inducción de enzimas protectoras endógenas, o efectos de señalización pueden ocurrir en concentraciones mucho más bajas que los requeridos para la efectiva captación de radicales (Stevenson y Hurst, 2007).

La evidencia también está emergiendo que los flavonoides como la silibinina y la curcumina tiene propiedades preventivas contra el cáncer (Rahman, 2003; Mandel, *et al.*, 2005). En apoyo a esto, el ajo es conocido que mejora los sistemas atrapadores en las células como el GSH, SOD, CAT y GPx (Wei y Lau, 1998).

Los flavonoides, compuestos fenólicos, fitatos, polifenoles, vitaminas C y E, entre otros, son sustancias aisladas en productos naturales con capacidad antioxidante y hepatoprotectora y que sugieren protección tisular frente al estrés oxidante (Sandoval, *et al.*, 2008).

Los datos en la literatura corroboran las características estructurales de flavonoides que son importantes para sus actividades de captación de radicales libres, incluyendo (Soobrattee, *et al.*, 2005): (i) un grupo-O difenólico en el anillo B; (ii) un doble enlace 2-3 conjugado con la función 4-oxo; y (iii) la presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5.

Binsack, *et al.*, (2001) sugiere que la reacción entre los flavonoides como la quercetina y HOCl puede llevar a la producción de un compuesto clorado estable con mayor potencia antioxidante. Además, se ha demostrado que los flavonoides son buenos eliminadores de ONOO<sup>-</sup> y óxido nítrico (Haenen, *et al.*, 1997).

Más apoyo para el papel de los flavonoides en la prevención del cáncer han sido las proantocianidinas de las semillas de la uva que se ha informado de inhibir el estrés oxidante inducido por la radiación UV, y la activación de MAPK y NF- $\kappa$ B de señalización en los queratinocitos epidérmicos en humanos (Mantena y Katiyar, 2006). Los antioxidantes en la dieta también puede prevenir el cáncer mediante la posibilidad de suprimir la angiogénesis mediante la inhibición de la interleucina-8 y la molécula de unión celular VE-cadherina (Meydani, 2001).

El GSH está presente en todas las células de mamífero en un estado constante de recirculamiento metabólico, su vida media ha sido estimado y es de solo 4 días en eritrocitos humanos, de 2 a 4 horas en el citosol de células hepáticas de rata y de 30 horas en la poza mitocondrial (Kosower y Kosower, 1978; Meister, 1995).

El GSH se encuentra en diversos órganos como el cerebro, el riñón, el pulmón, el intestino, el bazo, el cristalino y el corazón, también está presente en leucocitos y eritrocitos, pero en donde se presenta en mayor cantidad es en el hígado, dado que los hepatocitos tienen la capacidad única de convertir la metionina en cisteína a través de la vía de trans-sulfatación. El 90% del GSH presente en el plasma es aportado por el hígado (Pileblad y Magnusson, 1992; García-Ruiz, *et al.*, 1995; Ookhtens y Kaplowitz, 1998).

El GSH en el hígado es transportado a través de la bilis y de la vena hepática hacia el plasma sanguíneo (Meister y Anderson, 1983). Es por eso, que dicha enzima tiene mucho énfasis en éste trabajo y es el tema principal de la misma.

En la células, el GSH desempeña varias funciones, algunas de las cuales son activación de Linfocitos-T, por lo que juega un papel importante en la respuesta inmune, participa en procesos de regulación de genes, de señales de traducción, regulación de síntesis de ADN, proteínas y proteólisis, procesos apoptóticos, regulación de la integridad y funcionamiento de la mitocondria, también juega un papel importante en la espermatogénesis y maduración espermática, inhibe infecciones producidas por virus (por ejemplo la influenza), desempeña un papel central en la patogénesis de diversas enfermedades (cáncer, Alzheimer, Parkinson,

VIH, diabetes), es importante en el metabolismo de nutrientes (Dickinson y Forman, 2002; Pompéia, *et al.*, 2003; Turrens, 2003).

El GSH puede tener una función como nucleófilo, cediendo electrones a especies que carecen de ellos o como agente reductor dentro de la célula. Cuando el GSH es oxidado (GSSG), vuelve a su estado reducido gracias a las enzimas glutatión reductasa (GSSG-Rd) que emplea NADPH como cofactor (Hayes y McLellan, 1999).

Existen evidencias que en células deficientes de GSH y G6PDH aumenta el riesgo de glicación de proteínas, lo cual conlleva a un mayor daño celular (Jain, 1998). En las células rojas sanguíneas, el antioxidante no enzimático más predominante es el GSH, considerado por ser un sistema de desintoxicación móvil de la circulación, además de evitar la oxidación de las proteínas. La función de GR es mantener el ciclo redox del GSH, a través de catalizar la protonación del disulfuro del glutatión (GSSH) durante la oxidación de NADPH (Buhimschi, *et al.*, 2003).

Con el fin de proponer una alternativa para evitar el daño por oxidación, se utilizó un antioxidante de forma exógena. Por ello, el objetivo del trabajo estuvo enfocado en evaluar a la *T. americana* como un antioxidante capaz de proteger o retrasar el daño ocasionado por el CCl<sub>4</sub>, inductor del estrés oxidante en la hepatotoxicidad.

Los resultados obtenidos mediante la técnica de RT-PCR, evidenciaron la expresión génica de las dos enzimas antioxidantes (GPx y GR) en los diferentes grupos de estudio (CCl<sub>4</sub>, aceite de oliva, hexano, metanol, acuoso y acetato de etilo).

En el caso de la enzima antioxidante GPx, se encontró que el grupo de aceite de oliva mostró una mayor expresión génica si lo comparamos con el resto de los tratamientos utilizados, particularmente con el grupo de CCl<sub>4</sub>, ya que este es el causante del estrés oxidante y tiene un nivel de expresión génica más bajo que el aceite de oliva, esto nos confirma que el mismo CCl<sub>4</sub> impide que se exprese en una mayor proporción la enzima antioxidante GPx, debido a que ésta debe de compensar el daño celular ocasionado por el CCl<sub>4</sub> y hace que no tenga un mayor número de expresión génica el valor de GPx.

Estas elevaciones de la actividad de las enzimas antioxidantes por los antioxidantes podrían apoyar la propuesta de que la *Tilia* contiene compuestos antioxidantes que ayudan en atenuar el estrés oxidante.

En cuanto a los demás extractos utilizados, se puede hacer mención al acetato de etilo que tuvo una mayor expresión génica, en comparación con los valores obtenidos del grupo de hexano por ejemplo, el cual tuvo una muy escasa expresión génica, una posible causa por la cual se expresó de esta manera el hexano, es porque el solvente como tal, tiene una menor afinidad química con los diferentes componentes de la *T. americana* al ser un solvente menos polar que el acetato de etilo o el propio metanol, y por lo tanto, se demuestra esto a nivel gráfico con un muy bajo nivel de expresión (Acosta, 2011).

La actividad de la enzima antioxidante GPx en hígado, se muestra en el gráfico 1, donde se puede observar que el grupo extracto hexánico, presenta una disminución significativa de la expresión de la enzima con respecto al resto de los grupos. Esta disminución es revertida parcialmente por los grupos de metanol y acuoso.

La disminución observada en la actividad hepática de la enzima antioxidante GPx en el grupo de CCl<sub>4</sub> puede deberse a un aumento en la producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, ya que se ha demostrado la generación de este radical por el CCl<sub>4</sub> inactiva a la GPx (Recknagel, *et al.*, 1989). Por otro lado, también se ha demostrado que el CCl<sub>4</sub> induce una disminución de la relación GSH/GSSG, lo que, a su vez, puede disminuir la actividad de la GPx (Recknagel, *et al.*, 1989).

En cuanto al efecto de la *T. americana*, se observó que esta revierte parcialmente la disminución de la actividad hepática de GPx, lo cual podría deberse a la capacidad de la *T. americana* en atrapar ERO (Imai, *et al.*, 1994).

En la enzima antioxidante GR se demostró que el grupo de aceite de oliva mostró mayor expresión génica si lo comparamos con el grupo de CCl<sub>4</sub>, el cual es causante del estrés oxidante y tiene un nivel de expresión más bajo que el aceite de oliva, esto nos dice por una parte, que el aceite de oliva ayuda a combatir el estrés oxidante ocasionado en el hígado tras la administración de CCl<sub>4</sub> vía intraperitoneal en ratas

macho Wistar, y por otro lado, que el CCl<sub>4</sub> impide que se exprese en una mayor proporción la enzima antioxidante GR, debido a que ésta debe de compensar el daño celular ocasionado por el CCl<sub>4</sub> y hace que no tenga un mayor número de expresión génica el valor de la GR.

Por otra parte, también se encontró que en los extractos de acetato de etilo, acuoso, hexano y metanol, expresaron la enzima antioxidante GR de manera descendente respectivamente. Lo cual sugiere, que los diferentes flavonoides presentes en la *T. americana*, como puede ser el caso de la quercetina, están presente en cada uno de los diferentes extractos, y sus fracciones, son los responsables del efecto antioxidante observados en el modelo de CCl<sub>4</sub> (Pérez-Ortega, *et al.*, 2008; Martínez, *et al.*, 2009).

La exposición de las ratas a CCl<sub>4</sub> resulta un agotamiento en las actividades antioxidantes. Szymonik-Lesiuk y colaboradores, reportaron que la intoxicación por CCl<sub>4</sub> conduce a cambios en enzimas antioxidantes y productos intermedios reactivos implicados en la bioactivación de CCl<sub>4</sub> que pueden evitar la activación de enzimas (Szymonik-Lesiuk, *et al.*, 2003). El GSH proporciona una primera línea de defensa. La disminución en la concentración de GSH en el hígado puede ser debido a la reducción de NADPH o la utilización de GSH en la eliminación de peróxidos (Yadav, *et al.*, 1997). Las enzimas GSH-dependientes ofrecen una segunda línea de protección, ya que desintoxican principalmente subproductos nocivos generados por ERO y contribuye a evitar la difusión de los radicales libres (Gumieniczek, 2005). GPx desintoxica los peróxidos por reacción con GSH y convertirla en GSSG, el cual es reducido a GSH por GSR (Maritim, *et al.*, 2003).

El CCl<sub>4</sub> induce estrés oxidante evidenciándose un elevado nivel en la lipoperoxidación, junto con la reducción de la actividad enzimática de SOD, CAT, GPx y GSH. El tratamiento con el extracto etanólico de *Actinopterys radiata* atenuó el estrés oxidante inducido por el CCl<sub>4</sub>. La expresión de los genes de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx y GSH disminuyó por el tratamiento con CCl<sub>4</sub>. Este efecto fue revertido por el extracto etanólico de *Actinopterys radiata*. En diversos

estudios han demostrado que *Actiniopteris radiata* contiene rutina y otros 7 derivados fenólicos (Manubolu, *et al.*, 2014).

La actividad antioxidante y las propiedades hepatoprotectoras del extracto acuoso y fracciones fenólicas del extracto tetrahidrofurano de *Halimeda opuntia* (Linnaeus) Lamourex, fueron investigados en ratas con lesión hepática inducida químicamente. El daño hepático fue inducido por CCl<sub>4</sub> y evaluado por una técnica histológica. El análisis en la RT-PCR mostró un aumento en la expresión génica de SOD y CAT y las actividades en el grupo tratado con ácido fenólico libre con fracciones de *H. opuntia* sugiere la inducción de efectos de ambas enzimas. Por lo tanto, estos datos sugieren que las fracciones fenólicas de *H. opuntia* pueden proteger al hígado contra los efectos inducidos por el estrés oxidante por los productos químicos mediante la modulación de sus enzimas antioxidantes (de Olivera e Silva, *et al.*, 2012).

Por el contrario, de acuerdo con los resultados obtenidos, nosotros observamos que la expresión génica de GPx se incrementó con la exposición a CCl<sub>4</sub> pero fue atenuada con el uso de todos los extractos de *T. americana*. Para la enzima GR se observó que el CCl<sub>4</sub> y el extracto metanólico abatieron ligeramente la expresión del gen pero el extracto de acetato de etilo la incrementó y ligeramente también el extracto acuoso. Lo anterior sugiere que los extractos de *T. americana* modulan la expresión génica por otros mecanismos diferentes considerando que poseen otro tipo de metabolitos. De acuerdo a lo anterior, en un estudio realizado por Yeh y Yen sugirieron que algunos compuestos fenólicos pueden modular la expresión de las enzimas de fase II y se ha visto que inducen de manera selectiva los transcritos de Cu/Zn-SOD, GPx y CAT (Yeh y Yen, 2006). La activación de la transcripción de las enzimas antioxidantes de fase II se ha remontado a un promotor de la transcripción que actúa en cis llamado ARE, o alternativamente, el elemento de respuesta electrófilo. Se ha demostrado que el factor de transcripción Nrf2 regula positivamente la expresión génica de las enzimas de fase II mediada por los elementos de respuesta antioxidante (ARE por sus siglas en inglés) (Katsuoka, *et al.*, 2005). El hallazgo más importante en el estudio de Yeh y Yen fue la participación de

la vía Nrf2 en la inducción de la expresión génica de enzimas antioxidantes mediadas por los ácidos fenólicos (Yeh y Yen, 2006).

Se ha demostrado que GPx produce protección contra la acción de compuestos oxidantes en el hígado reduciendo radicales libres (Naik y Panda, 2007; Shahjahan, *et al.*, 2005) y que GPx protege los componentes celulares de los efectos dañinos de los hidroperóxidos orgánicos y peróxido de hidrógeno, utilizando GSH como sustrato (Forstrom, *et al.*, 1979). Lo anterior parece sugerir que el incremento en los niveles de expresión génica de esta enzima en presencia de CCl<sub>4</sub> es por la necesidad de un incremento en la síntesis y actividad de esta enzima ante la hepatotoxicidad inducida. Finalmente en un estudio realizado por Iskusnykh y colaboradores encontraron que el proceso de generación de ERO puede promover la activación de GR y GPx en hepatotoxicidad inducida por CCl<sub>4</sub> (Iskusnykh, *et al.*, 2013). Los autores también propusieron que la activación de NF- $\kappa$ B induce la expresión de GPx y GR y también observaron una correlación entre incremento en la expresión génica de estas enzimas y la activación de Nrf2 (Iskusnykh, *et al.*, 2013). En otros estudios realizados por Harvey y Wu han demostrado que la función del ARE es asociada con la expresión génica de GR (Harvey, *et al.*, 2009; Wu, *et al.*, 2011).

## 9. Conclusiones

9.1 Se determinó el efecto hepatoprotector de la *T. americana* en la expresión génica de enzimas antioxidantes (GPx y GR), en hígado de rata con daño hepático inducido por CCl<sub>4</sub>.

9.2 Se comprobó el efecto hepatoprotector de los diferentes extractos de *T. americana* en la expresión génica de GPx, observándose una mayor expresión con el extracto de acetato de etilo en comparación con el extracto hexánico y ausente con los demás extractos utilizados.

9.3 Se determinó el efecto hepatoprotector de los diferentes extractos de *T. americana* en la expresión génica de GR, donde se observó una mayor expresión con el extracto de acetato de etilo, seguido del extracto acuoso y una disminución en la expresión con el extracto metanólico.

9.4 El tratamiento con el extracto de acetato de etilo de *T. americana* atenuó el daño hepático inducido por el CCl<sub>4</sub> en ambas enzimas (GPx y GR).

9.5 De acuerdo con lo anterior, sugerimos que los flavonoides y compuestos fenólicos que contienen los extractos de la *T. americana*, pueden inducir significativamente y de forma diferencial (dependiendo del metabolito), a las enzimas antioxidantes hepáticas e incrementar el estado antioxidante en el hígado. *T. americana* podría ser utilizada como un potencial fitofármaco.

## 10. Referencias

- 1.- Abate C, Patel L, Rauscher FJ 3rd, Curran T. Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science*. 1990. 249 (4973): 1157–1161.
- 2.- Acosta Torres, L. Evaluación de la actividad ansiolítica de extractos orgánicos de *Tilia americana var. mexicana*. [Tesis Licenciatura]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2011.
- 3.- Adewole SO, Salako AA, Doherty OW, Naicker T. Effect of melatonin on carbon tetrachloride-induced kidney injury in Wistar rats. *African J. Biomed. Res.* 2007. 10 (2): 153–164.
- 4.- Aguirre-Hernández E, González-Trujano ME, Martínez AL, Moreno J, Kite G, Terrazas T, *et al.* HPLC/MS analysis and anxiolytic-like effect of quercetin and kaempferol flavonoids from *Tilia americana var. mexicana*. *J Ethnopharmacol.* 2010. 127 (1): 91–97.
- 5.- Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. Intake of garlic and its bioactive components. *J Nutr.* 2001. 131 (3s): 955S-962S.
- 6.- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993. 90 (17): 7915-7922.
- 7.- Anatomía del hígado. UNAM, 2014. Página consultada en línea el día 25 de Marzo de 2015.
- 8.- Argueta A, Cano L, Rodarte M. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Tomo III. México: Instituto Nacional Indigenista; 1994. pp.1337.
- 9.- Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. UNAM. 2009. Página consultada en línea el día 25 de Marzo de 2015.
- 10.- Avilés Montes, D. Efecto antidepresivo y caracterización química de extractos de hojas de plantas silvestres y cultivadas en condiciones de invernadero de *Tilia americana var. mexicana* [Tesis Maestría]. México: Instituto Politécnico Nacional; 2008.
- 11.- Baran CP, Zeigler MM, Tridandapani S, Marsh CB. The role of ROS and RNS in regulating life and death of blood monocytes. *Curr Pharm Des.* 2004. 10 (8): 855-866.

- 12.- Bartosz G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol.* 2009. 77(8): 1303-1315.
- 13.- Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 1997. 272 (33): 20313-20316.
- 14.- Binsack R, Boersma BJ, Patel RP, Kirk M, White CR, Darley-Usmar V, *et al.* Enhanced antioxidant activity after chlorination of quercetin by hypochlorous acid. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001. 25 (3): 434–443.
- 15.- Bioulac-Sage P, Le Bail B, Balabaud C. Liver and Biliary Tract Histology. En: Rodés J, Benhamou J-P, Blei A, Reichen J, Rizzetto M. *Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice.* 3rd ed. Malden, MA. USA: Wiley-Blackwell Publishing; 2007.
- 16.- Boyde RC, Latner AL. Starch gel electrophoresis of transaminase in human tissue extracts and serum. *Biochem J.* 1961. 82 (1): 52.
- 17.- Brands SJ. (2008). *The Taxonomicon.* Universal Taxonomic Services, Amsterdam, The Netherlands. [<http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=6323&tree=0.1>]. Fecha de acceso: 25 de Marzo de 2015.
- 18.- Buhimschi IA, Buhimschi CS, Pupkin M, Weiner CP. Beneficial impact of term labor: nonenzymatic antioxidant reserve in the human fetus. *Am J Obstet Gynecol.* 2003. 189 (1): 181-188.
- 19.- Bush BF. The Mexican species of *Tilia*. *The American Midland Naturalist.* 1929. 11: 543-560.
- 20.- Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, *et al.* Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res.* 1999. 424 (1-2): 9-21.
- 21.- Cárdenas-Rodríguez N, González-Trujano ME, Aguirre-Hernández E, Ruíz-García M, Sampieri AIII, Coballase-Urrutia E, *et al.* Anticonvulsant and antioxidant effects of *Tilia americana* var. *mexicana* and flavonoids constituents in the pentylenetetrazole-induced seizures. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2014.
- 22.- Carini R, Autelli R, Bellomo G, Albano E. Alterations of cell volume regulation in the development of hepatocyte necrosis. *Exp Cell Res.* 1999. 248 (1): 280-293.

- 23.- Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 1985. 113. 484–490.
- 24.- Carmona-Aparicio L, González-Trujano ME, Cárdenas-Rodríguez N, Aguirre-Hernández E, Ruíz-García M, Sampieri AIII, et al. Antioxidant and anticonvulsant effects of *Tilia americana* L. var. *Mexicana*. 2013.
- 25.- Carmona-Aparicio L, Ortega-Cuellar D, González-Trujano ME, Rodríguez Chávez JL, Aguirre-Hernández E, Sampieri AIII. Ethyl acetate extract of *Tilia americana* var. *mexicana*, a new cytotoxicity and antioxidant agent. *JFAE*. 2014. 12 (2): 78-81.
- 26.- Carmona-Aparicio L, Ortega-Cuellar D, González-Trujano ME, Rodríguez-Chávez JL, Aguirre-Hernández E, Sampieri AIII, et al. Ethyl acetate extract of *Tilia americana* var. *mexicana*, a new cytotoxicity and antioxidant agent. *JFAE*. 2014. 12 (2): 78-81.
- 27.- Caselli A, Marzocchini R, Camici G, Manao G, Moneti G, Pieraccini G, et al. The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Biol Chem*. 1998. 273 (49): 32554–32560.
- 28.- Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, et al. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2006. 8 (5-6): 691–728.
- 29.- Chaudière J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol*. 1999. 37 (9-10): 949-962.
- 30.- Chihuailaf RH, Contreras PA, Wittwer FG. Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. *Vet. Méx*. 2002. 33 (3): 265-283.
- 31.- Cho CS, Kato GJ, Yang SH, Bae SW, Lee JS, Gladwin MT, et al. Hydroxyurea-induced expression of glutathione peroxidase 1 in red blood cells of individuals with sickle cell anemia. *Antioxid Redox Signal*. 2010. 13 (1): 1–11.
- 32.- Chu FF, Doroshov JH, Esworthy RS. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem*. 1993. 268 (4): 2571-2576.
- 33.- Cisneros E. La glutatión reductasa y su importancia biomédica. *Rev Cubana Invest Biomed* 1995. 14 (1).

- 34.- Cisneros Prego E, Pupo Balboa J, Céspedes Miranda E. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutación peroxidasa. Rev Cubana Invest Biomed. 1997. 16 (1): 10-15.
- 35.- Closa D, Torres M, Hotter G, Bioque G, León OS, Gelpí E, *et al.* Prostanoids and free radicals in CL4C- induced hepatotoxicity in rats: effect of astilbin. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 1997; 56 (4): 331-334.
- 36.- Coballase-Urrutia E, Pedraza-Chaverri J, Camacho-Carranza R, Cárdenas-Rodríguez N, Huerta-Gertrudis B, Medina-Campos ON, *et al.* Antioxidant activity of *Heterotheca inuloides* extracts and of some of its metabolites. Toxicology. 2010. 30. 276 (1): 41-48.
- 37.- Coballase-Urrutia E, Pedraza-Chaverri J, Cárdenas-Rodríguez N, Huerta-Gertrudis B, García-Cruz M, Ramírez-Morales A, *et al.* Hepatoprotective effect of acetonic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl<sub>4</sub>-induced toxicity in rats. Exp Toxicol Pathol. 2011. 63 (4): 363-370.
- 38.- Composición nutricional y principios activos. Tilo. Botanical. 2014. Página consultada en línea el día 25 de Marzo de 2015.
- 39.- Costa AK, Trudell JR. Interaction of hypoxia and carbon tetrachloride toxicity in hepatocyte monolayers. Exp Mol Pathol. 1989. 50 (2): 183-192.
- 40.- Crimi E, Sica V, Williams-Ignarro S, Zhang H, Slutsky AS, Ignarro LJ, *et al.* The role of oxidative stress in adult critical care. Free Radic Biol Med. 2006. 40 (3): 398-406.
- 41.- Cuningham CC, Van Horn CG. Energy availability and alcohol-induced liver pathology. Alcohol Res Health. 2003. 27 (4): 291-299.
- 42.- De Broe ME, Borgers M, Wieme RJ. The separation and characterization of liver plasma membrane fragments circulating in the blood of patients with cholestasis. Clin Chim Acta. 1975. 59 (3): 369-372.
- 43.- de Haan JB, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea RD, Cheung NS, *et al.* Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. J Biol Chem. 1998. 273 (35): 22528–22536.

- 44.- De Minicis S, Bataller R, Brenner DA. NADPH oxidase in the liver: defensive, offensive, or fibrogenic?. *Gastroenterology*. 2006. 131 (1): 272–275.
- 45.- de Oliveira e Silva AM, Vidal-Novoa A, Batista-González AE, Ricardo Pinto J, Portari Mancini DA, Reina-Urquijo W, *et al*. In vivo and in vitro antioxidant activity and hepatoprotective properties of polyphenols from *Halimeda opuntia* (Linnaeus) Lamouroux. *Maney Publishing's Online Platform*. 2012. 17 (2): 47-53.
- 46.- Delgado G, del Socorro Olivares M, Chávez MI, Ramírez-Apan T, Linares E, Bye R, *et al*. Antiinflammatory constituents from *Heterotheca inuloides*. *J Nat Prod*. 2001. 64 (7): 861-864.
- 47.- Dickinson DA, Forman HJ. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Ann N Y Acad Sci*. 2002. 973: 488-504.
- 48.- Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, *et al*. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002. 99 (18): 11908-11913.
- 49.- Diwadkar-Navsariwala V, Diamond AM. The link between selenium and chemoprevention: a case for selenoproteins. *J Nutr*. 2004. 134 (11): 2899–2902.
- 50.- Dumont M, Beal MF. Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*. 2011. 51 (5): 1014-1026.
- 51.- Egger AL, Liu G, Pezzuto JM, van Breemen RB, Mesecar AD. Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. 102 (29): 10070–10075.
- 52.- el-Hazmi MA, Warsy AS. Glutathione reductase in the south-western province of Saudi Arabia-genetic variation vs. acquired deficiency. *Haematologia (Budap)*. 1989. 22 (1): 37–42.
- 53.- el-Hazmi MA, Warsy AS. Riboflavin status in Saudi Arabia--a comparative study in different regions. *Trop Geogr Med*. 1989. 41 (1): 22–25.
- 54.- Ellis G, Goldberg DM, Spooner RJ, Ward AM. Serum enzyme tests in diseases of the liver and biliary tree. *Am J Clin Pathol*. 1978. 70 (2): 248-258.

- 55.- Enfermedades del hígado. MedlinePlus. 20 de Noviembre de 2014. Página consultada en línea el día 25 de Marzo de 2015.
- 56.- Fahmy SR, Hamdi SAH, Abdel-Salam HA. Curative effect of dietary freshwater and marine crustacean extracts on carbon tetrachloride induced nephrotoxicity. *Australian J. Basic Appl. Sci.* 2009. 3: 2118–2129.
- 57.- Farombi EO, Ige OO. Hypolipidemic and antioxidant effects of ethanolic extract from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* in alloxan-induced diabetic rats. *Fundam Clin Pharmacol.* 2007. 21 (6): 601-609.
- 58.- Fleming, T. PDF for Herbal Medicine. Medical Economics Company, New Jersey. 1998. 604-1217.
- 59.- Forman HJ, Torres M, Fukuto J. Redox signaling. *Mol Cell Biochem.* 2002. 234–235: 49–62.
- 60.- Forstrom JW, Stults FH, Tappel AL. Rat liver cytosolic glutathione peroxidase: reactivity with linoleic acid hydroperoxide and cumene hydroperoxide. *Arch Biochem Biophys.* 1979. 193 (1): 51-55.
- 61.- García-Ruiz C, Colell A, Morales A, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC. Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor-kappa B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol Pharmacol.* 1995. 48 (5): 825-834.
- 62.- Gené RM, Segura L, Adzet T, Marin E, Iglesias J. *Heterotheca inuloides*: anti-inflammatory and analgesic effect. *J Ethnopharmacol.* 1998. 60 (2): 157-162.
- 63.- Gladyshev VN. Selenoproteins and selenoproteomes. En: Hatfield DL, Berry MJ, Gladyshev VN. *Selenium: Its molecular biology and role in human health.* 2nd ed. New York: Springer; 2006: 99-114.
- 64.- González, Mónica. Enzima catalasa. 2010. Página consultada en línea el día 25 de Marzo de 2015.
- 65.- Gumieniczek, A. Effects of pioglitazone on hyperglycemia-induced alterations in antioxidative system in tissues of alloxan-treated diabetic animals. *Exp Toxicol Pathol.* 2005. 56 (4-5): 321-326.

- 66.- Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci.* 1990. 15 (4): 129-135.
- 67.- Gyamfi MA, Hokama N, Oppong-Boachie K, Aniya Y. Inhibitory effects of the medicinal herb, *Thonningia sanguinea*, on liver drug metabolizing enzymes of rats. *Hum Exp Toxicol.* 2000. 19 (11): 623–631.
- 68.- Häberlein H, Tschiersch KP, Schäfer HL. Flavonoids from *Leptospermum scoparium* with affinity to the benzodiazepine receptor characterized by structure activity relationships and in vivo studies of a plant extract. *Pharmazie.* 1994. 49 (12): 912-922.
- 69.- Haenen G, Paquay J, Korthouwer R, Bast A. Peroxynitrite Scavenging by Flavonoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997. 236 (3): 591–593.
- 70.- Haraguchi H, Ishikawa H, Sanchez Y, Ogura T, Kubo Y, Kubo I. Antioxidative constituents in *Heterotheca inuloides*. *Bioorg Med Chem.* 1997. 5 (5): 865-871.
- 71.- Haraguchi H, Saito T, Ishikawa H, Sánchez Y, Ogura T, Kubo I. Inhibition of lipid peroxidation by sesquiterpenoid in *Heterotheca inuloides*. *J Pharm Pharmacol.* 1996. 48 (4): 441–443.
- 72.- Hardin JW. Variation patterns and recognition of varieties of *Tilia americana* s.l. *Systematic Botany.* 1990. 15 (1): 33-48.
- 73.- Harman D. Role of free radicals in aging and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1992. 673: 126-141.
- 74.- Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 2003. 91 (3A): 7A-11A.
- 75.- Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N, *et al.* Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2009. 46 (4): 443-453.
- 76.- Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res.* 1999. 31(4): 273-300. Review.
- 77.- He X, Chen MG, Lin GX, Ma Q. Arsenic induces NAD(P)H-quinone oxidoreductase I by disrupting the Nrf2 x Keap1 x Cul3 complex and recruiting Nrf2 x

Maf to the antioxidant response element enhancer. *J Biol Chem.* 2006. 281 (33): 23620–23631.

78.- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996. 6 (10): 986-994.

79.- Hicks GE, Simonsick EM, Harris TB, Newman AB, Weiner DK, Nevitt MA, *et al.* Trunk muscle composition as a predictor of reduced functional capacity in the health, aging and body composition study: the moderating role of back pain. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2005. 60 (11): 1420-1424.

80.- Hong F, Sekhar KR, Freeman ML, Liebler DC. Specific patterns of electrophile adduction trigger Keap1 ubiquitination and Nrf2 activation. *J Biol Chem.* 2005. 280 (36): 31768–31775.

81.- Horiguchi N, Fouad L, Miller A, Park O, Wang H, Mohanraj R, *et al.* Dissociation of liver inflammation and hepatocellular damage induced by carbon tetrachloride in myeloid cell-specific STAT3 knockout mice. *Hepatology.* 2010. 51 (5): 1724–1734.

82.- Hussain SP, Amstad P, He P, Robles A, Lupold S, Kaneko I, *et al.* p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer Res.* 2004. 64 (7): 2350–2356.

83.- Hussain SP, Harris CC. p53 biological network: at the crossroads of the cellular-stress response pathway and molecular carcinogenesis. *J Nippon Med Sch.* 2006. 73 (2): 54–64.

84.- Iles KE, Dickinson DA, Watanabe N, Iwamoto T, Forman HJ. AP-1 activation through endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation by alveolar macrophages. *Free Radic Biol Med.* 2002. 32 (12): 1304–1313.

85.- Imai J, Ide N, Nagae S, Moriguchi T, Matsuura H, Itakura Y. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med.* 1994. 60 (5): 417-420.

86.- Iskusnykh IY, Popova TN, Agarkov AA, Pinheiro de Carvalho MÂ, Rjevskiy SG. Expression of Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase and Level of Free Radical Processes under Toxic Hepatitis in Rats. *J Toxicol.* 2013.

- 87.- Issa AY, Volate SR, Wargovich MJ. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives. *J Food Comp Analysis*. 2006. 19 (5): 405–419.
- 88.- Jaeschke H, Bajt ML. Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicol Sci*. 2006. 89 (1): 31-41.
- 89.- Jain SK. Glutathione and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency can increase protein glycosylation. *Free Radic Biol Med*. 1998. 24 (1): 197-201.
- 90.- Jia X, Han C, Chen J. Effect of tea on preneoplastic lesions and cell cycle regulators in rat liver. *Cancer Epidemiol. Biomark. Preven.* 2002. 11 (12): 1663–1667.
- 91.- Jones GN. Taxonomy of American Species of Linden (*Tilia*). *Illinois Biological Monographs*. 1968. 39: 1-156.
- 92.- Kala CP, Dhyan PP, Sajwan BS. Developing the medicinal plants sector in northern India: challenges and opportunities. *J Ethnobiol Ethnomed*. 2006. 2: 32.
- 93.- Kaliora AC, Dedoussis GVZ, Schmidt H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis*. 2006. 187 (1): 1–17.
- 94.- Katsuoka F, Motohashi H, Engel JD, Yamamoto M. Nrf2 transcriptionally activates the mafG gene through an antioxidant response element. *J Biol Chem*. 2005. 280: 4483–4490.
- 95.- Kaul N, Forman HJ. Activation of NF kappa B by the respiratory burst of macrophages. *Free Radic Biol Med*. 1996. 21 (3): 401–405.
- 96.- Kershenobich D, Uribe M, Suárez GI, Mata JM, Pérez-Tamayo R, Rojkind M. Treatment of cirrhosis with colchicine. A double-blind randomized trial. *Gastroenterology*. 1979. 77 (3): 532-526.
- 97.- Khan MR, Rizvi W, Khan GN, Khan RA, Shaheen S. Carbon tetrachloride induced nephrotoxicity in rat: Protective role of *Digera muricata*. *J Ethnopharmacol*. 2009. 122 (1): 91–99.
- 98.- Khan RA, Daud A. Protective effects of *Digera muricata* (L.) Mart. on testis against oxidative stress of carbon tetrachloride in rat. *Food Chem Toxicol*. 2009. 47 (6): 1393–1399.
- 99.- Khan RA. Protective effect of *Launaea procumbens* (L.) on lungs against CCl<sub>4</sub>-induced pulmonary damages in rat. *BMC Complement Altern Med*. 2012. 12: 133.

- 100.- Kobayashi A, Kang MI, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K, *et al.* Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol.* 2006. 26 (1): 221–229.
- 101.- Kobayashi M, Li L, Iwamoto N, Nakajima-Takagi Y, Kaneko H, Nakayama Y, *et al.* The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. *Mol Cell Biol.* 2009. 29 (2): 493–502.
- 102.- Kosower NS, Kosower EM. The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol.* 1978. 54: 109-110.
- 103.- Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigó R, *et al.* Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science.* 2003. 300 (5624): 1439–1443.
- 104.- Kubo I, Chaudhuri SK, Kubo Y, Sanchez Y, Ogura T, Saito T, *et al.* Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. *Planta Med.* 1996. 62 (5): 427–430.
- 105.- Kubo I, Muroi H, Kubo A, Chaudhuri SK, Sanchez Y, Ogura T. Antimicrobial agents from *Heterotheca inuloides*. *Planta Med.* 1994. 60 (3): 218-221.
- 106.- Levenon AL, Landar A, Ramachandran A, Ceaser EK, Dickinson DA, Zanoni G, *et al.* Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem J.* 2004. 378 (Pt2): 373–382.
- 107.- Lieber CS. Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. *Alcohol Res Health.* 2003. 27 (3): 220-231.
- 108.- Liu RM, Gao L, Choi J, Forman HJ. Gamma-glutamylcysteine synthetase: mRNA stabilization and independent subunit transcription by 4-hydroxy-2-nonenal. *Am J Physiol.* 1998. 275 (5 Pt 1): L861–L869.
- 109.- Loza Rodríguez, H. Influencia de la glicina y de un extracto de *Hibiscus sabdariffa* sobre la expresión los genes de las enzimas antioxidantes en células Jurkat. [Tesis Maestría]. Universidad Autónoma Metropolitana; 2010. Página consultada en línea el día 25 de Marzo de 2015

- 110.- Lü JM, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med*. 2010. 14 (4): 840–860.
- 111.- Lü JM, LinPH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med*. 2010. 14 (4): 840–860.
- 112.- Luziatelli G, Sørensen M, Theilade I, Mølgaard P. Asháninka medicinal plants: a case study from the native community of Bajo Quimiriki, Junín, Peru. *J Ethnobiol Ethnomed*. 2010. 6: 21.
- 113.- MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol*. 2001. 429 (1-3): 195-207.
- 114.- Mandel S, Packer L, Youdim MB, Weinreb O. Proceedings from the “Third International Conference on mechanism of Action of Nutraceuticals”. *J Nutr Biochem*. 2005. 16 (9): 513–520.
- 115.- Mandel S, Packer L, Youdim MB, Weinreb O. Proceedings from the “Third International Conference on mechanism of Action of Nutraceuticals”. *J Nutr Biochem*. 2005. 16 (9): 513–520.
- 116.- Mantena SK, Katiyar SK. Grape seed proanthocyanidins inhibit UV-radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF- $\kappa$ B signaling in human epidermal keratinocytes. *Free Radic BiolMed*. 2006. 40 (9): 1603–1614.
- 117.- Manubolu M, Goodla L, Ravilla S, Thanasekaran J, Dutta P, Malmlöf K, *et al*. Protective effect of *Actiniopteris radiata* (Sw.) Link. against CCl<sub>4</sub> induced oxidative stress in albino rats. *J Ethnopharmacol*. 2014. 153 (3): 744-752.
- 118.- Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Effects of alpha-lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr Biochem*. 2003. 14 (5): 288–294.
- 119.- Martínez AL, González-Trujano ME, Aguirre-Hernández E, Moreno J, Soto-Hernández M, López-Muñoz FJ. Antinociceptive activity of *Tilia americana* var. *mexicana* inflorescences and quercetin in the formalin test and in an arthritic pain model in rat. *Neuropharmacology*. 2009. 56 (2): 564-571.

- 120.- Martínez CS, Martínez CMJ, Esquivel HR. Hígado y sistema endocrino. Su aparición en el metabolismo. UNAM. 2001. FES Iztacala. México.
- 121.- Martínez M, Hernández F. Las Plantas Medicinales de México. México: Ediciones Botas; 1969. pp. 317.
- 122.- Martínez M, Matuda E. Flora del Estado de México. Biblioteca Enciclopédica del Estado de México, 1979.
- 123.- Martínez M. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. México: Fondo de Cultura Económica; 1979. pp. 868, 1192.
- 124.- Martínez M. Plantas autóctonas y productos volcánicos de las inmediaciones de Morelia. México. Biblioteca de Científicos Nicolaitas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 1987. pp. 10.
- 125.- McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element driven gene expression. *J Biol Chem*. 2003. 278 (24): 21592–21600.
- 126.- Meister A. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochim Biophys Acta*. 1995. 1271 (1): 35-42.
- 127.- Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem*. 1983. 52: 711-760.
- 128.- Membrillo A, Córdova A, Hicks JJ, Olivares-Corichi IM, Martínez VW, Valencia JJ. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. *INCI*. 2003. 28 (12): 699-704.
- 129.- Meydani M. Nutrition interventions in aging and age-associated diseases. *Ann NY Acad Sci*. 2001. 928: 226–235.
- 130.- Monroy-Ortiz C, Castillo-España P. Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos. 2ª Edición. México: Universidad Autónoma del Estado de Morelos; 2007. pp. 251, 253, 319.
- 131.- Muñoz E, Paz JI, Abad MM, Alonso MJ, López A. Experimental carbon tetrachloride-induced cirrhosis of the liver. *Int J Tissue React*. 1988. 10 (4): 245-251.
- 132.- Muñoz Salas, R. Enzimas antioxidantes en el daño renal por ciclosporina A y su respuesta al tratamiento con extracto de ajo envejecido [Tesis Licenciatura]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2003.

- 133.- Muriel, Pablo. "Modelos de daño hepático". CINVESTAV. 11 de Julio de 2014. Página consultada en línea el día 25 de Marzo de 2015.
- 134.- Naik SR, Panda VS. Antioxidant and hepatoprotective effects of Ginkgo biloba phytosomes in carbon tetrachloride-induced liver injury in rodents. *Liver Int.* 2007. 27 (3): 393-399.
- 135.- Nanji AA, Khettry U, Sadrzadeh SM. Lactobacillus feeding reduces endotoxemia and severity of experimental alcoholic liver (disease). *Proc Soc Exp Biol Med.* 1994. 205 (3): 243–247.
- 136.- Narayanan S, Ruma D, Gitika B, Sharma SK, Pauline T, Ram MS, *et al.* Antioxidant activities of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) during hypoxia induced oxidative stress in glial cells. *Mol Cell Biochem.* 2005. 278 (1-2): 9-14.
- 137.- Nishikawa T, Nakajima T, Katagishi T, Okada Y, Jo M, Kagawa K, *et al.* Oxidative stress may enhance the malignant potential of human hepatocellular carcinoma by telomerase activation. *Liver Int.* 2009. 29 (6): 846-856.
- 138.- Ochi T. Hydrogen peroxide increases the activity of gamma-glutamylcysteine synthetase in cultured Chinese hamster V79 cells. *Arch Toxicol.* 1995. 70 (2): 96–103.
- 139.- Ochi T. Menadione causes increases in the level of glutathione and in the activity of gammaglutamyl cysteine synthetase in cultured Chinese hamster V79 cells. *Toxicology.* 1996. 112 (1): 45–55.
- 140.- Olivares-Corichi IM, Medina-Navarro M, Torres-Ramos Y, Montes-Cortez D. Daño a proteínas por estrés oxidante: Lipoproteína de baja densidad e insulina. *Rev Endocrinol Nutr.* 2006. 14 (4): 237-240.
- 141.- Ookhtens M, Kaplowitz N. Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine. *Semin Liver Dis.* 1998. 18 (4): 313-329.
- 142.- Pavón NP, Rico-Gray V. An endangered and potentially economic tree of Mexico: *Tilia mexicana* (Tiliaceae). *Economic Botany.* 2000. 54 (1): 113-114.
- 143.- Pérez-Ortega G, Guevara-Fefer P, Chávez M, Herrera J, Martínez A, Martínez AL, *et al.* Sedative and anxiolytic efficacy of *Tilia americana var. mexicana* inflorescences used traditionally by communities of State of Michoacan, Mexico. *J Ethnopharmacology.* 2008. 116 (3): 461-468.

- 144.- Pérez-Tamayo R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl<sub>4</sub> and adequate model of human cirrhosis? *Hepatology*. 1983. 3 (1): 112-120.
- 145.- Pileblad E, Magnusson T. Increase in rat brain glutathione following intracerebroventricular administration of gamma-glutamylcysteine. *Biochem Pharmacol*. 1992. 44 (5): 895-903.
- 146.- Poljsak P, Šuput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013. 1-11.
- 147.- Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature*. 1997. 389 (6648): 300–305.
- 148.- Pompéia C, Cury-Boaventura MF, Curi R. Arachidonic acid triggers an oxidative burst in leukocytes. *Braz J Med Biol Res*. 2003. 36 (11): 1549-1560.
- 149.- Popper H. Pathologic aspects of cirrhosis. *Am J Pathol*. 1977. 87 (1): 228-264.
- 150.- Rahman K. Garlic and aging: new insights into an old remedy. *Ageing Res Rev*. 2003. 2 (1): 39–56.
- 151.- Rahman, K. Garlic and aging: new insights into an old remedy. *Ageing Res Rev*. 2003. 2 (1): 39–56.
- 152.- Ray R, Shah AM. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci (Lond)*. 2005. 109 (3): 217–226.
- 153.- Recknagel RO, Glende EA Jr, Dolak JA, Waller RL. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther*. 1989. 43 (1): 139-154.
- 154.- Rej R. Aspartate aminotransferase activity and isoenzyme proportions in human liver tissues. *Clin Chem*. 1978. 24 (11): 1971-1979.
- 155.- Requena JR, Chao CC, Levine RL, Stadtman ER. Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001. 98 (1): 69-74.
- 156.- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 1997. 245 (2): 154-160.

- 157.- Rodés J, Benhamou J-P, Blei A, Reichen J, Rizzetto M. Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice. 3rd ed. Malden, MA. USA: Wiley-Blackwell Publishing; 2007.
- 158.- Sai K, Tyson CA, Thomas DW, Dabbs JE, Hasegawa R, Kurokawa Y. Oxidative DNA damage induced by potassium bromate in isolated rat renal proximal tubules and renal nuclei. *Cancer Lett.* 1994. 87 (1): 1–7.
- 159.- Sánchez Gallego, JI. Efecto de la quercetina y la rutina frente al daño oxidativo inducido en eritrocitos con distintos contenidos de colesterol [Tesis Doctorado]. España: Universidad de Salamanca; 2009.
- 160.- Sandoval M, Lazarte K, Arnao I. Hepatoprotección antioxidante de la cáscara y semilla de *Vitis vinifera L.* (uva). *Anac Med Lima.* 2008. 69 (4): 250-259.
- 161.- Scandalios, JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res.* 2005. 38 (7): 995-1014.
- 162.- Schuppe-Koistinen I, Moldéus P, Bergman T, Cotgreave IA. S-thiolation of human endothelial cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase after hydrogen peroxide treatment. *Eur J Biochem.* 1994. 221 (3): 1033-1037.
- 163.- Segura L, Freixa B, Ringbom T, Vila R, Perera P, Adzet T, *et al.* Anti-inflammatory activity of dichloromethane extract of *Heterotheca inuloides* in vivo and in vitro. *Planta Med.* 2000. 66 (6): 553-555.
- 164.- Sekhar KR, Long M, Long J, Xu ZQ, Summar ML, Freeman ML. Alteration of transcriptional and posttranscriptional expression of gamma-glutamylcysteine synthetase by diethyl maleate. *Radiat Res.* 1997. 147 (5): 592–597.
- 165.- Shahjahan M, Vani G, Devi CS. Protective effect of *Indigofera oblongifolia* in CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity. *J Med Food.* 2005. 8 (2): 261-265.
- 166.- Shupe T, Petersen BE. Potential applications for cell regulatory factors in liver progenitor cell therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011. 43 (2): 214–221.
- 167.- Sivam SP, Nabeshima T, Ho IK. Acute and chronic effects of pentobarbital in relation to postsynaptic GABA receptors: a study with muscimol. *J Neurosci Res.* 1982. 7 (1): 37–47.

- 168.- Sollozo Dupont MI, Estrada Camarena E, López-Rubalcava C. Medicina tradicional: estudios preclínicos de plantas con propiedades ansiolíticas. *El Residente*. 2011. 6 (2): 78-84.
- 169.- Song IS, Tatebe S, Dai W, Kuo MT. Delayed mechanism for induction of gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit mRNA stability by oxidative stress involving p38 mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem*. 2005. 280 (31): 28230–28240.
- 170.- Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat Res*. 2005. 579 (1-2): 200-213.
- 171.- Steinbach JH, Akk G. Modulation of GABA(A) receptor channel gating by pentobarbital. *J Physiol*. 2001. 537 (3): 715–733
- 172.- Steinbeck MJ, Hegg GG, Karnovsky MJ. Arachidonate activation of the neutrophil NADPH-oxidase. Synergistic effects of protein phosphatase inhibitors compared with protein kinase activators. *J Biol Chem*. 1991. 266 (25): 16336–16342.
- 173.- Stevenson DE, Hurst RD. Polyphenolic phytochemicals—just antioxidants or much more?. *Cell Mol Life Sci*. 2007. 64 (22): 2900-2916.
- 174.- Stewart D, Killeen E, Naquin R, Alam S, Alam J. Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J Biol Chem*. 2003. 278 (4): 2396–2402.
- 175.- Suboh SM, Bilto YY, Aburjai TA. Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability loss of oxidatively stressed human erythrocytes. *Phytother Res*. 2004. 18 (4): 280-284.
- 176.- Süleyman H, Büyükkuroglu ME, Koruk M, Akçay F, Kiziltunç A, Gepdiremen A. The effects of Hippophae rhamnoides L. extract on ethanol-induced gastric lesion and gastric tissue glutathione level in rats: a comparative study with melatonin and omeprazole. *Indian J. Pharmacol*. 2001. 33: 77-81.
- 177.- Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med*. 1997. 22 (1-2): 269–285.
- 178.- Szymonik-Lesiuk SM, Czechowska G, Stryjecka-Zimmer M, Slomka M, Madro A, Celiski K, *et al*. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase

activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. *J. Hepatobil. Pancr. Surg.* 2003. 10 (4): 309–315.

179.- Tan M, Li S, Swaroop M, Guan K, Oberley LW, Sun Y. Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53. *J Biol Chem.* 1999. 274 (17): 12061–12066.

180.- Tian L, Cai Q, Wei H. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. *Free Radic Biol Med.* 1998. 24 (9): 1477-1484.

181.- Tong KI, Kato Y, Kusunoki H, Itoh K, Tanaka T, Yamamoto M. Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol Cell Biol.* 2006. 26 (8): 2887–2900.

182.- Tu Z, Anders MW. Identification of an important cysteine residue in human glutamate-cysteine ligase catalytic subunit by site-directed mutagenesis. *Biochem J.* 1998. 336 (Pt 3): 675–680.

183.- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003. 552 (Pt 2): 335-344.

184.- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007. 39 (1): 44-84.

185.- Venereo Gutiérrez, JR. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit.* 2002. 31 (2): 126-133.

186.- Vidya SM, Krishnar V, Manjunatha BK. Evaluation hepatoprotective activity of *Clerodendrum serratum* L. *IJEB.* 2007. 45 (6): 538-542.

187.- Viola H, Wolfman C, Levi de Stein M, Wasowski C, Peña C, Medina J.H, et al. Isolation of pharmacologically active benzodiazepine receptor ligando from *Tilia tomentosa* (Tiliaceae). *J Ethnopharmacol.* 1994. 44 (1): 47-53.

188.- Walker NJ. Tech. Sight. A technique whose time has come. *Science.* 2002. 296 (5567): 557-559.

189.- Wang SC, Lee SF, Wang CJ, Lee CH, Lee WC, Lee HJ. Aqueous Extract from *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus Ameliorate Diabetic Nephropathy via Regulating

Oxidative Status and Akt/Bad/14-3-3 $\gamma$  in an Experimental Animal Model. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2009. 20: 11-18.

190.- Wei Z, Lau BHS. Garlic inhibits free radical generation and augments antioxidant enzyme activity in vascular endothelial cells. *Nutr Res.* 1998.18 (1): 61–70.

191.- Wu KC, Cui JY, Klaassen CD. Beneficial role of Nrf2 in regulating NADPH generation and consumption. *Toxicol Sci.* 2001. 123 (2): 590-600.

192.- Yadav P, Sarkar S, Bhatnagar D. Action of Capparis decidua against alloxan-induced oxidative stress and diabetes in rat tissues. *Pharmacol Res.*1997. 36 (3): 221–228.

193.- Yamamoto T, Suzuki T, Kobayashi A, Wakabayashi J, Maher J, Motohashi H, *et al.* Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity. *Mol Cell Biol.* 2008. 28 (8): 2758-2770.

194.- Yang MS, Chan HW, Yu LC. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. *Toxicology.* 2006. 226 (2-3): 126-130.

195.- Yeh CT, Yen GC. Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA expression. *J Nutr.* 2006. 136 (1): 11-15.

196.- Zeb, A. Important Therapeutic Uses of Sea Buckthorn (Hippophae): A review. *J. Biol. Sci.* 2004. 4 (5): 687-693.

197.- Zhang DD, Hannink M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol.* 2003. 23 (22): 8137–8151.

198.- Zhang Q, Pi J, Woods CG, Andersen ME. A systems biology perspective on Nrf2-mediated antioxidant response. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010. 244 (1): 84-97.

199.- Zorrilla, AE. El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Biomed.* 2002. 21 (3): 178-185.

## 11. Anexo

### Materiales

Se utilizaron los siguientes materiales durante la parte experimental:

**Cuadro 7.** Materiales

Homogenizador (Omni International)	Tubos para PCR de 100 $\mu$ L con respectivas tapas(Eppendorf)
Vidrio de reloj (Pyrex)	Tubos de microcentrífuga de 0.6 $\mu$ L (Eppendorf)
Bisturíes (Safhandle)	Tubos de 1.5 mL(Eppendorf)
Tubos tipo Falcon de 50 mL (Neptune)	Placa metálica para tubos de PCR de 100 $\mu$ L
Hielera (Rubbermaid)	Gasa estéril (Dibar)
Tubos de microcentrífuga de 1.5 mL (Eppendorf)	Marcadores indelebles (Sharpie)
Micropipetas (10 $\mu$ L, 100 $\mu$ L y 1000 $\mu$ L) (Eppendorf)	Puntas para micropipetas (10 $\mu$ L, 100 $\mu$ L y 1000 $\mu$ L) (Eppendorf)
Microplaca de ELISA negra (Científica Senna)	Gradillas para tubos de 0.2 $\mu$ L, 0.6 $\mu$ L, 1.5 $\mu$ L y 2 $\mu$ L (Eppendorf)

### Reactivos

Se utilizaron los siguientes reactivos durante la parte experimental:

**Cuadro 8.** Reactivos

Agua destilada estéril	Agarosa (Invitrogen)
Agua molecular estéril (Integrated DNA Technologies)	Bromuro de etidio (Invitrogen)
Trizol (Invitrogen)	Alcohol al 75% (Mundo químico)

Cloroformo grado molecular (Sigma-Aldrich)	TBE al 0.5% (Sigma-Aldrich, J.K. Baker, Golden Bell)
Isopropanol grado molecular (Sigma-Aldrich)	Buffer de corrimiento (Invitrogen)
Alcohol grado molecular 75% (Sigma-Aldrich)	Buffer de carga (Invitrogen)
Agua free, libre de DNAsas, RNAsas y nucleasas (Integrated DNA Technologies)	Marcador de peso molecular (Invitrogen)
Picogreen (Invitrogen)	Kapa Sybr Fast Universal (Kapa Biosystems)

## Equipos

Se utilizaron los siguientes equipos durante la parte experimental:

### Cuadro 9. Equipos

Centrífuga refrigerada (Eppendorf, Centrifuge 5424R)	Refrigerador de 4°C (Torrey, CS-20)
Balanza granataria (Quiminet)	Congelador de -20°C
Horno de microondas (Samsung MW7592S)	Ultracongelador de -80°C (REVCO)
Cámara de electroforesis con peines (BioRad, Mini-Sub Cell GT)	Fotodocumentador (KODAK Gel Logic 100 System)
Fuente de poder (BRL, 250)	Rotor-Gene (Corbett, RG-3000)