



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y SALUD HUMANA

TESIS DOCTORAL

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y HEPATOPROTECTORA DE
Croton hypoleucus Schlttdl**

Para obtener el grado de
Doctora en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana

PRESENTA:

M. EN C. THANIA ALEJANDRA URRUTIA HERNÁNDEZ

DIRECCIÓN:

DRA. MIRANDELI BAUTISTA ÁVILA
DRA. CLAUDIA VELÁZQUEZ GONZÁLEZ

COMITÉ TUTORIAL:

DRA. ARACELI CASTAÑEDA OVANDO
DRA. NORMA GÜEMES VERA

SAN AGUSTÍN TLAXIACA, HGO., MEXICO. 20 DE JULIO 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y SALUD HUMANA

ICSa-DCASH-Julio 2020
Asunto: Asignación de Jurado de Examen

M. en A. JULIO CESAR LEINES MEDÉCIGO
COORDINACIÓN DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

Por este medio se informa que el comité tutorial asignado a la M. en C. Thania Alejandra Urrutia Hernández con número de cuenta 122651, estudiante del Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana dio terminación al trabajo de tesis titulado "Evaluación de la Actividad Antioxidante y Hepatoprotectora de *Croton hypoleucus* Schtdl.", y por lo tanto se autoriza la impresión del documento de tesis en extenso propuesto por el estudiante.

Lo anterior, en función de que, la estudiante realizó todas las correcciones, adiciones y/o modificaciones sugeridas por el comité en la revisión previa con fecha 1 de julio 2020.

Por tal motivo, solicito a usted tenga a bien permitir al doctorando dar continuidad al proceso necesario que conlleve a la obtención del grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana.

DRA. MIRANDELI BAUTISTA ÁVILA
Directora de tesis

DRA. CLAUDIA VELÁZQUEZ GONZÁLEZ
Codirectora de tesis

DRA. ARACELI CASTAÑEDA OVANDO

DRA. NORMA GÜEMES VERA

ATENTAMENTE
Pachuca, Hidalgo, 2 de julio de 2020
"Amor, Orden y Progreso"

M.C. Esp. Adrián Moya Escalera
Director del Instituto de Ciencias de la Salud
Dean

Dra. Lydia López Pontigo
Coordinadora de Posgrado del ICSa
Director of Graduate Studies of ICSa



M. en N.C Arianna Omaña Covarrubias
Jefa del Área Académica de Nutrición
Chair of Academic Area of Nutrition

Dra. Esmer Ramírez Moreno
Coordinadora del Programa Educativo
Director of Graduate Studies

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la Beca Nacional para realizar los estudios de Posgrado de julio 2016 a enero 2020, así como la Beca Mixta para efectuar la Estancia de Investigación en la Universidad Complutense de Madrid del 28 de mayo al 6 de agosto de 2017.

Al Patronato Universitario y a la Dirección de Relaciones Internacionales de la UAEH por los apoyos otorgados.

A Dra. Mirandeli Bautista, por su amistad, confianza y el apoyo para el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Claudia Velazquez, por la codirección de la tesis, sus consejos, así como su apoyo para el desarrollo de las diferentes fases de experimentación.

A las Dras. Araceli Castañeda Ovando y Norma Güemes Vera por sus valiosas aportaciones para la mejora del proyecto.

A los Dres. Jorge Arturo Santos López, Juana Benedí y Francisco José Sánchez Muniz de la Universidad Complutense de Madrid; al Dr. Victor Fajardo del Instituto de la Patagonia de la Universidad de Magallanes; así como al Dr. Roberto Villagómez del Área Académica de Química de la UAEH por su valioso apoyo y tutoría en las estancias de investigación.

A los Dres. Mariano Martínez Vázquez y Victor Alberto Castro Torres del Instituto de Química de la UNAM por las facilidades para realizar los análisis espectroscópicos.

A la Administración del Bioterio de la UAEH por las facilidades para la realización de diferentes fases de la investigación.

DEDICATORIA

Con todo mi amor, a mi Madre

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	i
INDICE DE FIGURAS	v
INDICE DE TABLAS	vii
SIGLAS Y ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1. Estrés oxidativo y nitrosativo	2
2.1.1. Anión superóxido (O_2^-).....	3
2.1.2. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	3
2.1.3. Hidroxilo ($OH\bullet$)	3
2.2. La biotransformación hepática	5
2.2.1. Fases de la biotransformación hepática	6
2.3. Papel de las células hepáticas en la eliminación de xenobióticos.....	7
2.3.1. Células epiteliales.....	7
2.3.2. Células sinusoidales	9
2.4. El daño hepático y sus mecanismos.....	12
2.4.1. Mecanismos fisiopatológicos.....	12
2.4.2. Mecanismos inducidos por agentes químicos	14
2.5. Mecanismos endógenos de defensa antioxidante	20
2.5.1. Superóxido dismutasa (SOD)	21
2.5.2. Catalasa (Cat)	21
2.5.3. Glutatión (GSH)	22
2.5.4. Glutatión peroxidasa (GPx).....	22
2.5.5. Glutatión reductasa (GR)	23
2.5.6. Factor nuclear 2 relacionado al factor eritroide 2 (Nrf2)	23
2.6. Evaluación del daño hepático	23
2.6.1. Alanina aminotransferasa (ALT).....	24
2.6.2. Aspartato aminotransferasa (AST).....	24
2.6.3. Fosfatasa alcalina (FAL).....	25
2.6.4. Gamma glutamil transpeptidasa (GGT)	25
2.6.5. Lactato deshidrogenasa (LDH)	25
2.6.6. Bilirrubina (BIL).....	26
2.6.7. Proteínas totales y albúmina	26
2.6.8. Peroxidación lipídica	27
2.6.9. La función hepatoprotectora	28
2.7. Género Croton	31
III. JUSTIFICACIÓN.....	38
IV. OBJETIVOS.....	39

4.1. Objetivo general.....	39
4.2. Objetivos específicos.....	39
V. MATERIALES Y MÉTODOS	40
Recolección del material vegetal	40
Obtención de extracto crudo.....	40
A. ESTUDIOS FITOQUÍMICOS EN EC	42
5.1. Perfil fitoquímico cualitativo.....	42
5.1.1. Ensayo para fenoles	42
5.1.2. Ensayo para flavonoides	42
5.1.3. Ensayo para terpenoides	42
5.1.4. Test para saponinas	43
5.1.5. Ensayo para taninos.....	43
5.1.6. Ensayo para alcaloides	43
5.1.7. Detección de azúcares reductores.....	43
5.1.8. Ensayo de compuestos glicosilados.....	44
5.2. Fraccionamiento de EC	44
5.2.1. Partición por par de disolventes no miscibles	46
5.2.2. Partición flash.....	46
5.2.3. Cromatografía en columna	46
5.3. Aislamiento y purificación de compuestos	47
5.3.1. Purificación de compuestos presentes en FD.....	47
5.3.2. Purificación de compuestos presentes en FAE.....	48
5.4. Identificación de compuestos aislados	48
B. ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS	49
Animales de experimentación	49
5.5. Dosis letal media (DL ₅₀).....	49
5.6. Evaluación de la actividad antioxidante de EC	49
5.6.1. DPPH (2,2-difenilpicrilhidrazilo).....	49
5.6.2. Ensayo de FRAP	50
5.7. Inducción del daño hepático con TAA	51
5.7.1. Preparación de las fracciones de EC	51
5.7.2. Animales de experimentación	51
5.8. Evaluación de los parámetros bioquímicos	52
5.8.1. Alanina aminotransferasa (ALT).....	53
5.8.2. Aspartato aminotransferasa (AST).....	53
5.8.3. Fosfatasa alcalina (FAL).....	53
5.8.4. Gamma glutamil transpeptidasa (GGT)	53
5.8.5. Lactato deshidrogenasa (LDH)	54
5.8.6. Bilirrubina directa (BILD).....	54
5.8.7. Proteínas totales	54
5.8.8. Albúmina	54

5.9. Evaluación <i>in vitro</i> del sistema antioxidante	54
5.9.1. Superóxido dismutasa (SOD)	55
5.9.2. Catalasa (Cat)	56
5.9.3. GSH y GSSG	56
5.9.4. Glutación reductasa (GR)	56
5.9.5. Glutación peroxidasa (GPx).....	57
5.9.6. Reacción del ácido tiobarbitúrico (TBARS)	57
5.10. Expresión génica del sistema antioxidante y antiinflamatorio.....	58
5.10.1. Extracción del ARN.....	58
5.10.2. Amplificación del ADN	59
5.11. Análisis Estadístico	60
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
6.1. Perfil fitoquímico de EC.....	61
6.2. Identificación de compuestos aislados de EC.....	64
6.3. DL ₅₀ de EC.....	76
6.4. Actividad antioxidante de EC	77
6.5. Evaluación de parámetros bioquímicos.....	79
6.5.1. Transaminasas.....	79
6.5.2. Fosfatasa alcalina (FAL).....	81
6.5.3. Bilirrubina directa y bilirrubina total.....	82
6.5.4. Gamma glutamil transpeptidasa.....	83
6.5.5. Lactato deshidrogenasa (LDH)	84
6.5.6. Proteínas totales y albúmina	85
6.6. Evaluación <i>in vitro</i> del sistema de defensa antioxidante endógeno	87
6.6.1. Superóxido dismutasa (SOD)	87
6.6.2. Catalasa (Cat)	89
6.6.3. Glutación (GSH y GSSG).....	90
6.6.4. Glutación peroxidasa (GPx) y Glutación reductasa (GR)	92
6.6.5. Malonaldehído (MDA)	94
6.7. Expresión génica del sistema de defensa antioxidante.....	95
6.7.1. Superóxido dismutasa (SOD)	95
6.7.2. Catalasa (Cat)	97
6.7.3. Glutación peroxidasa y Glutación reductasa.....	98
6.7.4. Nrf2	100
6.8. Expresión de TNF- α como mediador de inflamación	102
6.9. Estudio biodirigido	104
6.9.1. Transaminasas.....	104
6.9.2. Fosfatasa alcalina (FAL).....	105
6.9.3. Gamma glutamil transpeptidasa (GGT)	106
6.9.4. Lactato dehidrogenasa (LDH).....	107
VII. CONCLUSIONES	109

VIII. APÉNDICE	110
8.1. Preparación del reactivo de Meyer.....	110
8.2. Preparación del reactivo de Draggendorf.....	110
8.3. Reactivo de Benedict	110
IX. REFERENCIAS.....	111

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación de ERO y ERN.	5
Figura 2. Micrografía de la organización del acino y las zonas de biotransformación (VC: vena central; TP: triada portal, H: Hepatocitos).	8
Figura 3. Principales Células Sinusoidales.....	9
Figura 4. Mecanismos de daño fisiopatológicos	13
Figura 5. Estructura química de tioacetamida y tioacetamida disulfóxido	17
Figura 6. Mecanismo de daño hepático producido por TAA, donde AGP: ácidos grasos poliinsaturados LPO: lipoperoxidación.	17
Figura 7. Mecanismo general de daño hepático agudo producido por xenobióticos.....	19
Figura 8. <i>Croton hypoleucus</i> Schltldl.....	34
Figura 9. Estructura química del anetol.....	35
Figura 10. Estructura química de la α -amirina.	36
Figura 11. Estructura química de la taspina.....	37
Figura 12. Diagrama general de la investigación experimental.	41
Figura 13. Fraccionamiento de EC mediante las técnicas de partición por pares no miscibles y partición flash	44
Figura 14. Diagrama general de la partición de EC	45
Figura 15. Compuestos aislados e identificados de FAE y FD de EC.....	65
Figura 16. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) en CDCl_3 de la hipoleina A.	67
Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) en CDCl_3 de la hipoleina A.	68
Figura 18. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) en CDCl_3 de la hipoleina B.	69
Figura 19. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) del compuesto hipoleina B.....	70
Figura 20. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) en CDCl_3 del compuesto Crotonpeno B.	71
Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C (100 Mz) en CDCl_3 del compuesto Crotonpeno B. ...	72
Figura 22. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) en CDCl_3 del compuesto β -sitosterol.	73
Figura 23. Efecto de EC sobre los niveles de ALT en el suero de ratas con adañ hepático agudo inducido por TAA.....	79
Figura 24. Efecto de EC sobre los niveles de AST en el suero de ratas con adañ hepático agudo inducido por TAA.	80
Figura 25. Efecto de EC sobre los niveles de FAL en el suero de ratas con daño hepático inducido por TAA.....	81
Figura 26. Efecto de EC sobre los niveles de BIL-D y BIL-T en el suero de ratas con daño hepático inducido por TAA.....	82
Figura 27. Efecto de EC sobre los niveles de BIL-D y BIL-T en el suero de ratas con daño hepático inducido por TAA.....	83
Figura 28. Efecto de EC sobre los niveles de GGT en el e suero de ratas con daño hepáticon inducido por TAA.....	84
Figura 29. Efecto de EC sobre los niveles de LDH en el suero de ratas con daño hepático inducido por TAA.	85

Figura 30. Efecto de EC sobre los niveles de proteínas totales en el suero de ratas con daño hepático inducido por TAA.	86
Figura 31. Efecto de EC sobre los niveles de albúmina en el suero de ratas con daño hepático inducido por TAA.....	86
Figura 32. Niveles de SOD en hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA.	88
Figura 33. Niveles de Cat en hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA.....	89
Figura 34. Niveles de GSH en hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA..	90
Figura 35. Niveles de GSSG en hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA..	91
Figura 36. Niveles de GPx en hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA.....	93
Figura 37. Niveles de GR en hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA.	93
Figura 38. Niveles de MDA en hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA.....	94
Figura 39. Expresión génica de MnSOD en el hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA.	96
Figura 40. Expresión génica de CuZnSOD en el hígado de ratas con daño hepático inducido por TAA.	96
Figura 41. Expresión génica de Cat en el hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA.	98
Figura 42. Expresión génica de GPx en el hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA.	99
Figura 43. Expresión génica de GR en el hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA.....	100
Figura 44. Expresión génica de Nrf2 en el hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA.....	101
Figura 45. Expresión génica de TNF- α en el hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA.....	102
Figura 46. Efecto de las fracciones (FAC, FAE y FCL) sobre los niveles de ALT en el suero de ratas con daño hepático inducido por TAA.....	104
Figura 47. Efecto de las fracciones (FAC, FAE y FCL) sobre los niveles de AST en el suero de ratas con daño hepático inducido por TAA.....	105
Figura 48. Efecto de las fracciones (FAC, FAE y FCL) sobre los niveles de FAL en el suero de ratas con daño hepático inducido por TAA.....	106
Figura 49. Efecto de EC sobre los niveles de GGT en el suero de ratas con daño hepático inducido por TAA.....	107
Figura 50. Efecto de las fracciones (FAC, FAE y FCL) sobre los niveles de LDH en el suero de ratas con daño hepático inducido por TAA.....	108

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mecanismos generales de los productos naturales con función hepatoprotectora.....	30
Tabla 2. Usos tradicionales de algunas especies del género Croton.....	32
Tabla 3. Grupos de experimentación del modelo de daño hepático inducido con TAA.	52
Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en qRT-PCR.....	59
Tabla 5. Perfil fitoquímico de EC.....	62
Tabla 6. DL ₅₀ de EC.....	76

SIGLAS Y ABREVIATURAS

ATP	Adenosin trifosfato	FAL	Fosfatasa alcalina
ADN	Ácido desoxirribonucleico	FD	Fracción de diclorometano
ALP	Alkaline Phosphatase	FH	Fracción de hexano
ALT	Alanina Aminotransferasa	FM	Fracción de metanol
AST	Aspartato aminotransferasa	FRAP	Ferric reducing antioxidant power (poder antioxidante reductor de hierro)
BHT	Butilhidroxitolueno	FPS	Fracción proteica del sobrenadante
BILD	Bilirrubina	GGT	Gamma glutamil transpeptidasa
BILT	Bilirrubina total	GSH	Glutación reducido
BILD	Bilirrubina directa	GSSG	Glutación oxidado
Cat	Catalasa	GPx	Glutación peroxidasa
CE	Extracto crudo de <i>Croton hypoleucus</i> Schltdl	GR	Glutación reductasa
Cl ₅₀	Concentración inhibitoria media	HNOO	Oxido perinitroso
CYP450	Citocromo P450	IG	Intragástrico
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa	IL	Interleucina
DL ₅₀	Dosis letal media	iNOS	Inducible nitric oxide synthase (Oxido nítrico sintasa inducible)
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (2,2- difenil-1-picrihidrazilo)	IP	Intraperitoneal
EDTA	Sal disódica dihidratada del ácido etilendiaminotetraacético)	Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1 (proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch)
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase (Óxido nítrico sintasa endotelial)	LDH	Lactato deshidrogenasa
ERO	Especies reactivas de oxígeno	MDA	Malonaldehido
ERN	Especies reactivas al nitrógeno	MPO	Mieloperoxidasa
FAE	Fracción de acetato de etilo	NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
FAD	Flavin Adenin Dinucleótido	NADPH	Nicotinamida adenine dinucleótido fosfato

NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducida	TAA	Tioacetamida
NFκB	Nuclear factor kappa B (Factor nuclear kapa B)	TASO	Tioacetamida sulfóxido
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2	TASO ₂	Tioacetamida disulfóxido
NBT	Nitrozul de tetrazolio	TBA	2-thiobarbituric acid (ácido tiobarbitúrico)
NEM	N-etilmaleimida	TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico)
NO•	Radical óxido nítrico	TGF-β	Transforming growth factor-beta (Factor de crecimiento transformante beta)
NO ₂ •	Radiical dióxido nítrico	TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha (Factor de necrosis tumoral alfa)
¹ O ₂	Oxígeno singulete	SOD	Superóxido dismutasa
O ₂ ⁻	Anión Superóxido	UV	Ultravioleta
•OH	Radical hidroxilo		
ONOO•	Peroxinitrito		
OPA	O-ftalaldehido		
PMAD	Patrones moleculares asociados al daño		
pNPP	<i>p</i> -nitrofenilfosfato		
RMN	Resonancia Magnética Nuclear		
RO	Radical alcoxi		
ROOH	Hidroperóxido lipídico		
rpm	Revoluciones por minuto		
RS	Radicales tioles		
RT-PCR	Reverse transcription polimerase chain reaction (Reacción en cadena de polimerasa de transcripción reversa)		

RESUMEN

En las últimas décadas la popularidad de las plantas medicinales ha aumentado debido a la percepción de que son productos naturales., sin embargo, pocos estudios científicos respaldan su efecto farmacológico y descartan su posible toxicidad. Las especies del género *Croton* son conocidas por sus propiedades medicinales para tratar enfermedades hepáticas. La especie *C. hypoleucus* es una planta medicinal endémica de México, que a la fecha poca evidencia describe su uso seguro y eficiente como coadyuvante en las enfermedades del hígado. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antioxidante y hepatoprotectora del extracto etanólico de las partes aéreas de *C. hypoleucus* en un modelo de daño hepático agudo inducido por tioacetamida (TAA). Para ello, las partes aéreas de *Croton hypoleucus* se recolectaron en San Vidal, Tulancingo. Se preparó un extracto etanólico por maceración, seguido de la separación del disolvente por evaporación a 40°C y presión reducida hasta la obtención del extracto crudo (EC). Se identificaron sus compuestos por medio de ensayos fitoquímicos, mientras que los compuestos puros aislados se determinaron por RMN de ¹H y ¹³C. En el estudio farmacológico, se determinó la dosis letal media. Se evaluó la actividad antioxidante de EC mediante los ensayos de FRAP y DPPH. Se evaluó la capacidad hepatoprotectora de EC y las fracciones de cloroformo (FCL), acetato de etilo (FAE) y agua (FA) en ratas Wistar con daño hepático inducido por 400 mg/kg de TAA. Se midieron los parámetros bioquímicos de AST, ALT, FAL, BILD, BILT, GGT, LDH, proteína total y albúmina en el suero de las ratas como marcadores de daño. En el homogenado hepático se evaluó la actividad *in vitro* y la expresión del sistema de defensa antioxidante endógeno y TNF- α , como un marcador de inflamación. Se encontró que EC presenta una actividad antioxidante moderada en comparación a otras especies de *Croton*. Los ensayos fitoquímicos cualitativos revelaron la presencia de terpenos, flavonoides, taninos, alcaloides y esteroides. Se analizaron e identificaron la hipoleína A y B, el crotonpeno B, así como el β -sitosterol. El EC redujo los niveles de los parámetros bioquímicos y mejoró la respuesta antioxidante a través de superóxido dismutasa y catalasa, pero no por glutatión. La actividad hepatoprotectora de EC se asocia a la disminución de los marcadores bioquímicos, así como a la expresión génica de Cat. A través del presente trabajo se identifica a *C. hypoleucus* como una alternativa potencial para el tratamiento y/o prevención de las enfermedades hepáticas.

ABSTRACT

For the last decades, the popularity of medicinal plants has increased because of human perception about they are natural products. However, few studies support their pharmacological practices and reject their toxicity. Croton genus plants are highlighted due to their medicinal properties as liver diseases. *Croton hypoleucus* is an endemic specie from Mexico used to treat pain and gastrointestinal diseases. To date, little evidence describes its safe and efficient uses as an alternative to treat liver diseases. The aim of the present work was to evaluate the antioxidant and hepatoprotective activity of aerial parts ethanol extract of *Croton hypoleucus* (EC) in an acute thioacetamide induced liver damage. Aerial parts of plant were collected at San Vidal, Tulancingo. The dried and milled plant was macerated in ethanol. The solvent was recovered through evaporation at 40°C and reduced pressure. A phytochemical screening was performed to identify compounds, while the isolated compounds were studied through ^1H and ^{13}C NRM.

The work was divided into pharmacology and phytochemistry studies. As a part of pharmacology study, the lethal dose 50 was carried out. The antioxidant activity of EC was evaluated through DPPH and FRAP assays. Besides, the EC and its chloroform (FCL), ethyl acetate (FAE) and water (FA) fractions were used to evaluate the hepatoprotective activity in damaged Wistar rats by 400 mg/kg of thioacetamide. AST, ALT, ALP, BILD, BILT, GGT, LDH, total protein and albumin parameters were measured in rat's serum, while the liver homogenate was used to evaluate the *in vitro* activity and gene expression of endogen antioxidant system, and TNF- α was used an inflammation marker. EC had a moderate antioxidant activity compared with other Croton species. The preliminary screening reveled terpenes, flavonoids, tannines, alkaloyds and sterols type compounds. From EC'fractions was gotten the hypolein A-B, Crotopene B and β -stigmasterol. EC reduced biochemical parameters level and improved the antioxidant response of SOD and Cat, but it didn't with glutation. In conclusion, the hepatoprotective activity of EC is related with liver damage biomarkers reducing as well as Cat over expression. Through this work, *C. hypoleucus* is identified as a potential alternative to treat or prevent liver diseases.

I. INTRODUCCIÓN

El hígado, entre otras funciones, se encarga de la biotransformación de los alimentos, fármacos y toxinas que son absorbidos desde el intestino y suministrados través de la vena porta (Jaeschke, 2013). Los agentes xenobióticos son transformados en especies químicas más solubles y reactivas que son las responsables del daño celular (Gu & Manautou, 2012), y el origen de enfermedades como la cirrosis, esteatosis no alcohólica, colestasis y el cáncer (Meng *et al.*, 2018).

El tratamiento de las enfermedades hepáticas consiste, en la mitad de los casos, en el manejo de agentes naturales y sus derivados (Xiong & Yong-Song, 2017) que ejercen efectos terapéuticos en el hígado, como impedir el desarrollo del carcinoma; mejorar la función hepática; reducir la necrosis; regular las actividades de las enzimas transaminasas, fosfatasa alcalina y gamma glutamil transpeptidasa, relacionadas con la cirrosis; así como disminuir el contenido de bilirrubina, cuya acumulación conlleva a la ictericia. Entre los mecanismos de protección hepática se incluye la actividad antioxidante de los extractos o principios activos (Zhang *et al.*, 2013).

Algunas especies del género *Croton* se han estudiado con el fin de establecer la relación entre el uso tradicional y su efecto hepatoprotector (Ahmed *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2008; Jaya Santhi *et al.*, 2014). Sin embargo, a la fecha, estos estudios no han esclarecido su mecanismos de protección o los compuestos responsables de su propiedad farmacológica. *Croton hypoleucus* Schltldl, conocido como “Palo blanco” y “Soliman Liso” es una planta silvestre del Estado de Hidalgo. La infusión de sus partes aéreas es empleada en el tratamiento de dolor, enfermedades gastrointestinales y respiratorias, sin embargo, a la fecha, no existen estudios que describan su uso seguro y efectivo en el tratamiento de las enfermedades hepáticas.

El presente trabajo tiene por objetivo evaluar la actividad antioxidante y hepatoprotectora de *C. hypoleucus* Schltldl en la prevención del daño hepático agudo inducido por tioacetamida (TAA), por medio de la reducción de marcadores hepáticos y la regulación de los niveles de defensa antioxidante.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Estrés oxidativo y nitrosativo

El estrés oxidativo o nitrosativo es el desbalance entre los agentes oxidantes y antioxidantes en favor de la oxidación (Kurutas, 2016) y es un mediador de daño a la estructura celular y a macroelementos celulares como lípidos, proteínas, membranas y el ADN (Ahmadinejad *et al.*, 2017). El estrés oxidativo y el estrés nitrosativo son interactivos, sus productos son conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO) o al nitrógeno (ERN), radicales libres asociados con el átomo de oxígeno o nitrógeno, respectivamente, y que poseen una mayor reactividad con otras moléculas que con el oxígeno. Estas moléculas pueden promover la peroxidación de las membranas celulares, dañar a la mitocondria, inducir apoptosis, liberar citoquinas inflamatorias, potenciar el daño al ADN, provocar necrosis, activar células estelares y provocar fibrosis (Samoylenko *et al.*, 2013).

Las enzimas CYP450 localizadas tanto en el interior de la membrana de la mitocondria como dentro del retículo endoplásmico liso son la principal fuente de radicales libres (Chambel *et al.*, 2015; Richter *et al.*, 2015). Otras fuentes son la oxidación de ácidos grasos en peroxisomas (Paradies *et al.*, 2014) y enzimas como ciclooxigenasas, lipooxigenasas y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (Samoylenko *et al.*, 2013). Incluso, los hepatocitos, células de Kupffer y estelares que han estado sometidas a estrés o activadas pueden ser generadoras de ERO (Paik *et al.*, 2014).

Bajo condiciones normales, las ERO/ERN actúan como moléculas de señalización que regulan la homeostasis e incentivan la defensa contra agentes infecciosos (Richter *et al.*, 2015). Los mecanismos homeostáticos comprenden a los antioxidantes que remueven a ERO, previenen el estrés oxidativo y conservan la actividad metabólica dentro de la célula; sin embargo, el incremento en el estrés oxidativo/nitrosativo usualmente describe una condición donde las defensas antioxidantes endógenas son insuficientes para inactivarlos. La consecuencia es el daño celular y la muerte por necrosis o apoptosis (Samoylenko *et al.*, 2013).

Entre estas especies se encuentran: el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($OH\bullet$) y oxígeno singulete (1O_2), que se forman a partir de la reducción del oxígeno en su estado fundamental al O_2^- , luego a H_2O_2 , seguido por la formación del radical $OH\bullet$, y finalmente H_2O (Cederbaum, 2015).

Otros elementos de importancia biológica son: el hidroperóxido lipídico (ROOH), los radicales peroxilo ($ROO\bullet$) y alcoxi ($RO\bullet$) que están asociados a la membrana; el radical óxido nítrico ($NO\bullet$), dióxido nítrico (NO_2) y peroxinitrito ($ONOO\bullet$), que son especies reactivas a nitrógeno. así como los grupos tioles (RS), que tienen un electrón desapareado en el átomo de azufre (Ahmadinejad *et al.*, 2017). Tanto el anión O_2^- como el radical $OH\bullet$ son los que presentan mayor participación en las enfermedades hepáticas (Kurutas, 2016).

2.1.1. Anión superóxido (O_2^-)

La producción de ERO inicia en la mitocondria, donde el oxígeno molecular es reducido al anión O_2^- por NADH. Es un proceso derivado espontáneamente desde la cadena de transporte, pero también es mediado por NADPH oxidasa, xantina oxidasa (XO), lipoxigenasa (LOX), ciclooxigenasa (COX) (Mittal *et al.*, 2014). En cualquier sistema biológico que genera el anión superóxido también está presente el H_2O_2 como resultado de una reacción de dismutación (Kurutas, 2016).

2.1.2. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

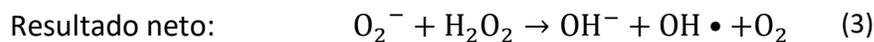
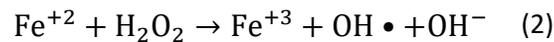
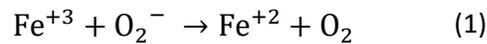
Aunque el H_2O_2 no es un radical libre, es un precursor de los radicales $ROO\bullet$, $OH\bullet$ y superóxido, que a diferencia de O_2^- , tiene la habilidad para cruzar las membranas celulares y difundirse a una distancia considerable antes de descomponerse. Al llegar al núcleo entra en contacto con el ADN que está unido a metales de transición para formar al radical $OH\bullet$ por vía de la reacción de Fenton (Wang, 2008). Así que el H_2O_2 actúa como un conductor para transmitir el radical libre a través de los compartimentos celulares y entre las células (Cederbaum, 2015).

2.1.3. Hidroxilo ($OH\bullet$)

De las ERO, $OH\bullet$ es el más reactivo y probablemente el mediador final de la mayoría de los daños tisulares asociados al estrés oxidativo (Ihsan *et al.*, 2018), y que esto se debe a que reacciona a

una velocidad extremadamente alta, con casi todas las moléculas encontradas en las células vivas, tales como lípidos y nucleótidos, iniciando la peroxidación lipídica que promueve el daño celular, la inflamación y el desarrollo de la fibrosis (Kurutas, 2016).

Aunque la formación de este radical puede ocurrir por diferentes mecanismos, el más importante es la descomposición del anión O_2^- y el H_2O_2 con la intervención de un metal de transición como el hierro o cobre, que contienen uno o mas electrones desapareados y por lo tanto actúan como radicales en su estado elemental, y sus valencia poco constantes les permiten participar en reacciones que incluyan la transferencia de un electrón (Kurutas, 2016), como se muestra en las reacciones 1 a 3.



Estas condiciones se presentan en la inflamación y en varias enfermedades cerebrovasculares, shock séptico e isquemia reperusión, entre otras, donde el radical $OH \bullet$ contribuye al desarrollo del daño tisular (Saito & Hayashi., 2015).

Los radicales derivados del óxido nítrico ($NO \bullet$) son la nitrotirosina, un marcador de estrés nitrosativo e inflamación, el peroxinitrito ($ONOO \bullet$) es un poderoso oxidante y agente de nitración que puede inducir peroxidación lipídica, daño mitocondrial (Czaja, 2016) y la oxidación de grupos sulfhidrilo (Song *et al.*, 2014).

La Figura 1 resume la producción de radicales libres en el mecanismo nitrosativo y oxidativo. La generación de ERO inicia con la reducción de oxígeno molecular con NADPH para producir el anión O_2^- , un precursor de la mayoría de las ERO y ERN. La subsecuente dismutación de O_2^- por superóxido dismutasa (SOD) genera oxígeno y H_2O_2 . Éste último es parcialmente reducido al radical $OH \bullet$ mediante la reacción de Fenton o por la vía Haber-Weiis, o bien es convertido al potente ácido hipocloroso en presencia del ion cloruro en una reacción catalizada por

mieloperoxidasa (MPO). La reacción del ácido hipocloroso con H_2O_2 genera ion cloruro y O^\bullet (otra especie reactiva al oxígeno). Por otra parte, las ERN como el óxido nítrico (NO^\bullet) son producidas por la enzima óxido nítrico sintasa, iniciando desde la L-arginina. Se forma ONOO^\bullet que puede desintegrarse en OH^\bullet y NO_2^\bullet (Moussa *et al.*, 2019).

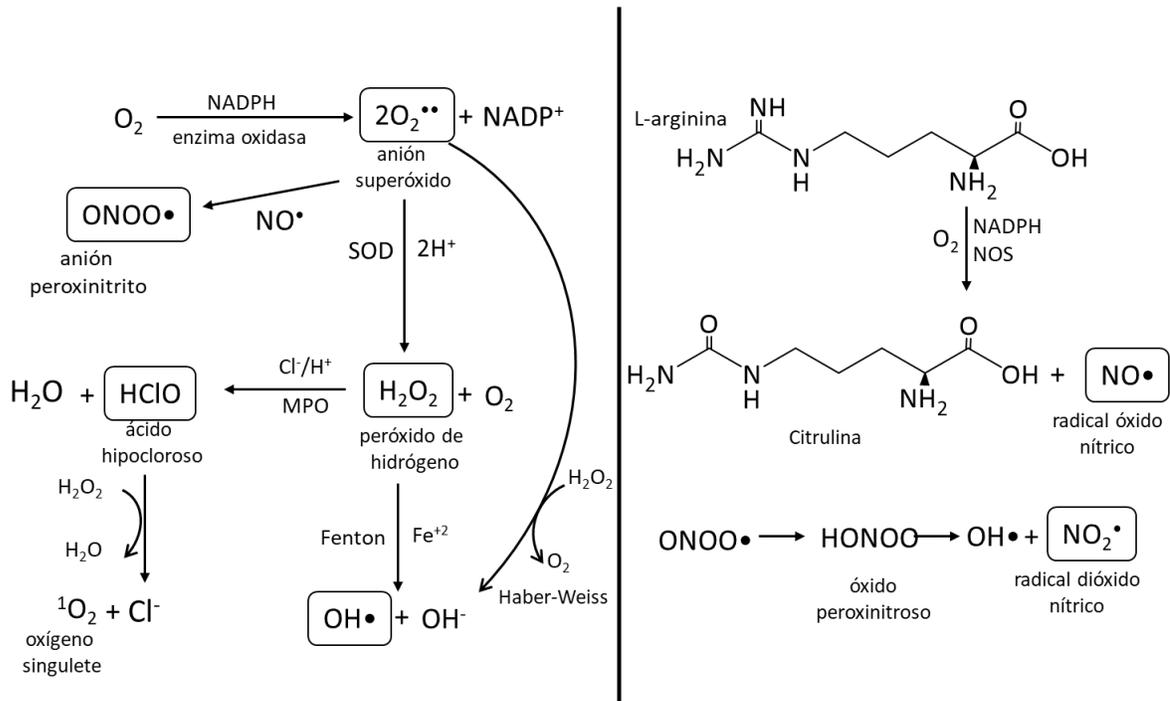


Figura 1. Formación de ERO y ERN (Modificado de: Moussa *et al.*, 2019).

2.2. La biotransformación hepática

El hígado es el órgano más grande del cuerpo y juega un papel crucial en la regulación de múltiples procesos fisiológicos, tales como la síntesis de proteínas y carbohidratos, síntesis de vitaminas y de almacenamiento, la formación y secreción de bilis (Domitrovic & Potocnjak, 2016), así como la biotransformación de xenobióticos (Jaeschke, 2013).

Los xenobióticos son compuestos ajenos al cuerpo que incluyen no sólo a fármacos, sino también a contaminantes ambientales, suplementos o aditivos alimentarios, pesticidas, toxinas producidas por hongos, plantas o animales, entre otros. Se estima que el hombre, a lo largo de su vida, se expone ante 1 a 3 millones de xenobióticos (Idle & González, 2007). Cada año, las

enfermedades hepáticas, particularmente la cirrosis, hepatitis viral y el hepatocarcinoma son la causa de la muerte de 2 millones de personas en todo el mundo (Asrani, *et al.*, 2018).

La mayoría de los xenobióticos son lipofílicos, lo cual facilita su absorción a través de las membranas intestinales, y aunque algunos xenobióticos pueden ser desechados sin sufrir cambios en su estructura, en la biotransformación hepática se tienen los mecanismos endógenos enzimáticos y/o reacciones de conjugación (Almazroo *et al.*, 2017) que incrementan su polaridad y los convierten en metabolitos intermediarios más hidrosolubles (Kang *et al.*, 2010) y así se facilita su excreción través de la orina, la bilis o las heces para evitar su acumulación en el cuerpo, aunque derivado del proceso, metabolitos más tóxicos, reactivos o carcinogénicos pueden ser producidos (Jaeschke, 2013).

2.2.1. Fases de la biotransformación hepática

El proceso de biotransformación hepática se desarrolla a través de dos etapas llamadas Fase I y Fase II. Las reacciones de la Fase I (reducción, hidrólisis, desmetilación y oxidación) son catalizadas por esterasas, amidasas y enzimas monooxigenasas que contienen flavina y de la familia del complejo citocromo P450 (CYP450) localizadas en el retículo endoplásmico liso de los hepatocitos (Bhaargavi *et al.*, 2014; Silverman *et al.*, 2014). El papel de CYP450 es el de unirse al xenobiótico y por medio de un flujo de electrones, la sustancia extraña se oxida y se forma agua. En este ciclo oxidativo, NADPH actúa como donador de electrones, mientras que CYP450-reductasa es el aceptor. Con el curso de la biotransformación, especies reactivas de oxígeno (ERO), como el radical superóxido ($O\bullet_2^-$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son liberadas, y las células del hígado se exponen al daño potencial del estrés oxidativo (Dancygier, 2010; Gwaltney-Brant, 2016). Las ERO inducen un incremento en la peroxidación lipídica, una reducción de adenosin trifosfato (ATP) y daño oxidativo del ácido desoxirribonucleico (ADN) y las proteínas (Fernando & Soysa, 2014).

Las reacciones de la fase II, catalizadas principalmente por transferasas, disminuyen la toxicidad del xenobiótico a través de la formación de metabolitos solubles en agua. Los grupos funcionales formados en la Fase I se unen a moléculas polares endógenas como el ácido glucurónico, glicina,

glutamina, glutatión, ácido acético y residuos de metilo a través de la acción de UDP-glucuronosiltransferasas, glicina-N-aciltransferasa, glutamina N-aciltransferasa, glutatión-S-transferasa, acetiltransferasa y metil-transferasa, respectivamente (Dancygier, 2010; Silverman *et al.*, 2014). En la biotransformación de los diterpenos, la introducción de grupos hidroxilo es catalizada por CYP450. En la fase I, las enzimas promueven la reducción, hidrólisis y epoxidación de sustratos terpenoides (Sultana & Saify, 2013); mientras que en la fase II, las enzimas sulfotransferasas, UDP-glucuronosiltransferasas, glicina N-aciltransferasa y metiltransferasa incrementan su peso molecular y polaridad (Bhatti & Kera, 2014).

2.3. Papel de las células hepáticas en la eliminación de xenobióticos

El lóbulo hepático se compone por hepatocitos y colangiocitos, como principales células epiteliales, así como por células sinusoidales conformadas por las células endoteliales, de Kupffer y estelares o de Ito (Kietzmann, 2017; Vernon & Kasi, 2019).

2.3.1. Células epiteliales

Hepatocitos

Los hepatocitos representan cerca del 80 % del volumen hepático y realizan la mayoría de las funciones. Estas células de larga vida se mantienen por la degradación de componentes celulares senescentes, como proteínas y organelos por medio de la autofagia (Czaja *et al.*, 2013). Además de la biotransformación, los hepatocitos participan en el metabolismo de carbohidratos, la regulación de glucosa, producción de proteínas del plasma, urea y bilis (Cattley & Cullen, 2013), con funciones específicas de acuerdo con la zona de su localización en el acino hepático (Figura 2) y el gradiente de oxígeno (Kietzmann, 2017).

Los hepatocitos de la zona 1 son los más cercanos a la región porta y muestran una mayor eficiencia en el metabolismo oxidativo, la ureagénesis desde aminoácidos, la gluconeogénesis, la excreción de bilirrubina y ácidos biliares, así como en la actividad antioxidante. Las enzimas del ciclo de Krebs (síntesis de urea y glutaminasas) se encuentran en grandes concentraciones en la zona 1. Estas células son las primeras en exponerse frente a los nutrientes, así como a los xenobióticos y no exhiben actividad de las enzimas del complejo CYP450 (Dancygier, 2010). En

cambio, los hepatocitos perivenosos (zona 2), reservan altos niveles de enzimas metabólicas, especialmente del grupo CYP450, que participan en la biotransformación de xenobióticos y sus metabolitos intermediarios (Dancygier, 2010; Gwaltney-Brant, 2016).

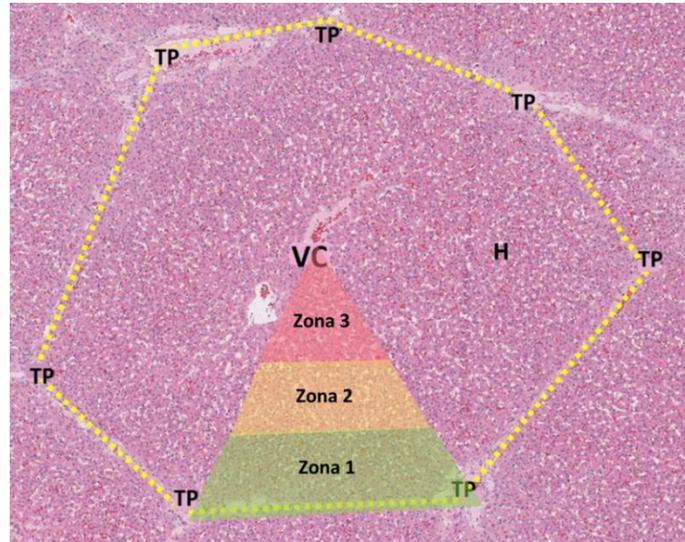


Figura 2. Micrografía de la organización del acino y las zonas de biotransformación (VC: vena central; TP: triada portal, H: Hepatocitos) Modificado de: Jennings & Premanandan, 2017.

Respecto a los hepatocitos de la zona 3 o región centrilobular son más eficientes en la glucólisis, lipogénesis, ureagénesis desde amoníaco y la biotransformación de xenobióticos relacionado con la alta concentración de CYP450 (Gwaltney-Brant, 2016). Las células de esta región reciben el suministro de oxígeno al último y son particularmente propensas al daño hepático hipóxico porque reciben una mayor concentración de sustancias tóxicas provenientes del metabolismo. También, tienen una reducida concentración de glutatión, lo que las hace susceptible a daño como necrosis centrilobular (Lefkowitz, 2011).

En la célula, los xenobióticos pueden ser metabolizados en diferentes compartimentos, como el citosol y la mitocondria; pero en la mayoría de los casos se degradan por enzimas localizadas en el retículo endoplásmico liso (Dancygier, 2010), y según la fuente del daño, la distribución de las lesiones puede variar: aquellas asociadas a la salmonelosis tienden a ser de naturaleza multifocal, mientras que las lesiones hepáticas de tipo viral como la fiebre amarilla se presentan en zonas medias (Stalker & Hayes, 2007).

Colangiocitos

Los colangiocitos son células alineadas a los conductos biliares y que participan en la modificación del volumen y la composición de la bilis. Se activan por estímulos endógenos y exógenos (Banales *et al.*, 2019). Se ha investigado que los colangiocitos pueden tener actividad metabólica sobre los xenobióticos debido que las células aisladas de rata presentan una alta actividad específica de Gamma glutamil traspeptidasa, hasta 200 veces más que en los hepatocitos, así como de enzimas relacionadas con el ciclo óxido-reducción de glutatión (GSH), como glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión oxidado (GSSG), pero bajos niveles de GSH, y carece de enzimas de la familia CYP450 (Visentin *et al.*, 2017).

2.3.2. Células sinusoidales

Las células sinusoidales representan cerca del 40% de las células del hígado. Se localizan en el compartimento sinusoidal del órgano en forma de paredes. Las células contienen pequeños poros o ventanas abiertas que permiten la transferencia de sustancias entre la sangre y el parénquima hepático. De este grupo, cuatro tipos de células son diferenciadas: las células endoteliales, las células de Kupffer, de Pit y las células estelares, también llamadas de Ito, lipocitos y perisinusoidales (Poisson *et al.*, 2017) (Figura 3).

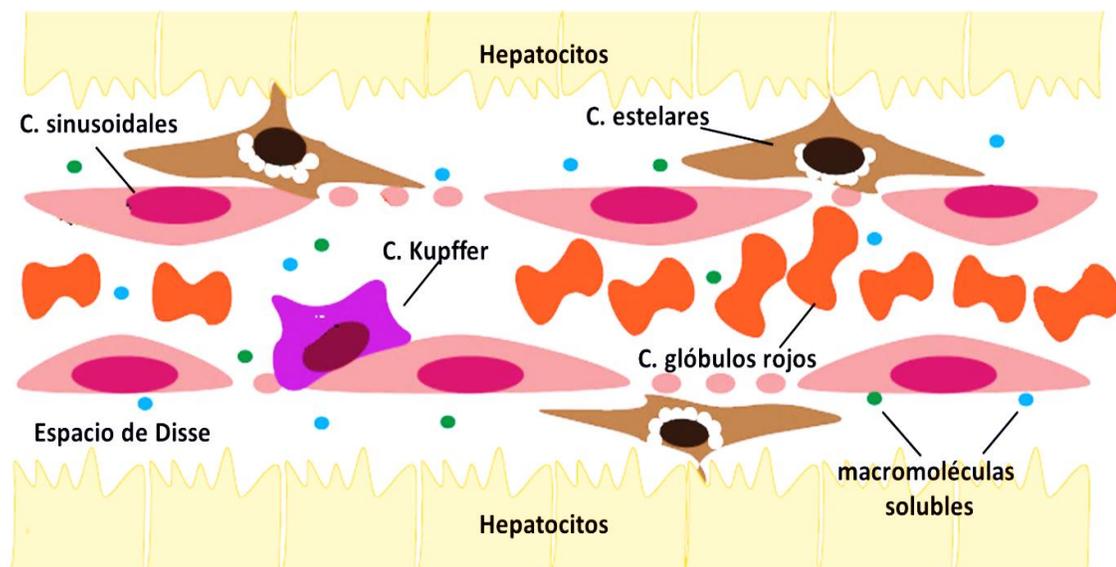


Figura 3. Principales Células Sinusoidales (Modificado de: Sørensen *et al.*, 2015).

Células endoteliales

Las células endoteliales representan entre el 15 y 20% de las células del hígado, pero sólo el 3% del volumen total. Son una línea continua de capilares o sinusoides, que forman una interfase entre las células sanguíneas por un extremo y los hepatocitos con las células estelares por el otro (Poisson *et al.*, 2017). Actúan como una barrera permeable contra agentes patógenos y sirven como filtro selectivo de retinol, colesterol y triglicéridos (Wohlleber & Knolle, 2016). Factores como la hipoxia, las endotoxinas y la radiación alteran el tamaño de los poros y pueden provocar la acumulación de triglicéridos, factor que prevalece en la esteatosis hepática; o bien, causar que las células se hinchen y pierdan su capacidad selectiva por la presencia del O_2^- o los bajos niveles de glutatión (Hammoutene & Rautou, 2019).

Entre otras funciones, las células endoteliales mantienen a las células estelares inactivas y bajo condiciones patológicas participan en la iniciación y progresión del daño crónico por medio de la capilarización, angiogénesis, señales angiócrinas y la vasoconstricción (Maslak *et al.*, 2015). Después de la inducción del daño agudo, las células endoteliales juegan un papel en la regeneración por medio del balance entre la proliferación vascular y de hepatocitos (Poisson *et al.*, 2017).

Las células de Kupffer

Son macrófagos que se anclan al revestimiento endotelial del sinusoides en áreas periportales (Kolios *et al.*, 2006). En condiciones normales, las células de Kupffer se encuentran en reposo o en desplazamiento hacia el espacio hepático para facilitar sus funciones de señalización (Roberts *et al.*, 2007). Se activan por bacterias, toxinas, virus, parásitos y células tumorales que en ausencia de enzimas del complejo CYP450 son removidas por medio de la endocitosis (Dancygier, 2010). Como resultado, se producen enzimas hidrolíticas, eicosanoides, citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- α), H_2O_2 y el radical óxido nítrico ($NO\bullet$) (Smedsrod *et al.*, 2009). Estos productos pueden actuar directamente sobre los hepatocitos (Lefkowitch, 2011) y activar a las células estelares, que conducen a la contracción de las sinusoides; promover los neutrófilos, que provocan daño a los hepatocitos a través de la liberación de proteasas (Kharbanda *et al.*, 2004); e incentivar la acción de las células endoteliales, que promueven la coagulación y deposición de

fibrina e hipoxia hepática; por lo que las células de Kupffer juegan un papel en la respuesta hepática ante agentes tóxicos (Roberts *et al.*, 2007), actuando como protectores y mediadores de daño oxidativo (Niranjan, 2010). Su inhibición protege al hígado contra la acción tóxica de agentes como la tioacetamida (Roberts *et al.*, 2007).

Células de Pit

Son células situadas en el lumen de la sinusoide hepática, adheridas a las células de Kupffer (Smedsrod *et al.*, 2009), en una relación de 1 célula de Pit por cada 10 de Kupffer. Se tratan de células de corta vida que se renuevan desde linfocitos granulares circulantes y con citotoxicidad espontánea contra hepatocitos infectados por tumores y virus. Aunque la función citotóxica es espontánea, esto puede aumentarse por la presencia de citoquinas como IL-2 que juega un papel central en la expansión, inducción y acción antitumoral de las células asesinas (Peng *et al.*, 2016).

Las células estelares

Son lipocitos o reservorios de grasa que se alinean en el espacio de Disse. Una porción de éstas se acerca a las células parenquimales, mientras que otras alcanzan a la región sinusoide, donde regulan el flujo sanguíneo (Li *et al.*, 2019). En el hígado sano, las células estelares son el principal sitio almacén de retinoides, dando una característica morfológica de gotas de grasa. Estas células contienen actina y miosina entre los hepatocitos y las células endoteliales, y cuando se dañan los hepatocitos por infección viral o toxinas hepáticas, las células estelares pierden su composición lipídica, proliferan y migran hacia la zona 3 del acino, cambian a miofibroblasto y producen colágeno y laminina (Hermenean *et al.*, 2017), mientras que el espacio de Disse puede alterarse por gelatinización (Lefkowitz, 2011). Durante la producción de la matriz extracelular, las células estelares generan una cicatriz temporal en el sitio de la lesión para proteger al hígado de daños posteriores. A su vez, secretan citoquinas y promotores de crecimiento para la regeneración de células epiteliales. En la enfermedad crónica, la activación repetida y prolongada de las células estelares causa fibrosis alterando tanto la estructura como la función del hígado (Yin *et al.*, 2013).

2.4. El daño hepático y sus mecanismos

El daño hepático es un término empleado para describir que la estructura o las funciones del hígado han sido afectadas (Vargas-Mendoza *et al.*, 2014) por diversos factores como son la hipoxia, el abuso en el consumo de fármacos, infecciones bacterianas, la exposición a virus (Gulati *et al.*, 2018), toxinas generadas por hongos o frutas, el alcohol, suplementes dietéticos, plantas, medicinas alternativas (Seeff & Fontana, 2011) y compuestos de origen químico industrial como N-nitrosodimentilamina (George *et al.*, 2019). Estos agentes pueden provocar daño a la membrana, depresión del sistema de defensa antioxidante, la actividad de ácido nítrico oxidasa, estrés oxidativo (Marchesini *et al.*, 2003), la infiltración de neutrófilos en el parénquima, la activación de células estelares y vías apoptóticas, la ruptura de los transportadores y proteínas de la membrana derivado de la peroxidación lipídica, necrosis masiva de hepatocitos (Gwaltney-Brant, 2016), así como inflamación y daño al órgano (Luo *et al.*, 2015; Gulati *et al.*, 2018).

El daño hepático es agudo cuando se descarta la preexistencia de alguna enfermedad hepática, y crónico, cuando se ha desarrollado y agravado a través del tiempo (Sarin & Choudhury, 2016). El daño hepático agudo ocurre por mecanismos que se clasifican en fisiopatológicos y/o inducidos por agentes químicos (Gulati *et al.*, 2018).

2.4.1. Mecanismos fisiopatológicos

El daño a las células se presenta a través de diversos patrones según los organelos y funciones afectadas: cuando las reacciones de detoxificación involucran a las enzimas del complejo CYP450 se forma un enlace covalente entre el agente tóxico y las proteínas intracelulares (Figura 4), la disfunción intracelular se produce y esto resulta en la pérdida de gradientes iónicos, un descenso en los niveles de ATP, la disrupción de actina, así como la hinchazón y ruptura de la célula. Los xenobióticos que afectan el transporte de proteínas en la membrana canicular pueden interrumpir el flujo biliar y producir colestasis (Dong *et al.*, 2019).

Los agentes xenobióticos suelen ser moléculas pequeñas que forman aductos con enzimas. Estos aductos, de mayor tamaño, son complejos que migran a la superficie del hepatocito donde pueden inducir la formación de anticuerpos o provocar respuestas de linfocitos T-citotóxicos (Sarin, 2016).

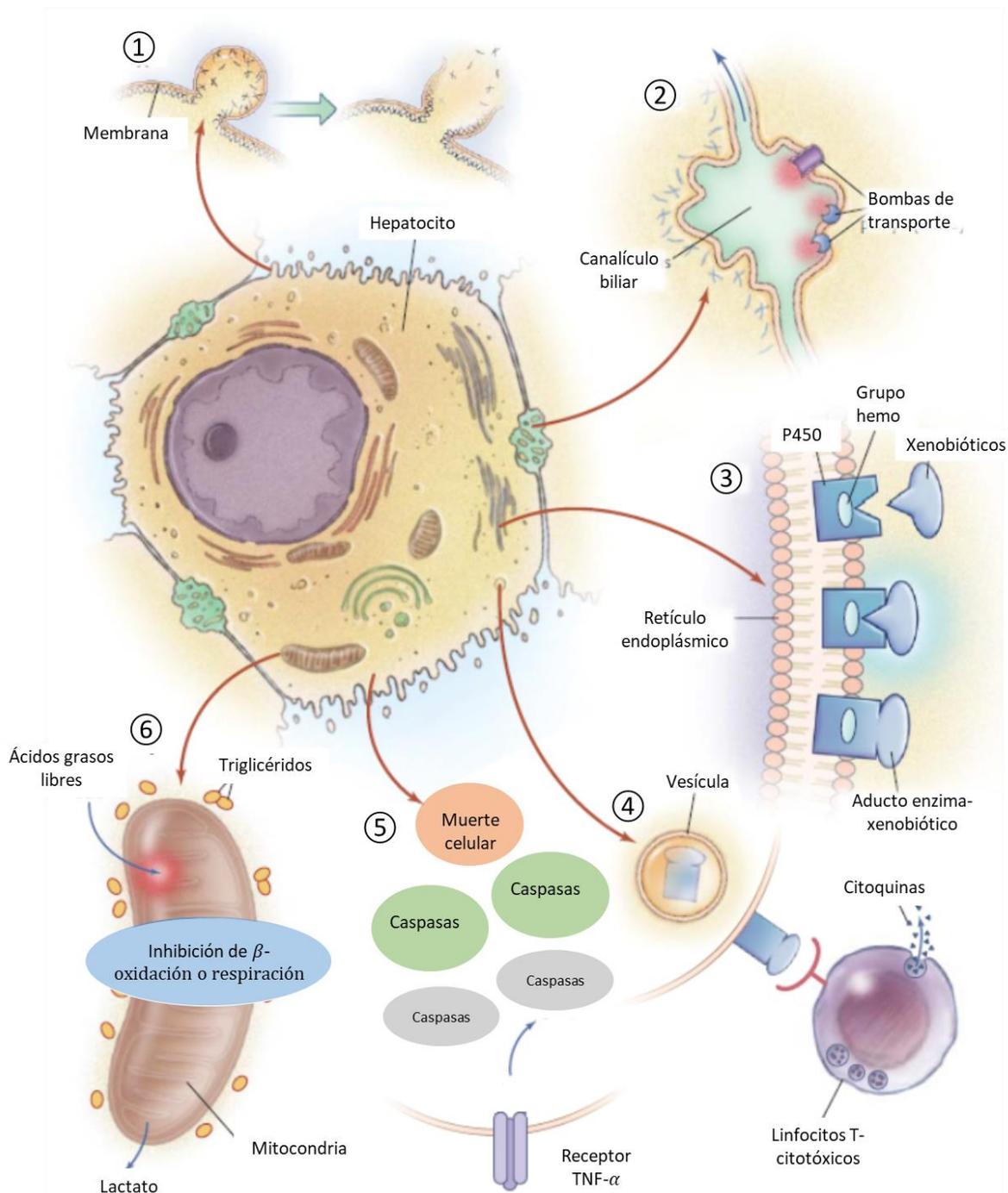


Figura 4. Mecanismos de daño fisiopatológicos (Modificado de: Lee, 2003).

① Disrupción mitocondrial; ② obstrucción biliar; ③ formación de aductos; ④ activación de células estelares y macrófagos por la vesícula extracelular ⑤ producción de mediadores inflamatorios y citoquinas, muerte por apoptosis o necrosis; ⑥ oxidación de ácidos grasos, acidosis láctica y acumulación de triglicéridos.

Otros mecanismos reportados son: la oxidación de ácidos grasos, el estrés oxidativo, acidosis láctica, acumulación de triglicéridos, apoptosis y necrosis (Fromenty, 2019). Ésta última se debe a la interrupción en las reservas de Ca^{+2} que incrementan el volumen nuclear e inhiben la actividad mitocondrial, principalmente la síntesis de NAD y FAD y por lo tanto se obtiene una menor producción de ATP (Hajovsky *et al.*, 2012).

Entre los mecanismos fisiopatológicos involucrados con la muerte celular se encuentran la apoptosis y la necrosis. La apoptosis es la muerte celular programada que actúa como un punto de regulación para los procesos biológicos, y que se activa por $\text{TNF-}\alpha$, el estrés oxidativo, la radiación, el daño de ADN o toxinas (Yuan & Kaplowitz, 2013). Por otra parte, la necrosis es un proceso degenerativo que se inicia con peroxidación lipídica, la alteración en la homeostasis de calcio, sodio y potasio y la inhibición de la síntesis de proteínas (Fayaz *et al.*, 2014), que causan la disrupción metabólica, disminución de ATP, hinchazón de la mitocondria, ruptura de la membrana plasmática (Kaczmarek *et al.*, 2013), dilatación del retículo endoplásmico, disgregación de polisomas, la acumulación de triglicéridos, que promueven una respuesta local inflamatoria y finalmente la muerte celular (Seeff & Fontana, 2011), a nivel local o masivo (Weng *et al.*, 2015).

2.4.2. Mecanismos inducidos por agentes químicos

Algunos agentes químicos como analgésicos, antibióticos, quimioterapias, aflatoxinas, tetracloruro de carbono (CCl_4), hidrocarburos clorados, tioacetamida, entre otros, pueden provocar desórdenes hepáticos principalmente por la inducción de la peroxidación y la generación de intermediarios altamente reactivos. A este nivel, la hepatotoxicidad puede ser idiosincrática o intrínseca (Kullak-Ublick *et al.*, 2017).

La hepatotoxicidad idiosincrática comprende reacciones que no son predecibles y no dependen de la dosis. La exposición suele ocurrir por descuido y el tiempo que pasa entre la administración y su respuesta puede variar de pocos días a meses (Bonkovsky *et al.*, 2017). La mayor incidencia es por medicamentos que interactúan con el ambiente, el huésped, aspectos genéticos, la edad, sexo, factores autoinmunes y enfermedades preexistentes (Yuan & Kaplowitz, 2013). Su

respuesta generada depende de la concentración, la expresión de enzimas, así como del gradiente de concentración de la sustancia en la sangre que llega al acino (Gulati *et al.*, 2018).

Los fármacos se han convertido en la principal causa de daño hepático agudo y de trasplante en los países occidentales (Kullak-Ublick *et al.*, 2017), debido a que son la causa del 40 al 50% de los casos de insuficiencia hepática aguda (Morales *et al.*, 2016), y se estima que, a los 6 meses del inicio del cuadro clínico, 1 de cada 10 pacientes muere o requiere de trasplante, y 1 de cada 5 desarrolla enfermedad hepática crónica (Fontana *et al.*, 2014).

El daño ocurre por conversión de los fármacos a metabolitos que reaccionan con macromoléculas celulares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, conduciendo a la disfunción proteica, la peroxidación lipídica, daño al ADN y el estrés oxidativo (Bedi *et al.*, 2016). Estos efectos se traducen en daño a los ductos biliares, caracterizado por la destrucción del epitelio biliar o los ductos interlobulARES; la colangitis biliar primaria, que involucra tanto inflamación como necrosis a expensa de los colangiocitos y la cirrosis (Visentin *et al.*, 2017). Otras patologías derivadas del daño hepático idiosincrático comprenden a la esteatosis hepática no alcohólica, hepatitis y cáncer, entre otros (Domitrovic & Potocnjak, 2016).

Las reacciones idiosincráticas se manifiestan como daño hepatocelular, colestasis o una mezcla de ambos (Yuan & Kaplowitz, 2013). El daño hepatocelular se define como 2 veces mayor al valor normal de la transaminasa ALT y una relación ALT/FAL mayor a 5; la colestasis se caracteriza por una elevación de fosfatasa alcalina 2 veces mayor del límite superior normal o bien una relación menor o igual a 2 entre ALT/ FAL; mientras que el patrón mixto corresponde cuando el valor de ALT es 2 veces mayor o bien la relación ALT/AST es entre 2 y 5 (Bhamidimarri & Schiff, 2013), donde la prevalencia es de 40-48%, 20-40% y 12-20% para los daños hepatocelular, colestásico y mixto, respectivamente, donde la presentación colestásica presenta el mayor riesgo de enfermedad hepática crónica (Danan & Benichou, 2014).

Por otra parte, la hepatotoxicidad directa o intrínseca se debe a reacciones predecibles que ocurren cuando el organismo se expone a la toxina por cortos periodos de tiempo y que son utilizados como modelos preclínicos para comprender los mecanismos de hepatotoxicidad y así establecer estrategias que lleven a su prevención (Gulati *et al.*, 2018).

Estos modelos, *in vivo* o *in vitro*, miden la eficacia, seguridad (Gulati *et al.*, 2018), así como la habilidad del extracto, compuesto o grupo de compuestos para prevenir la toxicidad del hígado en condiciones controladas (Surendran *et al.*, 2011). En los modelos *in vitro*, los cultivos con hepatocitos son preparados y tratados con la hepatoxina, y parámetros como multiplicación de hepatocitos, morfología, síntesis macromolecular y el consumo de oxígeno son medidos como indicadores de daño (Pradeep *et al.*, 2009). En los modelos *in vivo*, a los animales de estudio se les induce un daño hepático a través de la administración de una dosis o dosis continuas de una hepatoxina conocida. La sustancia de prueba se administra durante, antes o después del agente tóxico. La intensidad y recuperación del daño son evaluadas por cambios histopatológicos y bioquímicos, con un alto nivel de correlación con lo que ocurre en el hígado de los humanos. Como ejemplos de xenobióticos se usan la tioacetamida, la acrilamida, el etanol, paracetamol y el CCl₄, entre otros (Delgado-Montemayor *et al.*, 2015).

Tioacetamida (TAA)

La tioacetamida es un compuesto organosulfurado usado como fungicida, en la industria textil, del cuero y papelería. En ensayos preclínicos, la TAA es conocida como un potente hepatotóxico (Gayosso de Lucio *et al.*, 2014) usado como un modelo adecuado para estudiar a los fármacos con potencial hepatoprotector en un corto periodo de tiempo (Arauz *et al.*, 2015). El daño producido por TAA es más prominente que el efecto provocado por otros agentes, como el CCl₄, y debido a que la fibrosis persiste por varias semanas después de la discontinuación de TAA, este modelo permite evaluar el efecto de los fármacos, extractos o principios activos para revertir la fibrosis (Newell *et al.*, 2008). Otra ventaja del uso de TAA como hepatotóxico incluye su afinidad por el hígado, excepto en dosis excesivamente altas, que pueden causar daño renal (Mahendale & Chilakapati, 2010).

La hepatotoxicidad de TAA afecta selectivamente el acino perivenoso donde es oxidado por enzimas del sistema FAD- monooxigenasa, y así la zona perivenosa sufre el proceso necrótico (Sanz *et al.*, 2002) que se atribuye a su metabolito intermediario, la tioacetamida disulfóxido (TASO₂) (Figura 5), que se une a macromoléculas en la célula (Hajovsky *et al.*, 2012) derivado de la acción de enzimas CYP1 y FAD microsomales, mientras que los radicales libres se unen a

lípidos, ADN y proteínas para formar aductos de N-ε-acetil lisina a través de enlaces covalentes (Mahendale & Chilakapati, 2010).

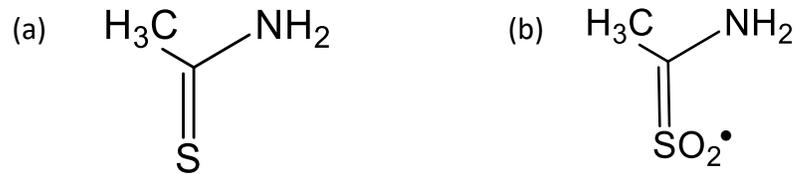


Figura 5. Estructura química de tioacetamida (a) y tioacetamida disulfóxido (b).

Durante la biotransformación de la tioacetamida, los radicales libres liberados producen peroxidación lipídica y daño a la membrana, que conlleva a una necrosis centrilobular severa (Figura 6), que puede recuperarse en dosis agudas, o bien progresa a fibrosis, cirrosis y carcinoma hepatocelular en fases crónicas. Cuando los efectos nocivos exceden la capacidad regenerativa, el fallo hepático, respiratorio y la muerte son las consecuencias (Wallace *et al.*, 2015).

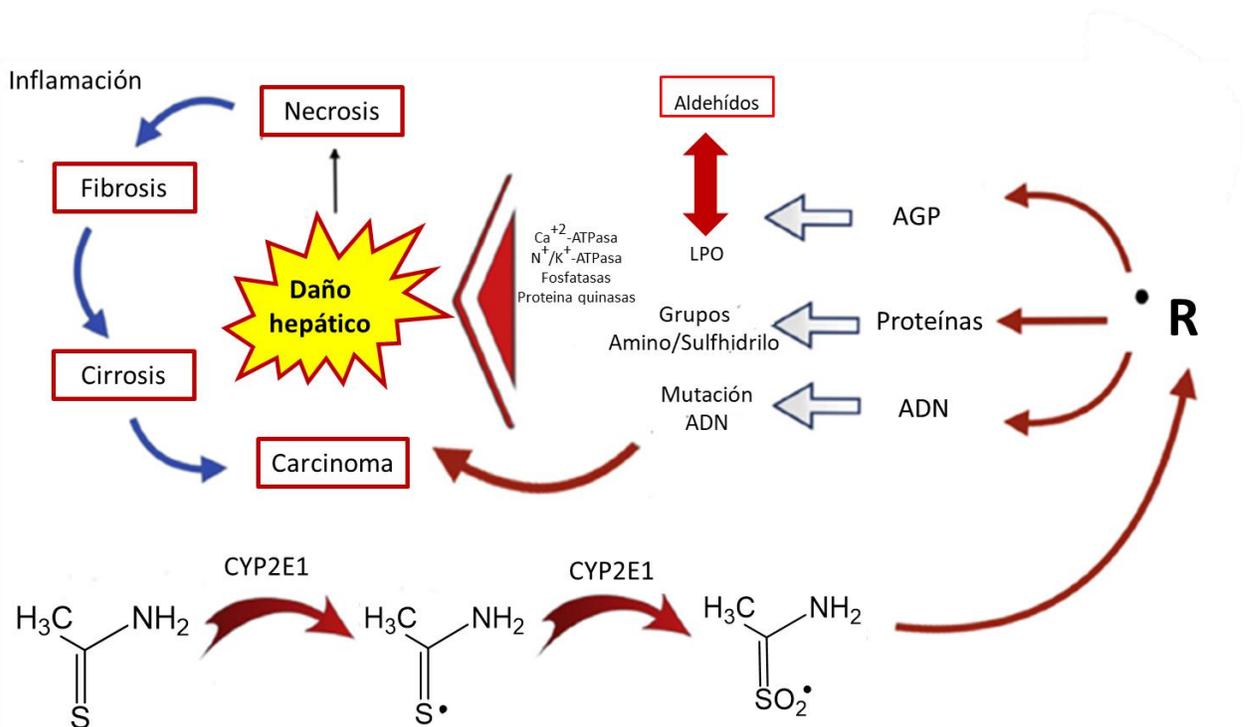


Figura 6. Mecanismo de daño hepático producido por TAA, donde AGP: ácidos grasos poliinsaturados LPO: lipoperoxidación (Modificado de: Muriel *et al.*, 2017).

Una dosis de 300 mg/kg de TAA es suficiente para causar estrés oxidativo (Abdel Salam *et al.*, 2013). En un máximo de 24 horas después de la administración el 90% del TAA ha sido metabolizada (Mahendale & Chilakapati, 2010), y los radicales libres generados producen la muerte de los hepatocitos tanto de la zona 1 como de la zona 3 por una necrosis hepatocelular, principalmente periportal (Bautista *et al.*, 2010; Hajovsky *et al.*, 2012).

Los radicales libres activan tanto a los neutrófilos como a la MPO que inciden sobre el parénquima hepático (Amanzada *et al.*, 2011), incrementan la concentración intracelular de Ca^{+2} , obstruyen la actividad mitocondrial (Starkel and Leclercq, 2011), fragmentan el retículo endoplásmico rugoso, desorganizan y dispersan ribosomas, deprecian los niveles de glucógeno, reducen el número de hepatocitos, la tasa de consumo de oxígeno y el volumen de la bilis (Singh *et al.*, 2011) con la subsecuente regeneración (Tasci *et al.*, 2008).

Cuando la dosis letal media (600 mg/ kg) es administrada a ratas, la muerte ocurre de 3.5 a 7 días debido a la falla hepática fulminante (Chanda & Mahendale, 1994). La exposición prolongada a TAA provoca la formación de nódulos hiperplásticos, colangiocarcinoma, hepatocarcinoma y cirrosis (Newell *et al.*, 2008; Starkel and Leclercq, 2011) o bien se genera la señalación que conduce a la apoptosis (Miguel *et al.*, 2017). La cirrosis inducida por TAA ha sido un modelo experimenta de enfermedad comparable con la etiología y patología en humanos (Yeh *et al.*, 2003).

Los marcadores necróticos, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y $NF\kappa\beta$ pueden ser medidos en el homogenado hepático una hora después de la inyección de la TAA (Chen *et al.*, 2008). Las enzimas hepáticas, triglicéridos, colesterol y niveles de malonaldehído muestran su pico máximo; mientras que albúmina y GSH su valor mínimo alrededor de las 24 h (Mustafa *et al.*, 2013). La inflamación y necrosis del tejido hepático se observan después de una semana (Luo *et al.*, 2015; Wallace *et al.*, 2015). En la hepatotoxicidad directa o intrínseca, los xenobióticos activan a las células de Kupffer presentes en las sinusoides hepáticas, resultado en una liberación de mediadores proinflamatorios: citoquinas, eicosanoides y enzimas proteolíticas, que junto con los radicales libres provocan daño mitocondrial y celular.

La Figura 7 muestra el ingreso de los agentes xenobióticos a través del intestino y la exposición de los hepatocitos, con la acción de los patrones moleculares asociados al daño (PMAD) (1). Las células estelares son activadas por las células de Kupffer que producen óxido nítrico y prostaglandinas y contribuyen tanto a la disfunción microcirculatoria como al incremento de la presión portal (2). Se incrementa la producción de citoquinas inflamatorias y radicales derivados del óxido nítrico (3). La liberación de óxido nítrico provoca la muerte de los hepatocitos via apoptosis o necrosis (4). Las células dendríticas participan en la regulación del sistema inmune (5). La infiltración de neutrófilos conduce a la liberación de ERO que junto con las citoquinas (6) provocan estrés mitocondrial (7), así como la muerte de los hepatocitos por apoptosis o necrosis (8) (Sarin & Choudhury, 2016).

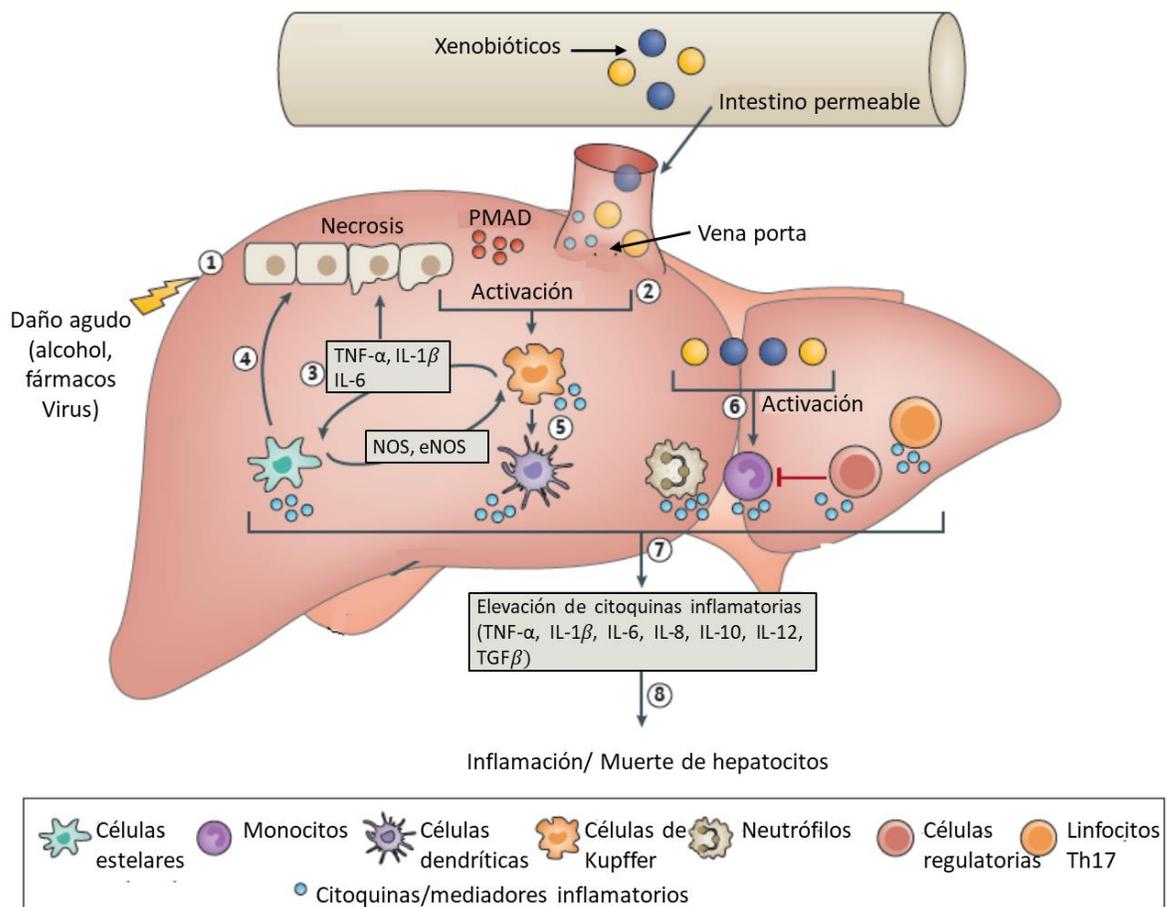


Figura 7. Mecanismo general de daño hepático agudo producido por xenobióticos (Modificado de: Sarín & Choudhury, 2016).

2.5. Mecanismos endógenos de defensa antioxidante

La oxidación es una reacción química que consiste en la transferencia de electrones desde una sustancia hacia un agente oxidante. Estas reacciones producen radicales libres que inician reacciones que dañan a las células. Entonces, un antioxidante es una sustancia que aun en bajas concentraciones reduce o previene significativamente la oxidación de sustratos oxidables a través de la captación de radicales libres intermediarios, inhibiendo las reacciones de oxidación al ser oxidados ellos mismos (Abdalaziz *et al.*, 2016), impidiendo la peroxidación lipídica, removiendo iones metálicos pro-oxidantes, como bloqueadores de $O\bullet$, quelantes de metales, captadores de radicales, estabilizando a los antioxidantes primarios (captadores de radicales) por medio de la creación de ambientes ácidos, regenerando antioxidantes por la donación de hidrógenos o catalizando la síntesis o regeneración de antioxidantes no enzimáticos (Ahmadinejad *et al.*, 2017).

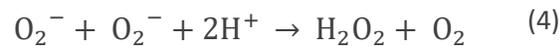
Los antioxidantes pueden ser endógenos o bien obtenidos a través de la dieta. Los primeros juegan un papel importante en mantener las funciones celulares; sin embargo, su participación suele ser insuficiente ante el estrés oxidativo/nitrosativo (Kurutas, 2016; Thangaraj, 2016).

Los antioxidantes endógenos se clasifican en enzimáticos y no enzimáticos. En el primer grupo superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (Cat) constituyen la principal defensa enzimática de las células aerobias (Czaja, 2016), que dan protección por medio de la captación del radical O_2^- y el H_2O_2 , convirtiéndolos en especies menos reactivas.

Los antioxidantes enzimáticos convierten productos oxidados en H_2O_2 y H_2O con la intervención de cofactores como hierro, cobre, zinc y manganeso (Lee, 2018). En esta clasificación también puede considerarse a la enzima glutatión reductasa (GR) que, aunque no participa como antioxidante, contribuye al reabastecimiento de GSH a partir de GSSG, mientras que en el grupo de antioxidantes no enzimáticos interceptan y terminan las cadenas de radicales libres (Moussa *et al.*, 2019). Estos incluyen a glutatión (GSH), tioredoxina, ácido lipoico y melatonina (Ahmadinejad *et al.*, 2017).

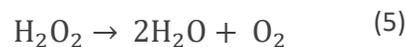
2.5.1. Superóxido dismutasa (SOD)

SOD es una enzima que está presente en el citoplasma, la mitocondria celular, así como afuera de la célula. La molécula de SOD en el citoplasma y espacio extracelular contienen átomos de cobre y zinc, mientras que SOD mitocondrial contiene manganeso. SOD es uno de los antioxidantes que captan el anión O_2^- para convertirlo en O_2 y H_2O_2 . Aunque el H_2O_2 no es radical, éste rápidamente se convierte en el radical $OH\bullet$, que es muy reactivo, por acción de Cat o GPx (Kurutas, 2016). La reacción de dismutación por SOD se indica en la reacción 4.



2.5.2. Catalasa (Cat)

Cat es una enzima localizada principalmente en los peroxisomas celulares y consiste en 4 subunidades, cada una contiene un grupo hemo y una molécula de NADPH (Senoner *et al.*, 2018). Es una enzima muy eficiente en convertir el H_2O_2 en H_2O y O_2 antes de que se difunda a otras partes de la célula. Una molécula de Cat puede convertir aproximadamente 6 millones de moléculas de H_2O_2 por minuto (Kurutas, 2016) (reacción 5), y aunque Cat puede encontrarse en todos los tejidos, la mayor actividad se presenta en el hígado y los eritrocitos (Sies, 2015).



La actividad de Cat es uno de los biomarcadores de estrés oxidativo más importantes (Bhooshan & Ibrahim, 2010) porque mitiga la acción dañina de los radicales libres contra la célula. Un déficit o mala función de catalasa se relaciona con el desarrollo de diversas enfermedades degenerativas como la diabetes mellitus, hipertensión, el vitíligo, parkinson, cáncer, alzheimer y fibrosis hepática (Nandi *et al.*, 2019).

2.5.3. Glutación (GSH)

Es un tripéptido localizado en el citosol, núcleo y mitocondria, que está conformado por glicina, ácido glutámico y cisteína. Junto a SOD, GSH es la primera línea de defensa contra el daño por radicales libres (Ighodaro & Akinloye, 2018). Su función antioxidante es la de prevenir la oxidación de ácidos grasos insaturados al catalizar la conversión de H_2O_2 en H_2O o alcohol con la oxidación simultánea de GSH (Molavian *et al.*, 2015) para rendir glutación oxidado GSSG. Este último se acumula en el interior de la célula y la relación GSH/GSSG es un indicador del estrés oxidativo (Gulati *et al.*, 2018). En otras palabras, los niveles de GSH en la célula reflejan la síntesis, metabolismo y movimiento de la proteína. La síntesis de GSH se modula por el radical NO, provocando la reducción de la detoxificación y menor actividad de las enzimas responsables de la respiración (Baskol *et al.*, 2015).

En la célula GSH actúa como cofactor de enzimas de detoxificación, participa como un transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática, capta los radicales $OH\bullet$ y $O_2\bullet$ (Birk *et al.*, 2013), asociada a la presencia de un átomo de azufre, que fácilmente se adapta a la pérdida de un electrón (Sheng *et al.*, 2014), además de participar en la eliminación de moléculas lipofílicas y metales pesados con el fin de reducir su toxicidad (Jiang *et al.*, 2019).

El metabolismo de GSH es uno de los más importantes mecanismos de defensa antioxidante en la célula, y sus niveles son importantes en la prevención del daño hepático por sustancias tóxicas. El descenso en la concentración de GSH puede estar asociada con el envejecimiento y muchas patologías como la artritis reumatoide, las enfermedades hepáticas, respiratorias y cardiovasculares (Ighodaro & Akinloye, 2018).

2.5.4. Glutación peroxidasa (GPx)

GPx es una enzima localizada en el citosol y la mitocondria, y que se encarga de catalizar la oxidación de GSH con la reducción de un hidroperóxido, como H_2O_2 , en H_2O . En general, existen dos formas de GPx: una dependiente de selenio y otra independiente de él (GSH-S-transferasa). Las enzimas dependientes de selenio reducen peróxidos para formar selenoles (Se-OH) mediante la reacción de Fenton, trabajando en coordinación con GSH, pero en competencia con Cat por el

H₂O₂ para contribuir en la reducción del estrés oxidativo/nitrosativo (Molavian *et al.*, 2015). Glutación en su forma oxidada (GSSG) es reciclado a su estado reducido por medio de GR y NADPH. Así que la acción de esta enzima es acoplada al mecanismo reductor de GR (Su *et al.*, 2019), mientras que glutación-S-transferasa (GST) es una enzima detoxificante distribubuida uniformemente en el acino hepático, que metaboliza los xenobióticos por conjugación con GSH, protegiendo a la célula (Schemitt *et al.*, 2016). Sin embargo, la falta de paralelismo entre la actividad de GST y el daño por TAA indican que GST

Durante el control del estrés oxidativo, el incremento en la actividad de GPx representa la habilidad para compensar la peroxidación lipídica desarrollada (Senoner *et al.*, 2018).

2.5.5. Glutación reductasa (GR)

La enzima glutación reductasa que genera GSH desde GSSG con nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) es una fuente de hidrógeno. GR juega un papel muy importante al mantener a GSH en concentraciones normales mediante la reducción de su forma oxidada (GSSG) e impidiendo su difusión hacia el exterior de la célula (Couto *et al.*, 2016).

2.5.6. Factor nuclear 2 relacionado al factor eritroide 2 (Nrf2)

Nrf2 es un factor de transcripción que constituye uno de los mayores mecanismos contra el estrés oxidativo (Chambel *et al.*, 2015). Un factor de transcripción es el primer regulador de la expresión de genes y se conforma de proteínas que pueden unirse a secuencias de ADN específicas (Mitsis *et al.*, 2020). Nrf2 se encuentra en el citoplasma unido a la proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch (Keap 1), y es liberado desde esta proteína como respuesta al incremento de ERO (Richter *et al.*, 2015). Después de su traslocación hacia el núcleo y su unión a otras proteínas intranucleares (fibrosarcoma musculoaponeurótico) promueve la expresión de los elementos de respuesta antioxidante (AREs) en genes que codifican enzimas citoprotectoras (Raghunath *et al.*, 2018).

2.6. Evaluación del daño hepático

Existen diferentes pruebas o marcadores usados para diagnosticar la hepatotoxicidad, establecer el grado de nocividad y diferenciar entre un daño agudo y uno crónico. La mayoría de ellos son

perfiles del suero sanguíneo (Gulati *et al.*, 2018) y aunque no existe un biomarcador específico que describa el daño hepático, la mayoría de los diagnósticos se basan en diversos parámetros que incluyen la medición de bilirrubina total, albúmina sérica y nivel de proteínas, amoniaco sérico, colesterol, parámetros de coagulación y concentraciones de urobilinógeno en la orina (Yang *et al.*, 2014). En general, la actividad de las enzimas del suero y los niveles de bilirrubina son los parámetros más confiables para determinar el daño hepático (Everhart & Wright, 2013).

2.6.1. Alanina aminotransferasa (ALT)

Conocida anteriormente como transaminasa glutámico-pirúvica. Es el biomarcador más utilizado en la salud del hígado (Sumanth *et al.*, 2017). Como su nombre lo indica, ALT está involucrada en la transaminación de alanina, y está presente en hígado en mayores concentraciones que en otros órganos. La liberación de ALT desde los hepatocitos hacia la sangre ocurre como consecuencia de un daño hepático, aunque no es una enzima específica (Contreras-Zentella & Hernández-Muñoz, 2016). El daño al músculo cardiaco o esquelético, así como algunas drogas pueden incrementar la expresión genética de ALT (Yang *et al.*, 2014). Los valores normales oscilan 49 U/L a 37 °C y cuando éstos se elevan de 10 a 200 veces indican colestasis, mientras que 10 veces abajo se correlaciona con carcinoma, cirrosis y hepatitis alcohólica (Rajesh *et al.*, 2014).

Las pruebas para distinguir entre las dos isoformas de ALT, ALT1 y ALT2, contribuyen a diferenciar un daño hepático de un extrahepático (Raffer *et al.*, 2012).

2.6.2. Aspartato aminotransferasa (AST)

Conocida anteriormente como transaminasa glutámica oxaloacética. Es una enzima que se libera desde el hígado, corazón, músculo y células cerebrales cuando estos son dañados (Rajesh *et al.*, 2014). Se considera un biomarcador menos específico que ALT, debido a su expresión en otros tejidos (Yang, 2014). Su valor normal es de 45 U/L a 37 °C, pero puede incrementar de 10 a 200 veces en pacientes con necrosis, hepatitis viral o por toxicidad con CCl₄, mientras que menos de 10 veces para esteatosis hepática y alcohólica (Plaa, 2010). Algunos estudios emplean la relación AST/ALT para determinar la fuente del daño, donde una relación 2:1 confirma el fallo del hígado.

En cambio, cuando la relación es menor a 0.4 después de la hepatotoxicidad, podría indicar un buen pronóstico de recuperación (McGovern *et al.*, 2015).

De acuerdo con el tipo de daño (hepatocelular, colestásico o mixto), los cocientes de transaminasas reflejan la probabilidad de que el daño se deba a la medicación, siendo ≥ 9 altamente probable y de 0 descartable, donde los altos niveles séricos de FAL, GGT, BIL y colesterol son indicadores de daño colestático (Bonkovsky *et al.*, 2017).

2.6.3. Fosfatasa alcalina (FAL)

Es otra enzima frecuentemente utilizada para evaluar la funcionalidad del hígado. Sus valores normales van de 25 a 85 U/dl. Sus niveles elevados se relacionan con la obstrucción del flujo biliar, el daño hepático o ciertos tipos de cáncer (Swaroop & Gowda, 2012). Cuando los niveles se exceden de 3 a 10 veces indican obstrucción biliar y la aparición de enfermedades parenquimales, como la hepatitis y la cirrosis (Plaa, 2010). Debido a que no existen muchas isoenzimas de FAL de otros órganos o tejidos, FAL no es considerado como un biomarcador específico de colestasis. El diagnóstico se realiza en conjunto con otros biomarcadores (Yang *et al.*, 2014).

2.6.4. Gamma glutamil transpeptidasa (GGT)

GGT es una enzima no específica cuya actividad puede incrementar con el daño hepático y muscular debido al consumo de grandes cantidades de alcohol (Yang *et al.*, 2014). En las enfermedades hepáticas, GGT junto FAL, es un marcador de colestasis, que es el bloqueo del tránsito de la bilis desde las células hepáticas hasta el intestino (Moreira & Garrido, 2015), y también se relaciona ampliamente con el riesgo de múltiples enfermedades como el síndrome metabólico (Koenig & Seneff, 2015).

2.6.5. Lactato deshidrogenasa (LDH)

Lactato deshidrogenasa es una enzima localizada en el citoplasma celular. Cataliza la interconversión de lactato y piruvato (Donfack *et al.*, 2010). Su liberación se puede interpretar como el daño a la membrana celular, así que, cuando los tejidos que contienen LDH son dañados, estas enzimas se liberan al torrente sanguíneo, por lo que los niveles de este parámetro se

incrementan en las enfermedades hepáticas, ataque cardíaco, ciertos tipos de anemia, fractura y daños musculares (Bigoniya *et al.*, 2009).

2.6.6. Bilirrubina (BIL)

La estimación de los niveles de bilirrubina es uno de los mejores ensayos para evaluar la función hepática. La capacidad del hígado para procesar la bilirrubina es muy grande, así que un daño sustancial puede ocurrir antes de que sea evidente (Yang *et al.*, 2014). Sin embargo, el daño hepatocelular causa que disminuya la capacidad del hígado para conjugarse la bilirrubina, alterando así su excreción y provocando un aumento de la bilirrubina total (la suma de la bilirrubina no conjugada de las fuentes hepáticas y no hepáticas). Cuando los niveles de bilirrubina se elevan, el hígado pierde al menos el 50 % de su capacidad de excreción; por lo tanto, la presencia de bilirrubinemia conjugada o directa habitualmente es un signo de enfermedad hepática (Braunwald *et al.*, 2009). La bilirrubina no conjugada está herméticamente unida a la albúmina, por lo que bajo condiciones normales es retenida en el glomérulo renal y no pasa a la orina. Así que la presencia de bilirrubina en orina es un indicador de daño hepático, como en la hepatitis viral (Gao *et al.*, 2012).

Debido a que una sola prueba no provee suficiente información para establecer la severidad del daño hepático, una combinación de pruebas como bilirrubina en suero, albúmina, aminotransferasas y FAL son recomendadas. La elevación de ALT y bilirrubina indican un daño hepático serio a diferencia de medir los parámetros por separado (Gwaltney-Brant, 2016). Estas pruebas, junto con la protrombina, aportan una caracterización inicial de la etiología o severidad del daño hepático (Herlong & Mitchell, 2012).

2.6.7. Proteínas totales y albúmina

El contenido de proteína y albúmina en suero bajo condiciones normales son de 5.5 a 8 g/dl y 3.5 a 5 g/dl, respectivamente. La albúmina es la proteína más abundante del plasma y es sintetizada exclusivamente en el hígado, inicialmente como pre-proalbúmina, luego proalbúmina y finalmente se convierte en albúmina en el aparato de Golgi, para ser secretada por los hepatocitos

(Gounden *et al.*, 2020) hacia el flujo sanguíneo, y solo una pequeña parte que queda en el hígado (Noman *et al.*, 2020).

Fisiológicamente, la albúmina actúa como depósito-transportador de compuestos tanto endógenos como exógenos, y mantiene el balance ácido-base del plasma (Levitt & Levitt, 2016). Su capacidad para unirse a radicales libres y removerlos rápidamente de la circulación, favorece a la conservación del equilibrio óxido-reducción (Gounden *et al.*, 2020). Bajo condiciones de daño, la hipoalbuminemia reduce los sitios de enlace disponibles para el transporte de xenobióticos, y como resultado se incrementa la presencia de radicales y al daño (Noman *et al.*, 2020), en concentraciones menores a 2.5 g/dL. Por otra parte, la hiperglobulinemia, o incremento en la concentración de albúmina, puede ser un indicador de inflamación crónica, cirrosis y hepatitis (Gulati *et al.*, 2018).

Otros factores afectan su producción son la expresión de mediadores proinflamatorios como las interleucinas y TNF- α .

2.6.8. Peroxidación lipídica

Debido su alto contenido en ácidos grasos, las membranas de los organelos y la célula son susceptibles al ataque de especies reactivas al oxígeno, a través de la peroxidación (Que *et al.*, 2018). La peroxidación lipídica o lipoperoxidación es el proceso en el que los radicales libres secuestran a los hidrógenos de los ácidos grasos polinsaturados graso para generar un radical libre que interacciona con el oxígeno molecular para formar al radical peroxilo, luego al hidroperóxido y así perpetuar una reacción en cadena (Schemitt *et al.*, 2016); o bien los hidroperóxidos se disocian a otros radicales como aldehídos para atacar otros componentes (Moussa *et al.*, 2019), como proteínas y ADN de los hepatocitos, las biomembranas celulares que junto con los ácidos grasos (Arauz *et al.*, 2016; Luczaj *et al.*, 2017), y que culmina con la formación de productos como los aldehídos β -insaturados, 4-hidroxi-2-nonenal, 2-propenal (acroleína), isoprostanos y principalmente el malonaldehido son usados como marcadores del estrés y daño oxidativo/nitrosativo (Ighodaro & Akinloye, 2018).

En comparación con los radicales libres, los aldehídos no alcanzan concentraciones tóxicas debido a que reaccionan típicamente con grupos amino y sulfhidrilo apenas son producidos y difundidos hacia puntos lejanos de su sitio original. Sin embargo, algunos de ellos pueden mostrar reactividad hacia las biomoléculas celulares y contribuir en el desarrollo de la enfermedad (Nandi *et al.*, 2019). La lipoperoxidación presenta efectos nocivos sobre la integridad de las membranas, como son la alteración del grado de fluidez, la inactivación de enzimas o los receptores unidos a ella, el incremento de los niveles de Ca^{+2} intracelular que destruyen las estructuras citoesqueléticas, la activación de enzimas catabólicas como endonucleasas, proteasas y fosfolipasas, la pérdida de la permeabilidad y finalmente la muerte celular via apoptosis o necrosis, por su capacidad para generar compuestos altamente reactivos (Muriel *et al.*, 2017).

2.6.9. La función hepatoprotectora

La Organización Mundial de la Salud define a la Medicina Complementaria y Alternativa como a todas las formas de atención médica que usualmente se realizan fuera del Sector Salud, y entre sus disciplinas existe la medicina tradicional (British Medical Association, 1993), que se considera como la suma de conocimientos, técnicas y prácticas fundamentadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas para mantener la salud, tanto física como mental (INNSZ, 2017). Dentro de estas prácticas se comprenden a productos con un ingrediente activo obtenido de las partes aéreas o subterráneas de las plantas o su combinación. Estos materiales incluyen gomas, ácidos grasos, aceites esenciales, extractos, entre otros (Dilworth *et al.*, 2017).

Un gran número de productos naturales y sus compuestos bioactivos han demostrado sus efectos terapéuticos y preventivos de la lesión hepática causada por agentes químicos, debido a que estas plantas medicinales exhiben propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anti-apoptóticas y antinecróticas, que los hace capaces de proteger a las células hepáticas de la peroxidación lipídica y otros daños oxidativos (Govind, 2011) reparar el ADN dañado, regular el metabolismo de lípidos, así como la biosíntesis de ácidos biliares (Kumar *et al.*, 2012; Domitrovic & Potocnjak, 2016).

Los efectos hepatoprotectores de los compuestos naturales se atribuyen generalmente a la gran variedad de compuestos químicos (Adewusi & Afolayan, 2010) y su habilidad para activar el

sistema de defensa antioxidante (Domitrovic & Potocnjak, 2016). Se estima que cerca de 170 fitoconstituyentes han sido aislados de 110 plantas con propiedades hepatoprotectoras, como son polifenoles, cumarinas, ligninas, aceites esenciales, monoterpenos, carotenoides y glicósidos (Gulati *et al.*, 2018), donde los extractos con mayor contenido de compuestos fenólicos poseen una mayor actividad antioxidante (Da Silva Brito *et al.*, 2018).

Está bien establecido que los hepatocitos son vulnerables al estrés oxidativo, por lo que los antioxidantes tienen un papel importante en la prevención y recuperación de las enfermedades hepáticas (Casas-Grajales & Muriel, 2015). Los mecanismos de estos extractos se deben principalmente a su capacidad captadora de radicales libres (Adewusi & Afolayan, 2010) y de normalización de los biomarcadores hepáticos e histopatológicos (Domitrovic & Potocnjak, 2016; Meng *et al.*, 2018), como se resume en la Tabla 1.

Tabla 1. Mecanismos generales de los productos naturales con función hepatoprotectora.

FUNCIÓN	MECANISMO	EJEMPLOS DE COMPUESTOS	REFERENCIAS
Antioxidante	<ul style="list-style-type: none"> • Captación de los radicales libres • Regulación los niveles de enzimas antioxidantes e incrementando actividades de CAT, SOD, GSH y GPx 	Curcumina, resveratrol, quercetina, silimarina, naningerina	Reyes-Gordillo <i>et al.</i> , 2007; Kasdallah_Grissa <i>et al.</i> , 2006; Granado-Serrano <i>et al.</i> , 2012; Muriel <i>et al.</i> , 2005; Chtourou <i>et al.</i> , 2015.
Antiinflamatorio	<ul style="list-style-type: none"> • Regulación de la expresión de mRNA de citoquinas proinflamatorias • Reducción de los mediadores de inflamación COX-2, iNOS, TNF-α, NO\bullet. 	Resveratrol	Chávez <i>et al.</i> , 2008.
Anti-apoptótico	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción del índice de apoptosis • Regulación el incremento de Bcl-2 y disminuye a Bax, p53, Fas/FasL, Caspasas 3 y 9. 	Quercetina, silimarina	Hernández-Ortega <i>et al.</i> , 2012; Mata-Santos <i>et al.</i> , 2014.
Antinecrótico	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción de las áreas de necrosis 	Catequina y epicatequina	Pérez-Vargas <i>et al.</i> , 2016.
Mejorador de biomarcadores	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción de los niveles elevados de parámetros bioquímicos en suero e hígado, como ALT, AST, ALT, MDA, BILD-T. 	β -sitosterol, ácido cafeico, ácido gálico, quercetina	Porchezian & Ansari, 2005.
Protector mitocondrial	<ul style="list-style-type: none"> • Prevención de la disrupción de la mitocondria por la acumulación de Ca⁺² y reduce la actividad de Ca⁺² ATPasa. 	Kaempferol, punicalina, saponinas	Tang <i>et al.</i> , 2006.
Otros efectos	<ul style="list-style-type: none"> • Regulación de la biosíntesis primaria de ácidos biliares • Regulación del metabolismo de lípidos • Regulación de la permeabilidad intestinal 	Glucosa, galactosa, manosa, ácido galacturónico y taninos	Chandan <i>et al.</i> , 2007; Sathaye <i>et al.</i> , 2011.

2.7. Género *Croton*

Las plantas medicinales juegan un papel importante en el manejo y tratamiento de las enfermedades alrededor del mundo (Maroyi *et al.*, 2017a), y las plantas del género *Croton* han sido ampliamente utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de diferentes afecciones, como enfermedades gastrointestinales, cardiovasculares, infecciones virales, síndrome metabólico, heridas externas, fiebre, entre otras (Salatino *et al.*, 2007). La Tabla 2 resume las aplicaciones de algunas especies del Género *Croton* (Ndunda, 2014).

Croton L. pertenece a la familia *Euphorbiaceae*, que comprende alrededor de 1200 especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales del mundo. Sudamérica, el Caribe y México, poseen la mayor diversidad de este género. Brasil tiene 350 especies (Lima & Pirani, 2008), mientras que en México se encuentran alrededor de 126 especies, de las cuales 66 son endémicas (Martínez *et al.*, 2002). En el Estado de Hidalgo, a pesar de no ser una región tropical o subtropical, se han identificado taxonómicamente al menos 22 especies (Cervantes *et al.*, 2001; Ndunda, 2014), entre éstas se incluye a *C. draco*, *C. ehrenbergii*, *C. leucophyllus* y *C. hypoleucus*.

Croton hypoleucus Schltldl, conocido como “palo blanco”, “salvia” o “solimán liso”, es una especie endémica de México (Cervantes *et al.*, 2001), que se distribuye en bosques de Pino y Encino, así como en suelos yesosos, calcáreos y calizos de los Estados de Coahuila, Tamaulipas, Nuevo León, Hidalgo, San Luis Potosí y Puebla (Cervantes *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2002). Se compone de arbustos monoicos que alcanzan una altura promedio de 1 m, con hojas alternas ovado-elípticas a lanceoladas, nervadura pinnada, de 12 a 45 mm de largo, con haz labro o glabrescente y el envés densamente lepidoto (Figura 8). Su fruto es una cápsula, semillas cilíndricas y comprimidas (Gordillo, 2002). En la medicina tradicional las partes aéreas de *Croton hypoleucus* Schltldl son utilizadas para elaborar una infusión que es ingerida para tratar el dolor estomacal y problemas respiratorios. El extracto hexánico de las hojas y tallo posee actividad antibacteriana contra algunas bacterias responsables de la enfermedad periodontal (Vargas, 2014).

Tabla 2. Usos tradicionales de algunas especies del género *Croton*.

ESPECIE	NOMBRE COMÚN	PARTE DE LA PLANTA	USO TRADICIONAL	REFERENCIAS
<i>C. arboreus</i>	Cascarillo	Partes aéreas	Para la inflamación y el dolor.	Aguilar & Ríos, 2004
<i>C. argyrophyllus kunth</i>	Velame	Hojas y flores	Influenza, afecciones del corazón y tranquilizante.	Compagnone <i>et al.</i> 2010
<i>C. bonplandianum baill.</i>	Ban tulsí	Planta entera	Infecciones y enfermedades hepáticas.	Burgos <i>et al.</i> , 2015; Jaya Santhi <i>et al.</i> 2014
<i>C. cajucara</i>	Sacaca	Corteza, tallo y hojas	Diabetes y enfermedades estomacales.	Silva <i>et al.</i> 2001; Nascimento <i>et al.</i> 2017
<i>C. Californicus</i>	California	Planta entera	Reumatismo.	Chávez <i>et al.</i> , 1982
<i>C. celtidifolius</i>	Sangre-de-adave	Hojas y corteza	Leucemia, úlceras gástricas y reumatismo.	Nardi <i>et al.</i> , 2003
<i>C. conduplicatus</i>	Quebra faca	Hojas y tallos	Influenza, inflamación, indigestión, analgésico.	Cartaxo <i>et al.</i> 2010; De Morais <i>et al.</i> , 2015
<i>C. draco cham & Schltld.</i>	Sangregado	Látex, tallo	Infecciones de la piel y la boca, dolores de muela, acné, herpes, problemas gastrointestinales.	Salatino <i>et al.</i> , 2007
<i>C. eluteria</i>	Cascarilla	Corteza	Digestivo, regular la presión, prevenir infecciones en la piel	Vigor <i>et al.</i> , 2001
<i>C. hypoleucus</i>	Palo blanco	Partes aéreas	Dolor	Vargas, 2014.
<i>C. lechleri</i>	Sangre de drago	Corteza y látex	Prevenir infecciones en la piel y cicatrizantes.	Duke, 1994
<i>C. leptostachyus</i>	Mosquero	Tallo y raíz	Enfermedades relacionadas con hongos y bacterias.	Pardo <i>et al.</i> , 2014

Tabla 2. Continuación. Usos tradicionales de algunas especies del género *Croton*.

ESPECIE	NOMBRE COMÚN	PARTE DE LA PLANTA	USO TRADICIONAL	REFERENCIAS
<i>C. macrostachyus</i>	Spurge	Tallos, raíces y hojas	Diabetes, malaria, dolor abdominal, gonorrea, hemorroides y enfermedades estomacales.	Giday <i>et al.</i> , 2007
<i>C. Malambo</i>	Palomatías	Corteza	Diabetes, diarrea, reumatismo, úlcera gástrica y para el dolor	Suárez <i>et al.</i> , 2003
<i>C. nepetaefolius</i>	marmeleiro vermelh	Tallo y hojas	Cólicos intestinales e incrementar el apetito	Lahlou <i>et al.</i> , 2000
<i>C. oblongifolius</i>	Chucka	Planta entera	Hepatitis, fiebre, hipertensión	Ahmed <i>et al.</i> , 2002
<i>C. palanostigma</i>	Balsa-rana	Corteza	Úlcera gástrica e inflamación intestinal	Miller <i>et al.</i> , 2000
<i>C. schiedeanus Schltdlll</i>	Kúul pachi	Hojas	Hipertensión	Guerrero <i>et al.</i> , 2001
<i>C. urucurana</i>	Sangre de agua	Látex	Dolor, inflamación y heridas	Esmeraldino <i>et al.</i> 2005
<i>C. zehntneri</i>	Canela de cunha	Hojas y corteza	Sedante y estimulante de apetito Digestión y depresión	Bracher <i>et al.</i> 2008



Figura 8. *Croton hypoleucus* Schltidl (Fuente propia).

Propiedades hepatoprotectoras de las especies del género Croton

Las especies del género *Croton* han reportado valiosas propiedades antioxidantes a partir del estudio de sus extractos y aceites esenciales, por medio de los ensayos DPPH y ABTS, que tienen la capacidad de evaluar la capacidad captadora o bloqueadora de radicales libres como una medida de su potencial antioxidante (Da Silva Brito *et al.*, 2018), así como hepatoprotectoras a través de diferentes modelos *in vivo* e *in vitro* que evalúan la capacidad de promover mecanismos endógenos de defensa antioxidante contra los efectos adversos de los xenobióticos (Surendran *et al.*, 2011).

C. oblongifolius es una planta de origen hindú. Su corteza se emplea para tratar la fiebre e inflamación del hígado. Comúnmente, es aplicada en la región externa del hígado para el tratamiento de la hepatitis. La dosis de 200 mg/kg de extracto etanólico de *C. oblongifolius* mostró un efecto hepatoprotector al conservar la integridad de las membranas de los hepatocitos, reducir los niveles de AST, ALT y fosfatasa alcalina, y estabilizar los niveles de proteínas y albúminas totales, en el suero de ratas con daño hepático inducido con 1.5 ml/kg de CCl₄, a

diferencia del tratamiento control, que exhibió necrosis celular y altos niveles de AST, ALT y FAL. El extracto etanólico de las partes aéreas poseen actividad hipotensiva (Ahmed *et al.*, 2002).

C. Zehntneri, es una planta aromática nativa del noreste de Brasil y es usada principalmente como sedante, estimulante del apetito y en el alivio de malestares gastrointestinales. Estudios farmacológicos confirman sus propiedades antinociceptivas, antihelmínticas y larvicidas (Camurça-Vasconcelos, 2007). En un modelo farmacológico probado por Lima *et al.* (2008) en ratas con daño hepático inducido con paracetamol se observó que la dosis de 100 mg/kg de aceite esencial de *C. zehntneri* redujo los niveles de ALT y AST, lo que indica una estabilización de la membrana y su reparación tras el daño inducido en ratones suizos machos. El posible mecanismo responsable de la hepatoprotección fue la acción captadora de radicales libres de los compuestos presentes en el aceite esencial, como el anetol (Figura 9), que a su vez que pudo inhibir la peroxidación lipídica de la membrana.

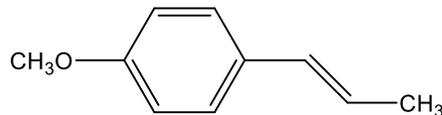


Figura 9. Estructura química del anetol.

C. sparciflorus, sinónimo de *C. bonplandianum* Baill es una planta hindú de producción anual con altura promedio de 60 cm. Esta planta produce un látex que es empleado en la medicina tradicional para tratar las picaduras de avispa. Las hojas se emplean para controlar la hipertensión y afecciones en la piel (Revathi & Parimelazhagan, 2010). La dosis de 200 mg/kg del extracto metanólico de *C. sparciflorus* mostró efecto hepatoprotector al reducir los niveles séricos de AST, ALT y FAL en un modelo de ratas con daño hepático inducido con dimetilnitrosamina, un hepatocarcinógeno que provoca hepatocarcinogénesis sin cirrosis a través del desarrollo de lesiones preneoplásicas. En este estudio la actividad hepatoprotectora se relacionó con los fitoconstituyentes de tipo flavonoide, alcaloide y glucósidos presentes en el extracto (Jaya Santhi *et al.*, 2014).

C. macrostachyus es una especie de Etiopía. Sus tallos y hojas se usan para tratar la diabetes, malaria y dolor abdominal, entre otros (Giday *et al.*, 2007). El extracto acuoso de sus hojas fue evaluado por Yassab *et al.* (2016) para determinar su efecto hepatoprotector en un modelo murino de daño hepático inducido por CCl₄. En este estudio dosis de 100, 200, 400 y 800 mg/kg fueron probadas durante 16 días, mientras que el daño se produjo por dosis de 1mg/kg de CCl₄ cada 72 horas. La dosis de 400 mg/kg mostró los mejores efectos al reducir la actividad de AST y ALT en un 68.3 y 75%, respectivamente, en comparación con el grupo CCl₄. La actividad hepatoprotectora se atribuyó a la diversidad fitoquímica del extracto, compuesta principalmente por flavonoides, triterpenos, alcaloides y taninos. El extracto metanólico de las hojas de *C. macrostachyus* mostró actividad antioxidante con un valor de Cl₅₀ de 0.11 mg/ml, debido principalmente a los compuestos flavonoides y fenoles (Teugwa *et al.*, 2013).

En un estudio más reciente, Dutta *et al.* (2018) evaluaron el efecto hepatoprotector de *C. bonplandianus* Baill a través de un modelo murino con hepatotoxicidad inducida con CCl₄. Se administraron dosis diarias de 50, 100 y 250 mg de extracto hidrometanólico empleando Silimarina y CCl₄ como control positivo y negativo, respectivamente. Los resultados demostraron que el extracto hidrometanólico de *C. bonplandianus* tiene una alta capacidad captadora de radicales libres. Los parámetros bioquímicos que fueron sobre-expresados por CCl₄ se normalizaron con el extracto, y que la actividad hepaprotectora puede deberse a presencia de α -amirina (Figura 10).

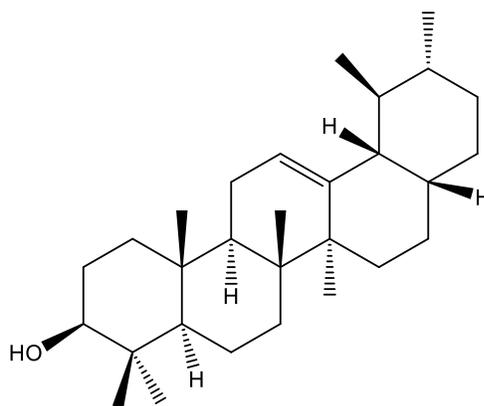


Figura 10. Estructura química de la α -amirina.

La fitoquímica del género *Croton* es considerablemente diversa, y la constituye una fuente abundante de compuestos bioactivos, como flavonoides, diterpenos de tipo clerodano, alcaloides como la taspina (Figura 11) (Salatino *et al.*, 2007; Ndunda, 2014). Hasta la fecha se carecen de estudios científicos que muestren la relación hepatoprotectora de las especies de *Croton* y sus compuestos aislados.

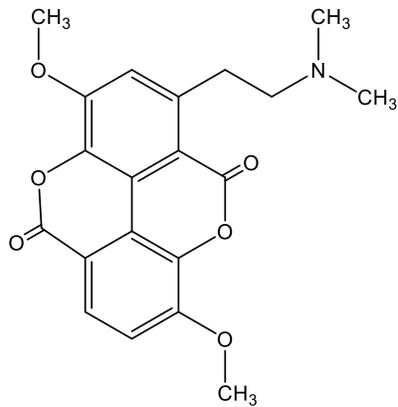


Figura 11. Estructura química de la taspina.

III. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades hepáticas constituyen un problema de salud mundial (Ladep *et al.*, 2018), que provocan aproximadamente 2 millones de muertes al año, donde 1 millón se debe a complicaciones de la cirrosis y el resto a hepatitis viral y hepatocarcinoma. El mayor porcentaje de muertes se reporta en América latina y el Caribe, así como en el medio este y norte de África (Mokdad *et al.*, 2014).

La cirrosis es actualmente la décimo primer causa de muerte en el mundo (Asrani *et al.*, 2018). En México, la mortalidad por cirrosis hepática se ha considerado un grave problema de salud pública. El alcoholismo, la hepatitis viral e hígado graso no alcohólico son las principales causas de esta enfermedad (Haga *et al.*, 2015).

El INEGI (2018a) reportó 38,833 casos de defunción por enfermedades hepáticas, consideradas como la 4ª causa de muerte, después de las enfermedades del corazón, diabetes mellitus y tumores malignos. Los decesos se presentaron en personas con edades de 35 a 64 años, y un 73% los casos se trataban de varones. De las muertes reportadas, 14,176 casos (36.5%) se asociaron al consumo excesivo de alcohol y el resto se divide entre otras enfermedades.

En Hidalgo, en 2017 se reportaron 1,440 casos de defunción de personas con algún padecimiento hepático, de los cuales el 31.2% presentó hepatitis (A, B y C), el 30.5% cirrosis hepática y el 38.3% enfermedad hepática alcohólica (INEGI, 2018b).

A pesar de que existen avances en la medicina moderna, pocos fármacos protegen el hígado contra el daño. La medicina tradicional complementaria ofrece una variedad de plantas que pueden representar nuevas alternativas para el tratamiento de las enfermedades hepáticas (Rai *et al.*, 2015). Las especies del género *Croton* poseen compuestos de diversa naturaleza química, como terpenos, flavonoides, fenoles, alcaloides y saponinas con actividades antioxidantes y antiinflamatorias (Salatino *et al.*, 2007) que podrían presentar un efecto hepatoprotector.

Por la relación taxonómica con especies del género *Croton* y su disponibilidad, el presente trabajo propone a *C. hypoleucus* Schltldl como una planta medicinal con potencial antioxidante y hepatoprotector.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante y hepatoprotectora del extracto etanólico de las partes aéreas de *C. hypoleucus* Schltdl para su uso medicinal.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar la dosis letal media DL_{50} del extracto etanólico crudo de *C. hypoleucus* Schltdl en ratas Wistar a través del ensayo de Lorke.
- Determinar el efecto hepatoprotector del extracto crudo y las fracciones de *C. hypoleucus* Schltdl en un modelo de daño hepático inducido con tioacetamida (TAA) en ratas Wistar a través de los parámetros bioquímicos.
- Evaluar la actividad antioxidante del extracto etanólico crudo de *C. hypoleucus* Schltdl mediante los ensayos de FRAP y DPPH para estimar su capacidad inhibidora de radicales libres.
- Evaluar el efecto del extracto crudo de *C. hypoleucus* Schltdl sobre los sistemas de defensa antioxidante mediante el análisis de actividades enzimáticas, niveles de proteínas y expresión génica para esclarecer el mecanismo de hepatoprotección
- Determinar el efecto del extracto crudo de *C. hypoleucus* Schltdl sobre el nivel TNF- α para identificar procesos inflamatorios agudos.
- Realizar el estudio fitoquímico del extracto crudo de *C. hypoleucus* para conocer la naturaleza de los compuestos presentes.
- Aislar e Identificar compuestos presentes en el extracto etanólico crudo de *C. hypoleucus* Schltdl mediante métodos espectroscópicos de RMN 1H y ^{13}C para la elucidación de las estructuras moleculares.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección del material vegetal

Las partes aéreas de *Croton hypoleucus* “Palo blanco” se colectaron en la comunidad de San Vidal [20.116002, -98.305734], perteneciente al municipio de Tulancingo, en el Estado de Hidalgo. Un ejemplar se identificó taxonómicamente por el M. en C. Manuel González Ledezma del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de la UAEH, con el número de Voucher DVM01.

Una vez colectada, la planta se trasladó al área de Farmacia en el Instituto de Ciencias de la Salud (ICSa) de la UAEH, para su limpieza y secado a 20-25 °C en un ambiente protegido de la luz solar. Para la limpieza, se retiraron aquellas especies colectadas accidentalmente y que no corresponden al material botánico de estudio. A su vez, se separaron las flores y semillas. Las partes aéreas de *Croton hypoleucus* se molieron utilizando un molino eléctrico para reducir el tamaño de la partícula y homogenizar la muestra, para su posterior maceración con etanol.

Obtención de extracto crudo

Las partes aéreas, secas y molidas de *Croton hypoleucus* se maceraron en etanol durante 2 semanas, en una relación de 4 L de disolvente/500 g de muestra. Posteriormente, el macerado se filtró y concentró en un rotavapor a presión reducida a una temperatura de 40 °C, para la remoción del disolvente y obtención del extracto crudo. El extracto fue almacenado en un frasco de vidrio en un ambiente seco y protegido de la luz. Su rendimiento fue del 8 % en relación con el peso seco de la planta.

Una vez que se obtuvo el EC, la investigación se realizó en dos enfoques (Figura 12):

- A. Los estudios fitoquímicos en el EC
- B. Los estudios farmacológicos

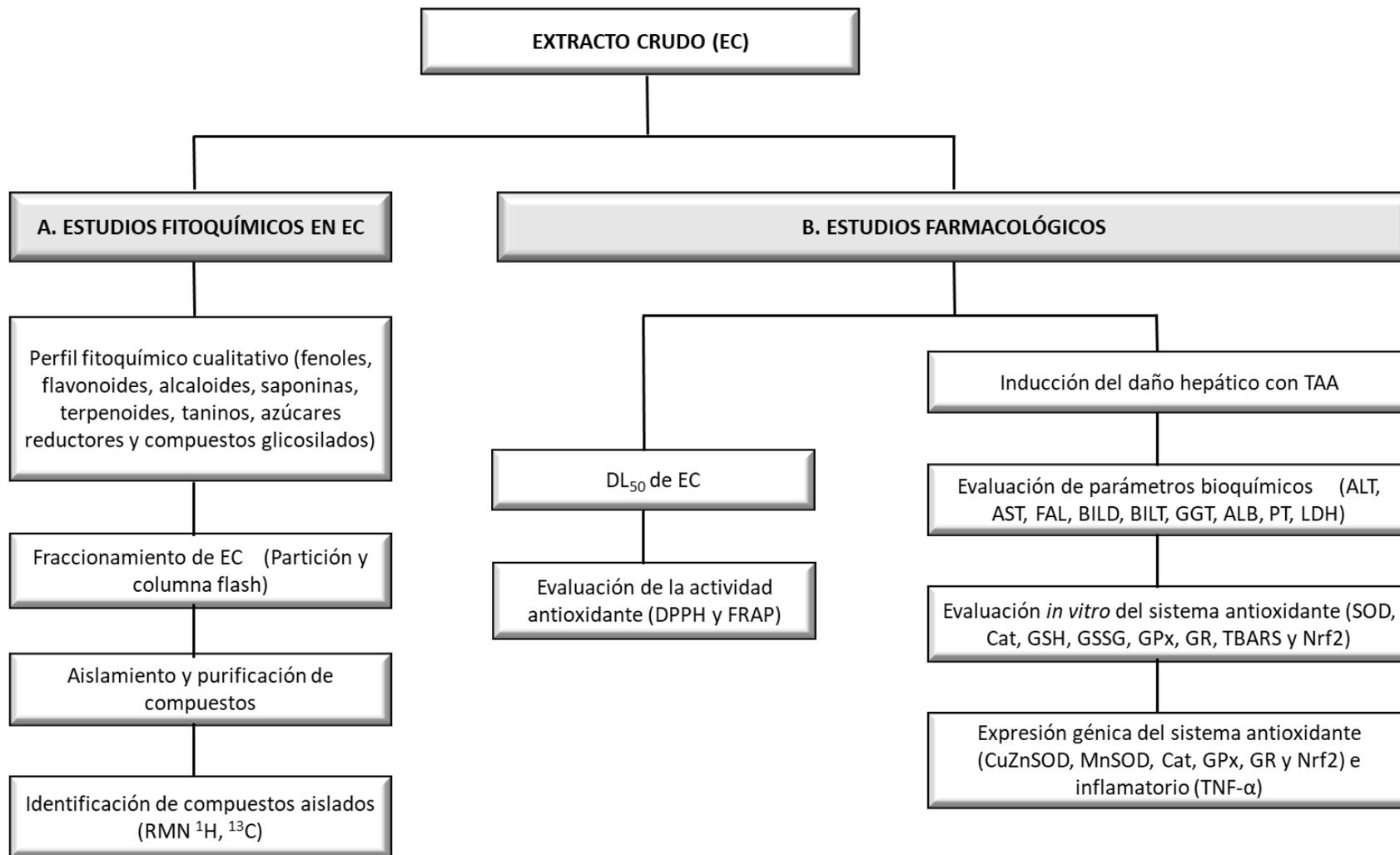


Figura 12. Diagrama general de la investigación experimental.

A. ESTUDIOS FITOQUÍMICOS EN EC

5.1. Perfil fitoquímico cualitativo

5.1.1. Ensayo para fenoles

Este ensayo se realizó siguiendo el método propuesto por Sofowora (1993). Para su efecto, 2 ml de EC al 10% en etanol fueron mezclados con 3-4 gotas de cloruro férrico al 5% en agua. La aparición de un color verde-azul profundo derivado de la oxidación de los compuestos fenólicos a ortoquinonas indica la presencia de fenoles.

5.1.2. Ensayo para flavonoides

Se realizó siguiendo el método propuesto por Harborne (2005). Se mezcló 1 g de EC con 10 ml de acetato de etilo. Luego se calentó a 40° C durante 5 minutos. El filtrado se mezcló con 1 ml de amoniaco al 1%. A través de este ensayo los flavonoides reaccionan con el amoniaco para formar quinoides en el anillo B, dando una coloración amarilla que indica la presencia de flavonas, flavonoides y xantonas.

5.1.3. Ensayo para terpenoides

Se realizó por los ensayos de Salkowski y Liebermann Burchard, siguiendo los protocolos de Iqbal *et al.* (2015). Para el primer ensayo, 1 g de EC se disolvió en 5 ml de cloroformo, seguido fue filtrado. 1 ml del filtrado se mezcló con unas gotas de ácido sulfúrico concentrado. La aparición de un color amarillo-dorado indicó la presencia de terpenos. Para el ensayo de Liebermann Burchard, empleado para la determinación de esteroides, 1 ml del filtrado se mezcló con unas gotas de ácido acético anhidro. Luego fue llevado a ebullición para inmediatamente ser enfriado, y 0.5 ml de ácido sulfúrico fueron agregados. La presencia de un anillo café indicó la presencia de esteroides.

5.1.4. Test para saponinas

Siguiendo el protocolo propuesto por Tiwari *et al.* (2011), se mezclaron 2 gramos de extracto con 20 ml de agua destilada. La mezcla se llevó a ebullición en baño maría y se procedió a filtrar. 10 ml del filtrado se agitaron en un tubo graduado durante 15 minutos. La formación de una capa de 1 cm de espuma indicó la presencia de saponinas. En paralelo, 10 ml de filtrado se mezclaron con 3 gotas de aceite de oliva y agitó vigorosamente para la formación de una emulsión, indicando la presencia de saponinas.

5.1.5. Ensayo para taninos

Esta prueba se realizó con el método de Kumar *et al.* (2007), donde 1 g de la fracción metanólica fue mezclada con 5 ml de cloruro férrico en metanol (10%). El desarrollo de un color azul en la solución indicó la presencia de taninos.

5.1.6. Ensayo para alcaloides

Se realizó por el método propuesto por Harborne (2005). Para ello, 1 g de la fracción metanólica se mezcló con 5 ml de metanol y 5 ml de ácido clorhídrico 2 N. 1 ml de filtrado se mezcló con 2 gotas de reactivo de Meyer (Apéndice). La formación de un precipitado blanco-amarillo revela la presencia de alcaloides. Como parte de un segundo ensayo, 1 ml del filtrado se trató con el reactivo de Dragendroff (Apéndice). La formación de un precipitado rojo-marrón comprobó la presencia de alcaloides.

5.1.7. Detección de azúcares reductores

Se realizó a través de la prueba de Benedict. Para ello, 1 g de EC se disolvió en 5 ml de agua. El filtrado se mezcló con 5 ml del reactivo de Benedict y fue calentado en un baño maría a 50° C durante 2 minutos. La presencia de un precipitado color rojo-anaranjado indica la presencia de azúcares reductores (Jaradat *et al.*, 2015).

5.1.8. Ensayo de compuestos glicosilados.

De acuerdo con el método propuesto por Parekh & Chanda (2016). Se tomaron 2 ml de EC se mezcló con 1 ml de ácido acético anhidro, 1 ml de cloruro férrico al 10% y 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. La coloración verde-azul de la mezcla indicó la presencia de compuestos glicosilados.

5.2. Fraccionamiento de EC

Para la exploración fitoquímica y farmacológica, el extracto de EC fue fraccionado mediante 2 técnicas: partición por pares de disolventes no miscibles y por partición flash (Figura 13). La descripción general de este proceso se muestra en la Figura 14.

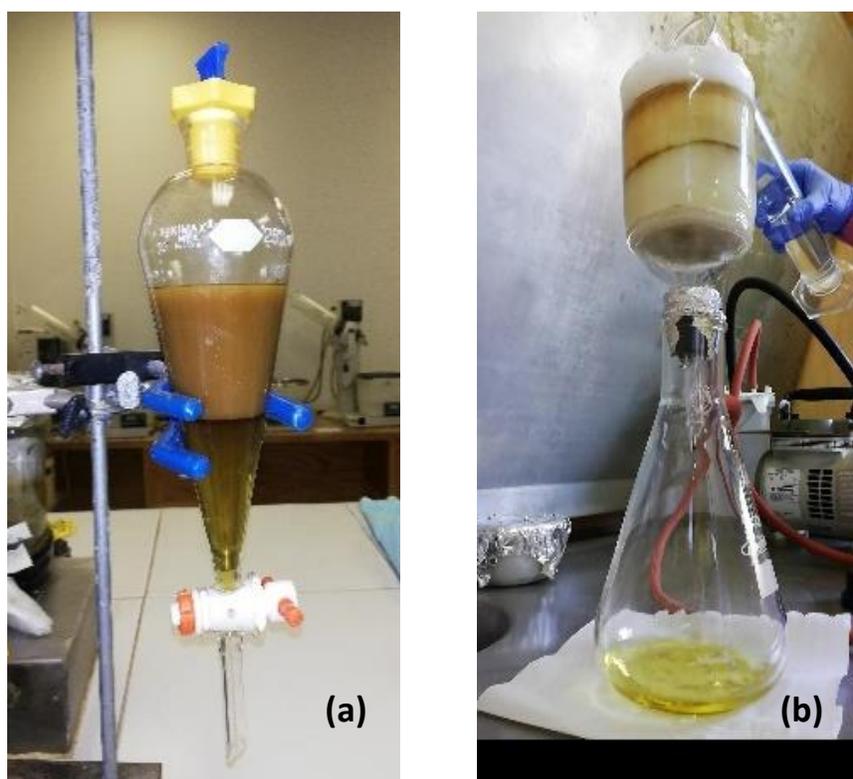


Figura 13. Fraccionamiento de EC mediante las técnicas de partición por pares no miscibles (a) y partición flash (b).

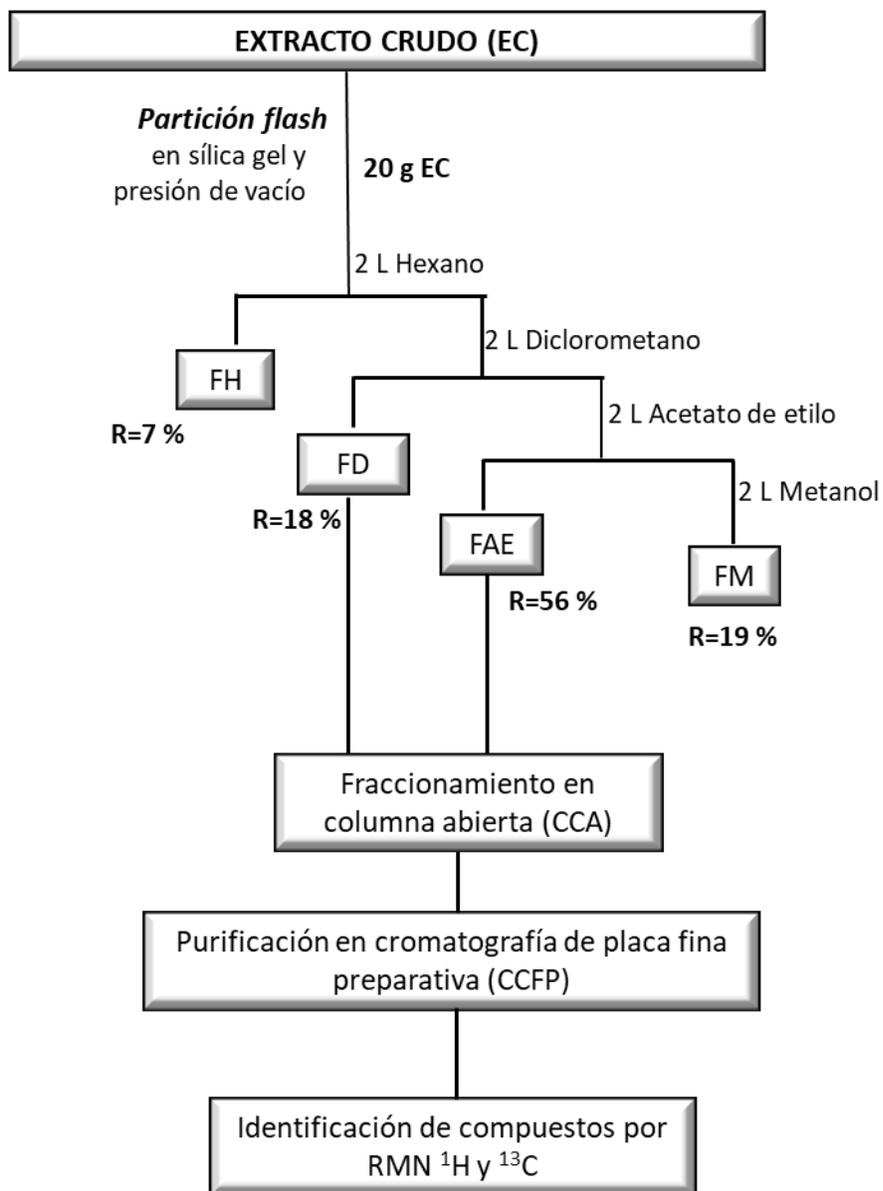


Figura 14. Diagrama general de la partición de EC (FH: fracción hexánica; FD: fracción en diclorometano; AE: fracción en acetato de etilo; FM: fracción metanólica; R: rendimiento).

5.2.1. Partición por par de disolventes no miscibles

También conocida como extracción líquido-líquido. Una muestra de 10 g de EC se suspendió en 30 ml de una solución metanol: agua (1:9). Se vertió en un embudo de separación y se realizó la primera partición con 100 ml de cloroformo por tres ocasiones, para obtener 2 fracciones: la fracción acuosa 1 (FAC₁) y la fracción clorofórmica (FCL). La fracción FAC₁ se llevó a una segunda partición, en esta ocasión con 100 ml de acetato de etilo por tres ocasiones para obtener así la fracción de acetato de etilo (FAE) y la fracción acuosa residual (FAC₂). Las tres fracciones (FCL, FAE y FAC) se concentraron para eliminar el disolvente en un rotavapor a presión reducida y una temperatura de 40 °C. Estas fracciones fueron utilizadas en los estudios farmacológicos.

5.2.2. Partición flash

En embudo büchner de vidrio de 15 cm de diámetro y capacidad de 1000 ml se empacaron 200 g de sílica gel 60. En la parte superior se colocaron 10 g de EC. El embudo, conectado a un matraz Kitasato y éste a su vez a una bomba de vacío, fue eluido con 1 L de cada uno de los disolventes hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol en polaridad ascendente hasta la completa extracción de cada fracción. Al finalizar las fracciones en hexano (FH), diclorometano (FD), acetato de etilo (FAE) y metanol (FM) fueron concentradas por separado en un rotavapor a 40°C y presión reducida. Estas fracciones fueron utilizadas para el aislamiento de compuestos por medio de cromatografía en columna y Cromatografía en capa fina preparativa.

5.2.3. Cromatografía en columna

Tanto EC como sus fracciones FD y FAE provenientes de la partición flash fueron llevadas a un fraccionamiento secundario en columnas sucesivas para la separación de compuestos, como se explica a continuación:

Columna cromatográfica para FD

Una muestra de 3.6 g de FD se colocó en una columna cromatográfica de 25mm x 40 cm, empleando sílica gel 60 como fase estacionaria y mezclas de hexano: diclorometano (6:4) como fase móvil. Se obtuvieron 64 fracciones de 15 ml, las cuales fueron agrupadas de acuerdo con su

similitud cromatográfica empleando técnicas de cromatografía de capa fina, con un sistema de elución de hexano: acetato de etilo (7:3) una lámpara de luz UV (Cole Parmer, E. U) y una solución de ácido sulfúrico 10% en etanol, como revelador químico. Las fracciones fueron nombradas FD-1 a FD-64.

Columna cromatográfica para FAE

Una muestra de 10 g de FAE se colocó en una columna de vidrio de 120 mm x60 cm, empleando 150 g de sílica gel 60 como fase estacionaria, y como fase móvil, mezclas de hexano, hexano: acetato de etilo (95:05; 90:10; 80:20; 70:30; 60:40; 50:50; 40:50; 30:60; 20:80; 10:90), acetato de etilo, acetato de etilo: metanol (90:10; 80:20; 70:30; 60:40; 50:50) para obtener 40 fracciones de 100 ml cada una, llamadas FAE1 a FAE40. Estas fueron concentradas en un rotavapor a presión reducida y temperatura de 40 °C.

La fracción FAE12 (2.5 g) se llevó a un fraccionamiento secundario en una columna de sílica gel 60 y mezclas de mezclas de hexano: acetato de etilo (95:05; 90:10; 80:20; 70:30; 60:40; 50:50; 40:50; 30:60; 20:80; 10:90) como fase móvil. Se obtuvieron 166 fracciones de 40 mL que fueron reagrupadas de acuerdo con su similitud de compuestos empleado la cromatografía de capa fina, un sistema de elución de hexano: acetato de etilo (90:10) y una solución de ácido sulfúrico: vainillina como revelador, y así obtener 66 fracciones que fueron nombradas FAE-12-01 a FAE-12-66.

5.3. Aislamiento y purificación de compuestos

La purificación de los compuestos se realizó a través de cromatografía en capa fina preparativa (CCFP) empleando cromatofolios de vidrio recubiertos con sílica gel preparativa de 5 mm de espesor (Dynamic Absorbent INc, E. U), diferentes fases móviles y una cámara de elución de vidrio de 30 x 9.8 x 25 cm.

5.3.1. Purificación de compuestos presentes en FD

A partir de la cromatografía en columna abierta, las fracciones FD-48 (75 mg) y FD-56 (110 mg) fueron purificadas por CCFP con un sistema de hexano: diclorometano (6:4) para obtenerse dos compuestos blanco-amarillentos de apariencia oleosa, que al reaccionar con ácido sulfúrico

revelaron manchas de color amarillo-café. El rendimiento fue de 21 y 35 mg para FD-48 y FD-56, respectivamente.

5.3.2. Purificación de compuestos presentes en FAE

Una vez realizada la cromatografía en columna abierta de FAE-12, se obtuvieron dos fracciones de interés: FAE-12-40 (16 mg) y FAE-12-60 (13 mg), con forma de agujas y cristales, respectivamente. Su purificación se realizó por separado en CCFP y empleando sistemas de elución de diclorometano: acetona (5:1). Los compuestos aislados se revelaron con una solución de ácido sulfúrico: vainillina que produjo manchas de color lila para FAE 12-40, así como verde-azul para FAE-12-60.

5.4. Identificación de compuestos aislados

La identificación de los compuestos puros se realizó por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de 300 (Advance II, Bruker, España) y 400 MHz (Advance III, Bruker, España), para ^1H , y de 100 MHz (Advance II, Bruker, España) para ^{13}C . Los espectros se obtuvieron utilizando CDCl_3 y CD_3OD (Sigma-Aldrich, Alemania) como disolventes. La elucidación estructural se realizó por análisis de los desplazamientos químicos empleando el programa MestRenova v9.0 y por comparación con la bibliografía.

B. ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS

Animales de experimentación

Se emplearon ratas macho cepa *Wistar* de 7 semanas de edad y un peso de 180-200 g, provenientes del Bioterio de la UAEH bajo la aprobación del Comité Institucional Ético para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CIECUAL) de acuerdo con los lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999 (SENASICA,1999). Para su manejo, las ratas fueron acondicionadas en cajas de polipropileno y mantenidas en condiciones ambientales controladas, con ciclos de 12 horas de luz y una temperatura promedio de 22 °C, por un periodo de adaptación de 7 días. Se alimentaron con pellet comercial y agua *ad libitum*. El manejo de los residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI) se realizó de acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 (SSA, 2002).

5.5. Dosis letal media (DL₅₀)

El ensayo de toxicidad aguda se realizó mediante el método de Dietrich Lorke (Lorke, 1983). Se emplearon ratas macho *Wistar* que se mantuvieron en un ayuno de 12 horas. Se formaron 2 lotes con 12 animales cada uno. Al lote 1 se trataron 12 animales con EC a diferentes dosis (10, 100 y 100 mg/kg de peso) por vía intragástrica (IG), manteniendo un grupo control administrado con el vehículo (Tween 80 al 1%). A partir del día de la administración de los extractos y durante 14 días, se les mantuvo en observación y se les pesó a diario, para identificar posibles cambios en su comportamiento, ganancia de peso o posibles efectos adversos. Los animales que sobrevivieron durante el periodo de observación se sacrificaron, y sus órganos se observaron macroscópicamente, en comparación al grupo control. De acuerdo con los resultados obtenidos en esta primera fase, para el segundo lote se seleccionaron las dosis mas altas (1600, 2800 y 5000 mg/ kg), con el mismo procedimiento de trabajo.

5.6. Evaluación de la actividad antioxidante de EC

5.6.1. DPPH (2,2-difenilpicrilhidrazilo)

El método de DPPH (Brand- Williams *et al.*, 1995) consiste en hacer reaccionar el extracto con el radical DPPH (2,2-difenilpicrilhidrazilo) en solución de metanol. Las moléculas antioxidantes

presentes en el extracto de prueba, cuando se incuban, reaccionan con el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y lo convierte en 2,2-difenil-1-picril hidrazina, de color amarillo. El nivel de descoloración del púrpura al amarillo es medido a 571 nm, como una medida del potencial antioxidante del extracto de la planta.

Con el fin de establecer la relación entre la concentración de EC y el % de inhibición de DPPH, a partir de una solución de 50 mg de EC/ml metanol se prepararon diluciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/ml, los cuales, por separado se tomaron 100 μ L que se colocaron en una charola de micropozos e hicieron reaccionar con 2.9 ml de reactivo DPPH (3.9 mg/ 100 ml en metanol). Se mezclaron perfectamente y dejaron incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Seguido, la charola fue llevada a un espectrofotómetro para leer su absorbancia a 517 nm, empleando como blanco metanol al 80 % (v/v).

Se preparó una curva de calibración de trolox de 10 a 100 μ M/ml, que fue utilizada para comparar la habilidad de EC para bloquear la acción del radical DPPH, mientras que el porcentaje de inhibición se calculó como se muestra en la ecuación 1:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{Abs Control} - \text{Abs EC}}{\text{Abs Control}} \times 100 \quad (1)$$

Donde Abs control corresponde a las unidades de absorbancia del radical DPPH en metanol; Abs EC es la absorbancia de EC. Mientras que la concentración inhibitoria media (CI_{50}) es la cantidad de extracto requerida para descender la absorbancia de DPPH en un 50 %. Ésta última se expresó en mg eq trolox/ml.

5.6.2. Ensayo de FRAP

El ensayo de FRAP (Benzie y Strain, 1996) evalúa la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo con su capacidad para reducir el ión férrico (Fe^{+3}) presente en un complejo con la 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa (Fe^{+2}) a una absorbancia de 593 nm. Para la preparación del reactivo de FRAP se mezclaron 25 ml de buffer acetato 0.1 M (pH 3.6), 2.5 ml de TPTZ (10 mM en HCl 40 mM) y 2.5 ml de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (20 mM en agua). La solución se conservó a 37 °C y en oscuridad. Para el ensayo, 30 μ L de una solución metanólica de EC (10 mg/ ml) fue

mezclada con 90 μL de agua destilada y 900 μL de reactivo de FRAP. Se mantuvo la mezcla a 37 $^{\circ}\text{C}$, e inmediatamente se comenzó la lectura de las muestras en un espectrofotómetro durante 30 minutos con intervalos de 5 minutos a 590 nm. La determinación de la actividad antioxidante se realizó con una curva de calibración (solución de 200-1000 μM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en lugar de extracto. Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como $\mu\text{M Fe/mg}$ extracto crudo.

5.7. Inducción del daño hepático con TAA

5.7.1. Preparación de las fracciones de EC

Las fracciones de EC destinadas para el estudio farmacológico se obtuvieron a través de una partición por par de disolventes no miscibles. Para su efecto, 10 g de EC fueron mezclados con 60 ml de una solución metanol: agua (1:9) en un embudo de separación. Se hicieron 3 lavados con 200 ml de cloroformo para así obtener la fracción clorofórmica (FCL) y la fracción acuosa 1 (FAC₁). Ésta última se lavó tres veces con 200 ml de acetato de etilo para rendir una fracción acuosa 2 (FAC₂) y la fracción acetato de etilo (FAE). Las fracciones FCL, FAE y FAC₂ tuvieron un rendimiento del 33, 48 y 19%, respectivamente.

5.7.2. Animales de experimentación

Ratas macho Wistar se dividieron en 7 grupos de experimentación (Tabla 3): El grupo 1 (Control) y 2 (TAA) (Sigma-Aldrich, Suiza) recibieron una 1 ml de Tween 80 al 1% v/v (IG) durante 4 días. Al mismo tiempo, el grupo 3 (EC) y 4 (EC+TAA) fueron administrados con 300 mg/kg/día de EC disuelto en solución de Tween 80 al 1%, y los grupos 5 (FCL+TAA), 6 (FAE+TAA) y 7 (FAC+TAA) una administración (IG) de 100 mg/kg de FCL, FAE y FAC disueltos en solución de Tween 80 al 1%, respectivamente. En el cuarto día, los grupos 2, 4, 5, 6 y 7 recibieron una dosis única de 400 mg TAA/ kg disuelto en 1 ml de NaCl al 9% por vía intraperitoneal (IP). A las 24 horas de administración de TAA, todos los animales fueron sedados con 50 mg de pentobarbital /kg (Pisa, México) (IP) para su sacrificio.

Con un bisturí, se realizó una apertura de la cavidad abdominal. Por medio de punción de vena porta de cada animal se extrajeron aproximadamente 5 ml de sangre. Ésta fue colocada en tubos heparinizados y centrifugada a 4000 rpm, 10 °C, 15 min. El suero fue separado cuidadosamente y colocado en tubos eppendorf de 1.5 ml, posteriormente congelados a -80 °C hasta su uso. Con ayuda de unas pinzas, el hígado de cada animal fue removido y enjuagado con una solución salina 0.9%. Se seccionó en 4 partes que fueron empacadas en papel aluminio y bolsas de polietileno de baja densidad para su almacenamiento a -80 °C hasta su uso.

Tabla 3. Grupos de experimentación del modelo de daño hepático inducido con TAA.

Grupo	Administración		
	De 0 a 72 h (cada 24 h)	80 h	96 h
1. Control	1 ml Tween 80 al 1% /día		
2. TAA	1 ml Tween 80 al 1% /día	400 mg TAA/kg	
3. EC	300 mg EC/kg/día		Anestesia de todos los animales 50 mg Pentobarbital /kg
4. EC+TAA	300 mg EC/kg/día	400 mg TAA/kg	
5. FCL + TAA	100 mg FCL/ kg/día	400 mg TAA/kg	
6. FAE + TAA	100 mg FAE/ kg/día	400 mg TAA/kg	
7. FAC+ TAA	100 mg FAC/ kg/día	400 mg TAA/kg	

5.8. Evaluación de los parámetros bioquímicos

La actividad hepatoprotectora de EC y FAE, FCL y FAC fueron medidos través de marcadores bioquímicos. La determinación cuantitativa de las enzimas Alanina aminotransferasa (ALT), Aspartato aminotransferasa (AST), Fosfatasa alcalina (FAL), Gamma glutamil transpeptidasa (GGT) y Lactado deshidrogenasa (LDH), así como de Bilirrubina directa (BILD), bilirrubina total (BILT),

Proteínas totales (PT) y Albúmina (ALB) se realizó a través de un equipo analizador de química AU-680 (Beckman Coulter, Suiza).

5.8.1. Alanina aminotransferasa (ALT)

La determinación cuantitativa de ALT se realizó por la disminución de la absorbancia a 340 nm y 25 °C, producida por la oxidación de NADH a NAD⁺ mientras que la reducción de piruvato a lactato es catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (Murray, 1984). Los resultados se expresaron como U/L

5.8.2. Aspartato aminotransferasa (AST)

La actividad de AST fue medida por la disminución en la absorbancia a 340 nm y 25 °C producido por la oxidación de NADH a NAD⁺ con la reacción paralela de la reducción de oxalato en malato por malato deshidrogenasa (Rej & Horder, 1984). Los resultados se expresaron en U/L

5.8.3. Fosfatasa alcalina (FAL)

La determinación de FAL se realizó a través de la hidrólisis de *p*-nitrofenilfosfato (pNPP) que produce fosfato y *p*-nitrofenol a pH alcalino y medido a 405 nm. La producción de *p*-nitrofenolato es directamente proporcional a la actividad enzimática de la muestra (Bessey *et al.*, 1946). Los resultados se expresaron como U/L.

5.8.4. Gamma glutamil transpeptidasa (GGT)

GGT fue analizada por el cambio de absorbancia a 410 y 480 nm debido a la formación de 5-amino-2-nitrobenzoato, un producto de la transferencia del grupo glutamil desde el sustrato donador Gamma-glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida hacia el receptor glicilglicina por acción de GGT (Theodorsen & Stromme, 1976). Los resultados se expresaron como U/L.

5.8.5. *Lactato deshidrogenasa (LDH)*

La actividad catalítica de LDH se determinó por medio de la formación de NAD⁺ desde la oxidación de NADH en pH alcalino, a 340 nm y 37 °C (Vanderlinde, 1985). Los resultados se expresaron como U/L.

5.8.6. *Bilirrubina directa (BILD)*

La evaluación de BILD se realizó por medio de la producción de azobilirrubin desde la reacción de bilirrubina con ácido sulfanílico diazotizado y medido fotocolorimétricamente a 530 nm (Martinek, 1966). Los resultados se expresaron como mg/dl.

5.8.7. *Proteínas totales*

Los niveles de proteínas totales se evaluaron por medio de la reacción de Biuret (Gornall *et al.*, 1949) que se basa en la formación de un complejo coloreado entre Cu²⁺ y los grupos NH de los enlaces peptídicos en un medio básico, donde la intensidad de coloración fue directamente proporcional a la cantidad de proteínas a 540 nm (Buxbaum, 2015). Los resultados se expresaron en g/dl.

5.8.8. *Albumina*

La determinación de albúmina se realiza por medio de la combinación de esta proteína con el verde de bromocresol a pH 3.6, produciéndose un cambio de color del indicador, de amarillo verdoso a verde azulado, proporcional a la concentración de albúmina presente y medido a 630 nm (Doumas *et al.*, 1974). Los resultados se expresaron como g/dl.

5.9. **Evaluación *in vitro* del sistema antioxidante**

La evaluación del sistema antioxidante se realizó a través de ensayos *in vitro* y la expresión génica de las enzimas y proteínas del sistema de defensa antioxidante. Para la evaluación *in vitro*, el extracto enzimático se preparó como se describe a continuación:

Una muestra de 100 mg de tejido se homogenizó en buffer EDTA-fosfato (EDTA 0.005 M y fosfato de sodio a 0.1 M, pH 8) en una relación de 100 mg/ml. Se le adicionó 10 µL de ácido perclórico

(16 mM) en metanol: agua (1:1) con agitación durante 30 segundos, en un homogenizador de tejidos. Luego, la mezcla fue centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos a 4° C para la recuperación de la fracción proteica del sobrenadante (FPS). Ésta última se empleó para la determinación de los parámetros *in vitro*.

Para la determinación de la actividad *in vitro* del sistema de defensa antioxidante se estimó el contenido de proteína por el método Bradford (1976). El método se basa en la unión específica del colorante azul de Coomassie a los residuos de aminoácidos de las proteínas produciendo una absorbancia máxima a 595 nm, mientras que el colorante libre posee una absorbancia máxima a 470 nm. Para su determinación, una solución de azul de Coomassie fue preparada (4.7% en etanol y 8.5% en ácido fosfórico).

Una muestra de 100 µL de FPS (10 µg/ml) fue mezclada con 1 ml de azul de Coomassie y mezclado en un vórtex. La absorbancia fue medida en un espectrofotómetro a 595 nm después de 15 minutos de incubación a medio ambiente. Como blanco, 100 µL de buffer fosfato y 1 ml de azul de Coomassie fueron utilizados. La curva de calibración se realizó con albúmina bovina (10 a 100 µL) mezclada con 1 ml de azul de Coomassie bajo las mismas condiciones de las muestras.

5.9.1. Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de SOD se determinó usando el reactivo de Nitroazul de tetrazolio (NBT) de acuerdo con el método de Neha & Mishra (2011), con modificaciones. Este método se basa en la generación del anión O_2^- por autooxidación del clorhidrato de hidroxilamina (CH). En el medio de reacción el NBT es reducido a nitrito. El nitrito en presencia de EDTA formando un complejo coloreado. En una placa de 96 pocillos se hicieron reaccionar en el siguiente orden: 50 µL de buffer fosfato (50mM, pH 7.4), 20 µL de EDTA (1mM), 5 uL de clorhidrato de hidroxilamina (34.8 mg/10 ml de agua), 20µL de nitroazul de tetrazolio 96 mM (7.8 mg/ml en agua) y 150 µL de extracto enzimático. Enseguida se hizo la lectura de su absorbancia a 560 nm. Los resultados se expresaron en UI/mg de proteína.

5.9.2. *Catalasa (Cat)*

La actividad de Cat fue medida de acuerdo con el método descrito por Aebi (1984) con modificaciones, usando H_2O_2 . En este ensayo la descomposición de H_2O_2 es seguida por un decremento en la absorbancia a 260 nm. Para ello, en una cubeta de cuarzo se mezclaron 100 μ L de extracto enzimático (diluido 1:10) con 900 μ L de peróxido de hidrógeno. Como blanco, se utilizó una solución de 1000 μ L de buffer fosfato con pH 7. Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro a 260 nm cada 30 segundos durante 10 minutos a 37 °C al añadir la muestra. Los resultados se expresan en UI/mg de proteína.

5.9.3. *GSH y GSSG*

Estos ensayos se realizaron de acuerdo con Hissin & Hilf (1976) utilizando como sonda fluorescente el o-ftaldehído (OPT). GSH y GSSG forman un compuesto fluorescente con el OPT que se mide a las longitudes de onda de excitación de 350 nm y de emisión de 420 nm en pH óptimo de 8 y 12 para GSH y GSSG, respectivamente. A pH mayor de 8 el GSH se transforma en GSSG, por lo que es necesario bloquear la forma reducida con N-etilmaleimida (NEM).

Para la determinación de GSH, se mezcló 100 μ L de la FPS con 1.8 ml de EDTA- fosfato a pH de 8.0 y 100 μ L de solución de OPT (1% en metanol). La mezcla se incubó durante 15 minutos para medirse la fluorescencia a 350 y 420 nm (Modelo LS50, Perkin-Elmer, Reino Unido). En el caso de GSSG, a 100 μ L de FPS se agregaron 40 μ L de NEM para bloquear a GSH. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y se agregó NaOH (0.1N) para alcalinizar el medio. Posteriormente, se añadieron 100 μ L de OPT (1% en metanol). La fluorescencia se midió bajo las mismas condiciones que GSH. Las concentraciones se calcularon mediante curvas de calibrado a concentraciones conocidas de GSH y GSSG. Los resultados se expresaron como μ g de glutatión/mg de proteína.

5.9.4. *Glutatión reductasa (GR)*

La cuantificación de GR se realizó por el método propuesto por Staal *et al.* (1969), basado en monitorear la oxidación de NADPH junto con la reducción de GSSG, donde NADPH absorbe a 340 nm y su oxidación se refleja por el descenso de la absorbancia a esta longitud de onda. La

presencia de GR en la muestra incrementa la oxidación de NADPH (Mannervik, 2001). En una placa de 96 pocillos se procedió a mezclar en orden: 40 μL de buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 7; 20 μL EDTA 20 mM, 20 μL NADPH (2mg/ml buffer fosfato de potasio), 20 μL GSSG 5mM y 100 μL FPS. Seguido, se llevó a un espectrofotómetro para leer su absorbancia cada minuto durante 10 minutos a 340 nm. Los resultados se expresaron en UI/mg proteína.

5.9.5. *Glutación peroxidasa (GPx)*

La cuantificación de GPx se realizó siguiendo el método propuesto por Wilson *et al.* (1989), que usa H_2O_2 como sustrato en presencia de GSH. En la reacción, GR es usada para reducir GSSG con NADPH como cofactor. El descenso de NADPH a 366 nm es proporcional a la actividad de GPx. En una placa de 96 pocillos se mezclaron en orden: 100 μL de buffer fosfato de potasio 50 mM a pH 7, 20 μL de FPS, 0.048 U de GR y 20 μL GSH 10 mM. Se incubó 5 minutos. Seguido se agregaron 20 μL NADPH (2mg/ml en buffer) y 20 μL H_2O_2 63.5 mM. La bandeja de pocillos fue llevada a un espectrofotómetro para realizar la lectura a 366 nm cada 10 minutos. Los resultados se expresaron en UI/mg proteína.

5.9.6. *Reacción del ácido tiobarbitúrico (TBARS)*

La estimación de la protección oxidativa de los lípidos del extracto fue medida través del ensayo de malonaldehído-ácido tiobarbitúrico. En los sistemas biológicos, la peroxidación genera un número de productos como el malonaldehído, el cual ha sido utilizado como un marcador del estrés oxidativo. Para ello, se mezclaron 50 mg de tejido con 1 ml buffer fosfato 50 mM, pH 7.4. La mezcla se sonicó durante 10 segundos y luego se centrifugó a 5100 rpm y 4 °C durante 20 minutos. Del sobrenadante, 140 μL se mezclaron con 100 μL de ácido fosfórico 1%, 33 μL de butilhidroxitolueno (BHT) 0.01% y 300 μL de 2-ácido tiobarbitúrico al 6%. Se incubó a 100 °C durante 45 minutos antes de agregar 1.4 ml de alcohol butílico como aclarante. Se realizó una segunda centrifugación a 5000 rpm, durante 5 minutos. La absorbancia de la fase orgánica fue medida en un espectrofotómetro a 535 nm, siguiendo el protocolo propuesto por Mihara & Uchiyama (1978).

Para la cuantificación, 16.5 μL de MDA se mezclaron con 10 ml de ácido sulfúrico 1%. La mezcla se incubó durante 2. Se tomaron 200 μL y se diluyeron con 50 mL de agua milliQ hasta una concentración de 40 μM . Esta solución se empleó para la construcción de la curva patrón (0-20 ng/ml) siguiendo los pasos descritos, sustituyendo la FPS con la solución de MDA. Los resultados se expresaron en ng MDA/ μg proteína.

5.10. Expresión génica del sistema antioxidante y antiinflamatorio

5.10.1. Extracción del ARN

La extracción del ARN se realizó siguiendo el trabajo realizado por Santos-López *et al.* (2016). Una muestra de 100 mg de tejido hepático fue homogenizada con 1 ml del reactivo TRI-reagent® (Tiocianato de guanidinio- fenol) (Sigma-Aldrich, Alemania) para la extracción del ARN. Se centrifugó a 14000 rpm y 4°C durante 10 minutos para remover el material insoluble como membranas extracelulares, polisacáridos y ADN de alto peso molecular. El sobrenadante, rico en ARN y proteínas fue transferido a un tubo eppendorf estéril y tratado con el kit DNase I RNasefree para eliminar posibles contaminaciones con DNA genómico. Luego se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente para conseguir la completa disociación de los complejos nucleoprotéicos. Se añadieron 200 μL de cloroformo y se agitó el tubo durante 15 segundos. Se reposó nuevamente 3 minutos y volvió a centrifugar a 14000 rpm y 4°C durante 15 minutos. Del tubo, se tomó la fase superior acuosa que contiene el ARN y se pasó a otro tubo eppendorf. Se le adicionó 50 μL de isopropanol para la precipitación del ARN y se agitó durante 15 segundos. Se dejó reposar durante 10 minutos más a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 14000 rpm y 4 °C durante 10 minutos. Finalmente, el lavado del ARN se realizó con 100 μL de etanol al 75%. Se centrifugó a 8750 rpm y 4 °C durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en agua milli Q libre de ARNasas para la determinación de su pureza y evaluación de la actividad antioxidante del sistema de defensa endógeno.

La cantidad y pureza del ARN extraído se determinó mediante la medida de la absorbancia a 260, 280 y 310 nm y mediante electroforesis en gel de agarosa (Bio Rad, E. U) al 1%.

5.10.2. Amplificación del ADN

La amplificación del ADN se realizó a través de la qRT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction; Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa), que amplifica una pequeña cantidad de moléculas diana de ARN (tanto mRNA como ARN total) con gran especificidad, mediante la transcripción reversa del ARN a ADN complementario (cADN), que es posteriormente amplificado. Para realizar este análisis se utilizó el Kit “NZY QPCR 2X mastermix” (Nzytec, Portugal) que comprende una mezcla ordenada de: 10µL del mastermix (buffer, cloruro de magnesio, Taq polimerasa y nucleótidos), 10 µM del primer sentido, 10 µM del primer antisentido, hasta 8.2 µM de ARN purificado y agua libre de nucleasas para ajustar a un volumen final de 20 µL. Esta mezcla se centrifugó 30 segundos a 2500 rpm para su amplificación en un termociclador (Lightcycler 1.5, Roche, Suiza).

Los parámetros de PCR fueron: preincubación a 95 °C durante 10 minutos, seguido por 45 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 10 s, una temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos de 60 °C, extensión a 72 °C durante 15 s y enfriamiento a 40 °C por 30 s. Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en qRT-PCR.

PRIMER	SECUENCIA
β -actina	sentido: 5' CGGTCAGGTCATCACTATCGG-3' antisentido: 5'TCCATACCCAGGAAGGAAGGC-3'
Cat	sentido: 5' ATCAGGGATGCCATGTTGTT-3'. antisentido: 5' GGGTCCTTCAGGTGAGTTTG-3'
MnSOD	sentido: 5' ACTGAAGTTCAATGGCGGG-3'. antisentido: 5' TCCCAGCAACTCTCCTTTGGG-3'
CuZnSOD	sentido: 5' CTTCGAGCAGAAGGCAAGCG-3' antisentido: 5' GACATGGAACCCATGCTTCGC-3'
GR	sentido: 5' GGTTGGACTATGATGACAACATCCC-3' antisentido: 5' GCTTCATCTTCAGTGAGCCC-3'
GPx	sentido: 5' AGTTCGGACATCAGGAGAATGGCA 3' antisentido: 5'TCACCATTACCTCGCACTTCTCA 3'
Nrf2	sentido: 5'TTGTAGATGACCARGAGTGC 3' antisentido: 5'GAGCTARGCAGRGARGAGCC 3'
TNF- α	sentido: 5' TGGCCCAGACCCTCACTC 3'. Antisentido: 5'CTCCTGGTATGAAATGGCAAATC 3'

La cuantificación relativa del mRNA de los distintos genes se realizó monitoreando la reacción de polimerización en un termociclador acoplado a un detector de fluorescencia LightCycler Real Time PCR Detection, utilizando como marcador la sonda fluorescente SYBR®Green.

Los niveles de expresión génica fueron normalizados respecto a los valores del control endógeno β -actina y los resultados se expresaron en función a los valores del ciclo umbral o de threshold (Ct) relativizados al control utilizando el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los parámetros de PCR utilizados fueron los siguientes: preincubación a 95°C durante 10 min, seguido por 45 ciclos que constan de desnaturalización 10 segundos a 95°C, hibridación con una temperatura de anillamiento de entre 55 y 70°C dependiendo del oligonucleótido, y extensión 15 segundos a 72°C, seguido finalmente de un ciclo de enfriamiento a 40°C durante 30 segundos.

5.11. Análisis Estadístico

Los ensayos contemplados en la presente tesis se realizaron por triplicado. Las diferencias significativas entre los grupos (EC, EC+TAA, TAA y CT) fueron calculados por un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion versión XVII.II (Statistical Graphics Corporation, Inc., Rockville, MD). Una prueba de Tuckey fue empleada para identificar la diferencia entre los grupos ($P < 0.05$).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. ESTUDIOS FITOQUÍMICOS EN EC

6.1. Perfil fitoquímico de EC

En el estudio de productos naturales, el tamizaje fitoquímico de las plantas y sus extractos es una herramienta útil para determinar el tipo de compuestos, la calidad de las especies de plantas, así como definir su potencial como fuente de compuestos bioactivos (Zhao *et al.*, 2013).

El perfil fitoquímico de EC mostró la presencia de compuestos terpenoides (esteroles, saponinas), fenoles (flavonoides, taninos), alcaloides y azúcares reductores (Tabla 5), lo cual coincide con lo reportado previamente en los extractos acuoso-metanólicos de *C. bonplandianus* (Selvakumar & Kumar, 2017); acuosos de hojas de *C. macrostachyus* (Degu *et al.*, 2016; Yassab *et al.*, 2016); etanólicos de hojas de *C. leptostachyus* (Sánchez-Peralta *et al.*, 2015), así como éter de petróleo, cloroformo, acetona y metanólico de hojas de *C. bonplandianum* (Jeeshna *et al.*, 2011; Nafees, 2016; Tripathy *et al.*, 2018).

Los extractos son mezclas complejas de metabolitos cuya composición depende de la especie, parte de la planta analizada (Banu *et al.*, 2016), el tamaño de partícula de la matriz sólida, la estación del año, el tipo y la habilidad del disolvente para extraer moléculas específicas, la temperatura y el procedimiento de extracción (Tiwari *et al.*, 2011; Dent *et al.*, 2013). La extracción de los compuestos desde la matriz se desarrolla en tres etapas: desorción de los componentes y su solubilización en el disolvente, la difusión interna a través de la fase sólida hacia la superficie, y la difusión de los componentes extraídos hacia el volumen líquido (Da Silva *et al.*, 2016), que culmina cuando se ha conseguido un equilibrio en su concentración (Mosca *et al.*, 2018).

En este caso, la diversidad de compuestos presentes en el EC se debe en gran medida a la afinidad y capacidad del etanol para difundirse a través del material vegetal y extraer los ingredientes intracelulares (Dent *et al.*, 2013). Regularmente, la cantidad de compuestos activos en las plantas medicinales es bajo (Zhang *et al.*, 2018), y la polaridad de los disolventes determina la naturaleza de los compuesto a extraerse (Jeeshna *et al.*, 2011).

Tabla 5. Perfil fitoquímico de EC.

No de ensayo	Compuestos /Prueba	Respuesta
1	Terpenoides	
	Salkowski	++
	Lieberman-Burchard	+++
2	Saponinas	
	Prueba de aceite	++
	Agitación	+
3	Fenoles	
	FeCl ₃	++
4	Flavonoides	
	Prueba de Shinoda	+
5	Taninos	
	FeCl ₃	+
6	Alcaloides	
	Ensayo de Dragendorff	+
	Ensayo de Meyer	+
7	Carbohidratos	
	Prueba de Benedict	++
	Compuestos glicosilados	+

+++ Altamente reactivo; ++ medianamente reactivo; + escasamente reactivo

En el perfil fitoquímico de EC se encontró una mayor presencia de compuestos de tipo terpenoide, especialmente de esteroides, que son conocidos por su capacidad antimicrobiana, antifúngica (Fernandes *et al.*, 2013) y antiinflamatoria (Azab *et al.*, 2016). En otras especies, como *C. betulinus*, *C. gladulosus*, *C. lucidus* y *C. yunquensis*, los terpenos de tipo esteroide han sido reconocidos como los compuestos mayoritarios (Payo-Hill *et al.*, 2001). En el género *Croton*, el β -sitosterol, estigmasterol (Nascimento *et al.*, 2017), ergosterol, gramisterol, lofenol, campesterol, e isofucosterol (Ndunda, 2014) son algunos de los esteroides identificados.

Los terpenoides son los metabolitos secundarios predominantes en el género *Croton* (Salatino *et al.*, 2007). De esta familia destacan los diterpenos que representan el 85% de los terpenos presentes (Wen-Hui *et al.*, 2018). Los clerodanos, tiglicanos, labdanos, kauranos, crotofolanos y

cembranos (Qiu *et al.*, 2016) son los más reportados. Los triterpenos, tanto pentacíclicos como esteroidales también han sido identificados, como el lupeol que posee actividad hepatoprotectora (Teugwa *et al.*, 2013) y antimicrobiana (Obey *et al.*, 2016), así como los compuestos volátiles que contienen mono y sesquiterpenos, como anetol y metileugenol (Salatino *et al.*, 2007).

Las saponinas son compuestos antiinflamatorios e hipocolesterolémicos, que se encuentran en la naturaleza como triterpenoides o glicósidos esteroidales. En su estructura, la presencia de una aglicona soluble en lípidos y un azúcar soluble en agua, les otorga características anfipáticas y de formación de espuma, aunque algunas saponinas no presentan esta característica (Oleszek & Hamed, 2010).

En la muestra de EC analizada, la formación de espuma fue de escasa a moderada. A pesar de que las saponinas son compuestos identificados en el género *Croton*, pocos estudios han aislado estos compuestos (Somit *et al.*, 2013; Zheng-Hong *et al.*, 2013), porque se reservan mayoritariamente en raíces y órganos reproductores de la planta, además de ser altamente solubles y sensibles tanto a la temperatura como a la presión (Moghimpour & Handali, 2015).

Otros grupos de compuestos que presentaron una respuesta moderada a las pruebas fitoquímicas fueron los fenoles y azúcares reductores. Entre los fenoles y flavonoides reportados en el género *Croton* se encuentran el ácido benzoico, ayanina, quercetina, kaempferol, metil 2,4-dihidroxi-3,6-dimetilbenzoato y la liquexantona, retusina y pachipodol (Morales-Flores *et al.*, 2007; Salatino *et al.*, 2007; Tala *et al.*, 2013). Los flavonoides tienen una alta afinidad para quelar metales y son antioxidantes que evitan el daño tisular asociado al estrés oxidativo (Visweswari *et al.*, 2018), poseen actividad antiinflamatoria, antialérgica, antiviral y anticarcinogénica (Abdalaziz *et al.*, 2016). De este grupo, la quercetina en particular es un potente antioxidante y conocido por su capacidad para modular la actividad de diferentes enzimas del sistema de defensa endógeno por su interacción con varias moléculas al penetrar la bicapa lipídica (De David *et al.*, 2011). Sin embargo, la participación de los flavonoides no destacó en el perfil fitoquímico de EC.

Los azúcares reductores son otro grupo de compuestos identificados en extractos de partes aéreas, y en distintos medios de extracción (Panda *et al.*, 2010; Kumar & Das, 2013; Abdalaziz *et*

al., 2016). La detección de compuestos glicosilados y azúcares reductores en el extracto puede relacionarse con los azúcares comúnmente encontrados en terpenos, esteroides y flavonoides (Guo-AnZou *et al.*, 2010).

Los taninos identificados en Croton se encuentran principalmente en forma de catequinas, epicatequinas y galocatequinas, que son los compuestos activos en el látex de las especies sangre de drago (Coy-Barrera *et al.*, 2016). Las especies de Croton también suelen ser ricas en compuestos de tipo alcaloide (Cordeiro *et al.*, 2016), aunque en el EC estos fitoquímicos mostraron una menor participación. Los alcaloides presentan propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antivirales, antitumorales y antioxidantes (Jayakumar & Murugan, 2016). Algunos alcaloides aislados del género son glaucina, talipofina, magnoflorina, esparsiflorina, wilsonirina, nuciferina, crosparina, crotoflorina, flavinina y taspina, (Ndunda, 2014; Burgos *et al.*, 2015).

Otros compuestos reportados en las plantas del género Croton son aminoácidos, antraquinonas, glucósidos cardiotónicos, cumarinas, ácidos grasos y la vitamina C (Maroyi, 2017b; Tripathy *et al.*, 2018), que no fueron determinados en EC.

6.2. Identificación de compuestos aislados de EC

Desde las fracciones FD y FAE se aislaron tres compuestos que de acuerdo con los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C RMN, se identificaron como hipoleina A (16 mg), hipoleina B (35 mg) y crotonpeno B (21 mg), mientras que un cuarto compuesto, identificado por ^1H RMN se trata del β -sitosterol (13 mg). Sus estructuras químicas se presentan en la Figura 15.

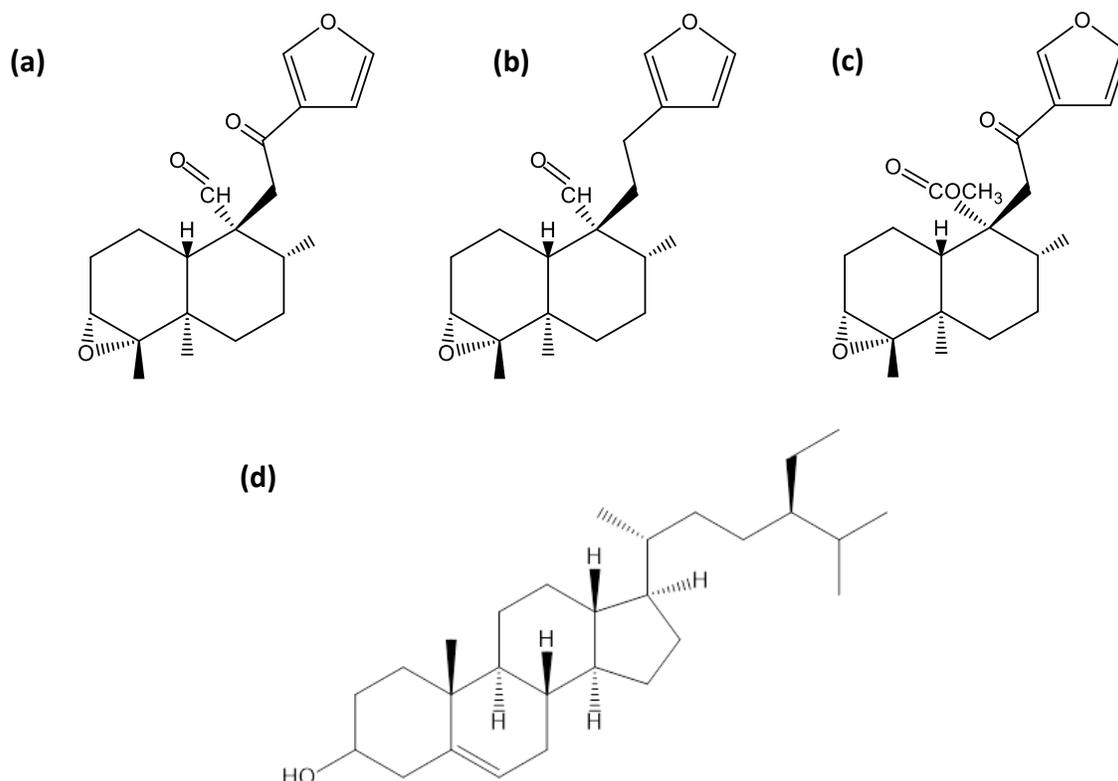


Figura 15. Compuestos aislados e identificados de FAE y FD de EC. Hipoleina A (a), hipoleina B (b), Crotonpeno C (c) y β -sitosterol (d).

Los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C de los compuestos aislados se presentan a continuación.

Hipoleina A: cristal blanco. ^1H RMN (300 MHz) CDCl_3 : δ (ppm) 9.90 (s, H-20), 8.05 (s, H-16), 7.43 (t, H-15), 6.74 (d, H-14), α 3.26 (d, H-11), 2.93 (s, H-3), β 2.80 (d, H-11), 2.20-2.11 (m, H-8), β 2.06-1.99 (m, H-2), 1.95 (d, H-10), 1.84 (ddd, H-6), α 1.75 (ddd, H-6), α 1.62-1.55 (m, H-2), β 1.59 (m, H-6), β 1.43 (dd, H-1), 1.24 (s, H-18), 1.19 α (s, H-1), 0.95 (s, H-19), 1.05-0.99 (m, H-17). ^{13}C NMR (100 MHz) CDCl_3 : δ (ppm) 204.86 (C-20), 147.35 (C-16), 144.55 (C-15), 108.76 (C-14), 62.40 (C-3), 62.0 (C-2), 48.76 (C-10), 38.70 (C-11), 37.45 (C-5), 36.34 (C-6), 37.45 (C-5), 35.53 (C-8), 28.32 (C-7), 19.89 (C-18), 17.82 (C-19), 17.46 (C-17), 16.73 (C-1).

Hipoleina B: aceite amarillo. ^1H RMN (400 MHz) CDCl_3 : δ (ppm) 9.92 (s, H-20), 7.96 (s, H-16), 7.37 (dd, $J=1.6, 1.6$, H-15), 6.24 (dd, $J=1.6, 0.4$, H-14), β 2.30, α 2.17 (H-12), α 1.63 (H-8), α 1.66, β 1.65 (H-7), α 1.77, β 1.46 (H-6), α 0.95 (H-19), β 1.20 (H-18), α 1.90, β 2.15 (m, H-2), α 1.37, β 1.53b (m, H-1). ^{13}C NMR (100 MHz) CDCl_3 : δ (ppm) 206.9 (C-20), 146.75 (C-16), 138.58 (C-15), 124.72 (C-

13), 110.86 (C-14), 60.15 (C-3), 53.27 (C-9), 37.27 (C-5, C-6), 35.29 (C-8), 29.70 (C-11), 27.79 (C-2, C-7), 19.78 (C-18), 17.56 (C-12), 17.45 (C-19), 17.82 (C-17), 15.86 (C-1).

Crotonpeno B: aceite incoloro. ^1H RMN (400 MHz) CDCl_3 : δ (ppm) 7.96 (s, H-16), 7.37 (dd, $J=1.6, 1.6$, H-15), 6.24 (dd, $J=1.6, 0.4$, H-14), 3.63 (br. s, H-20), α 2.07, β 2.17, H-2), β 1.84 (m, H-10), β 1.81 (m, H-8), α 1.70 (d, $J=1.2$, H-6, H-7), β 1.48, α 1.58 (dd, $J=2, 1.6$, H-1), β 1.47 (m, H-6), β 1.46 (m, H-7), 1.19 (s, H-18), 1.10 (s, H-17), 0.89 (s, H-19). ^{13}C NMR (100 MHz) CDCl_3 : δ (ppm) 195.21 (C-12), 173.88 (C-20), 146.75 (C-16), 144.03 (C-15), 128.28 (C-13), 108.87 (C-14), 51.43 (C-20), 43.12 (C-11), 38.40 (C-8). 37.27 (C-5, C-6), 27.97 (C-2), 19.78 (C-18), 18.63 (C-1), 17.98 (C-17), 14.11 (C-19).

β -sitosterol. Cristal en forma de aguja. ^1H RMN (300 MHz) CDCl_3 : δ (ppm) β 5.35 (d, H-28), β 3.63-3.45 (m, H-21), 2.37-2.16 (m, H-23, H-29), 1.99 (ddt, H-17, H-18, H-16, H-27, H-23, H-24), 1.93-1.74 (m, H-14, H-15, H-20, H-22, H-24, H-26), 1.5 (m, H-2, H-3, H-9, H-19, H-20, H-27), 1.12 (m, H-28, H-8, H-11, H-21, H-24, H-27), 1.008 (s, H-12, H-7, H-29, H-25, H-23, 23'), 0.93 (s, H-3, H-11, H-12, H-29, H-15, H-19), 0.82 (s, H-2, H-4, H-1, H-6, H-19), 0.68 (s, H-1, H-4, H-7, H-28).

Las Figuras 16-22 muestran los espectros de ^1H y ^{13}C RMN de los compuestos aislados. En el caso del β -sitosterol (Figura 22) solo se muestra el espectro de ^1H RMN debido a que se trata de un compuesto muy conocido y ampliamente identificado a través de este análisis.

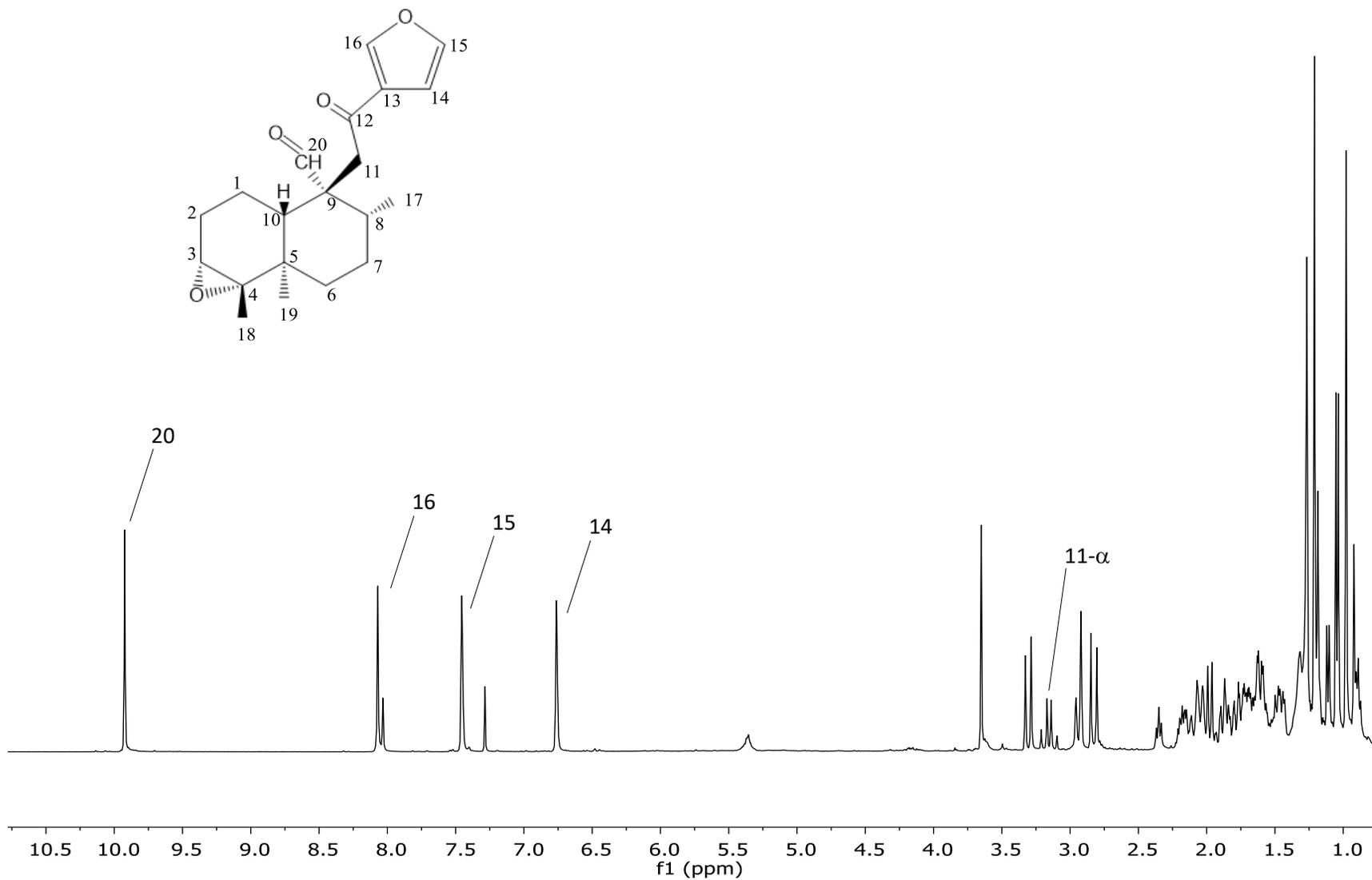


Figura 16. Espectro de de RMN de ^1H (400 MHz) en CDCl_3 de la hipoleina A.

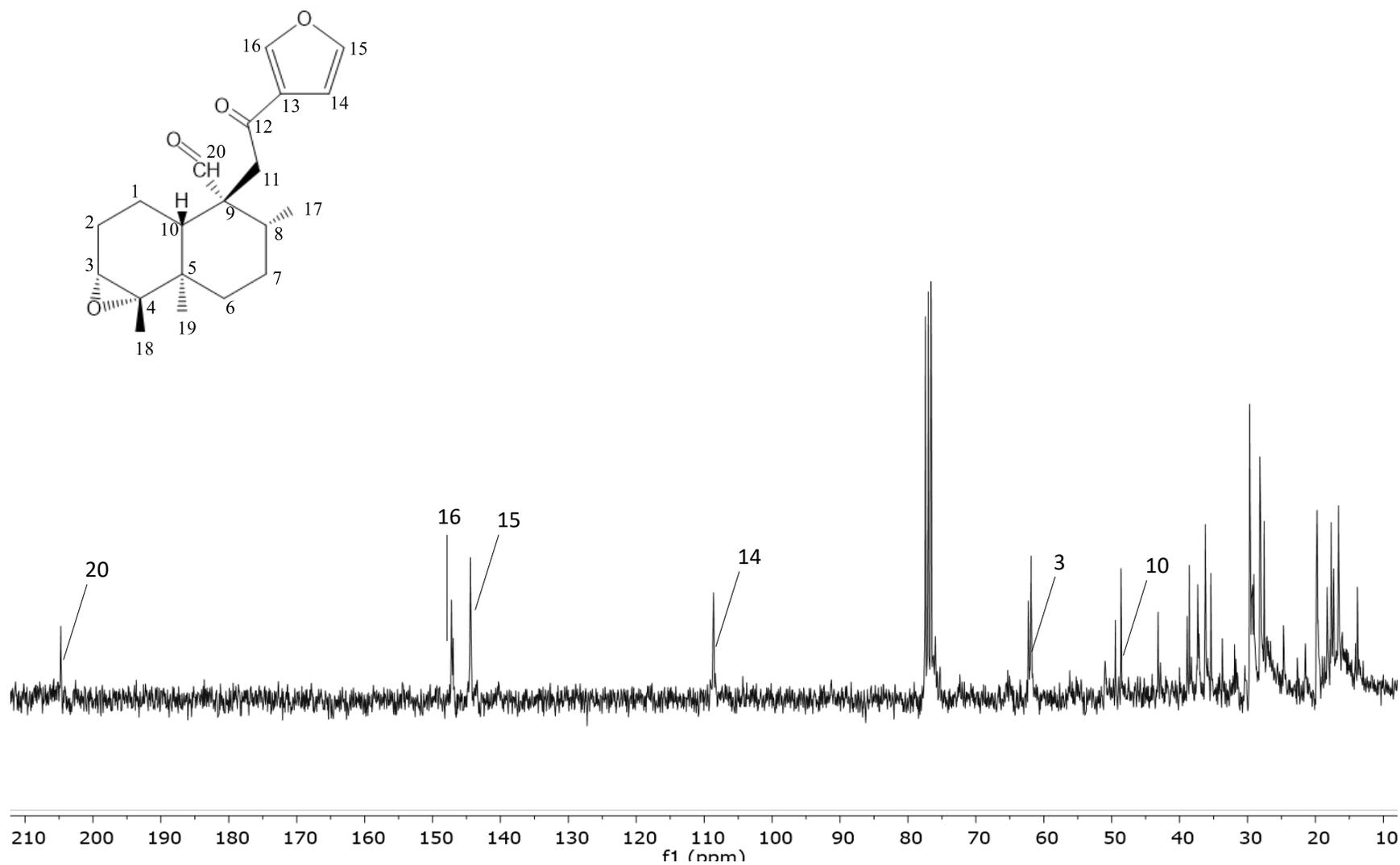


Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) en CDCl_3 de la hipoleina A.

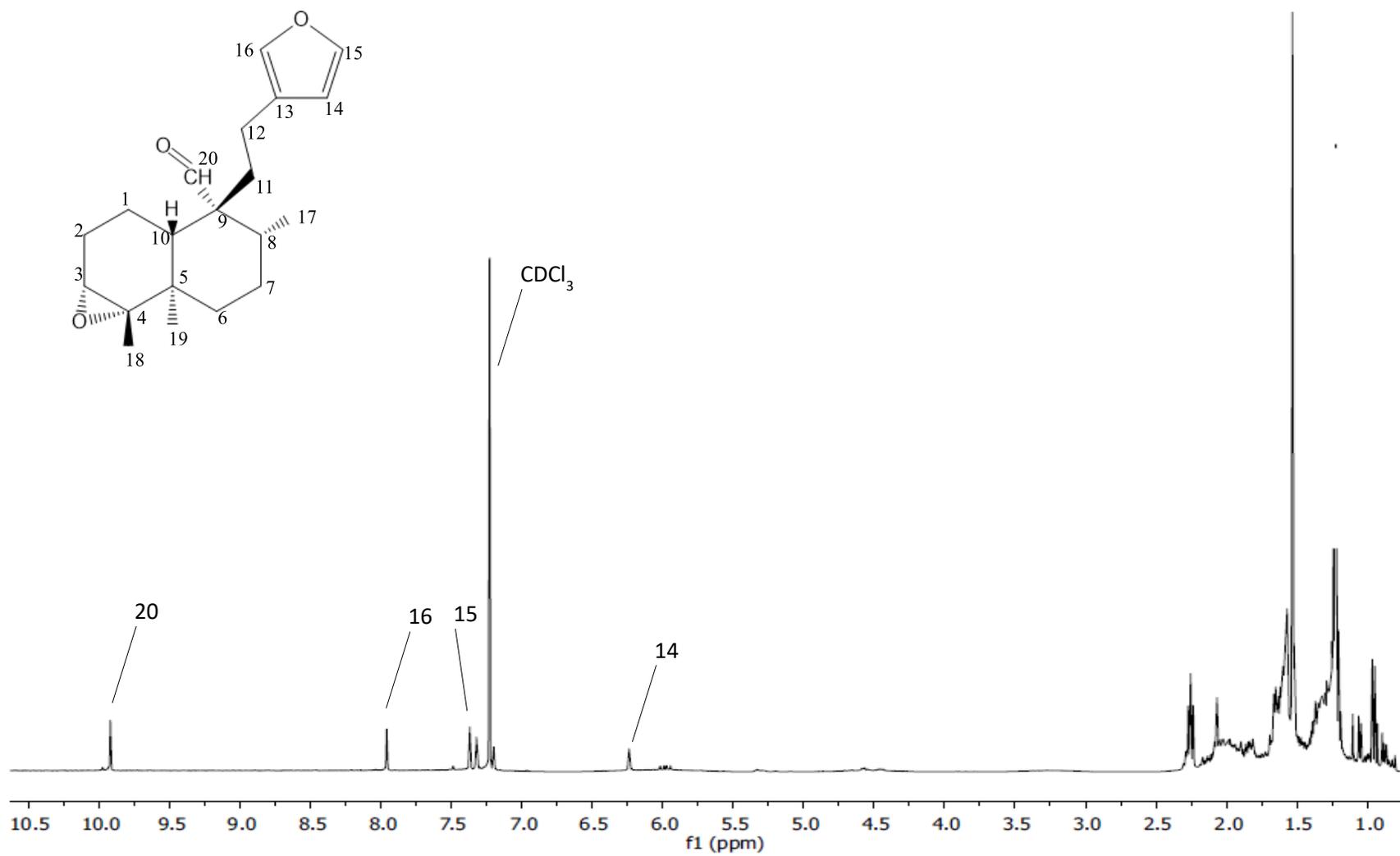


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) en CDCl_3 de la hipoleina B.

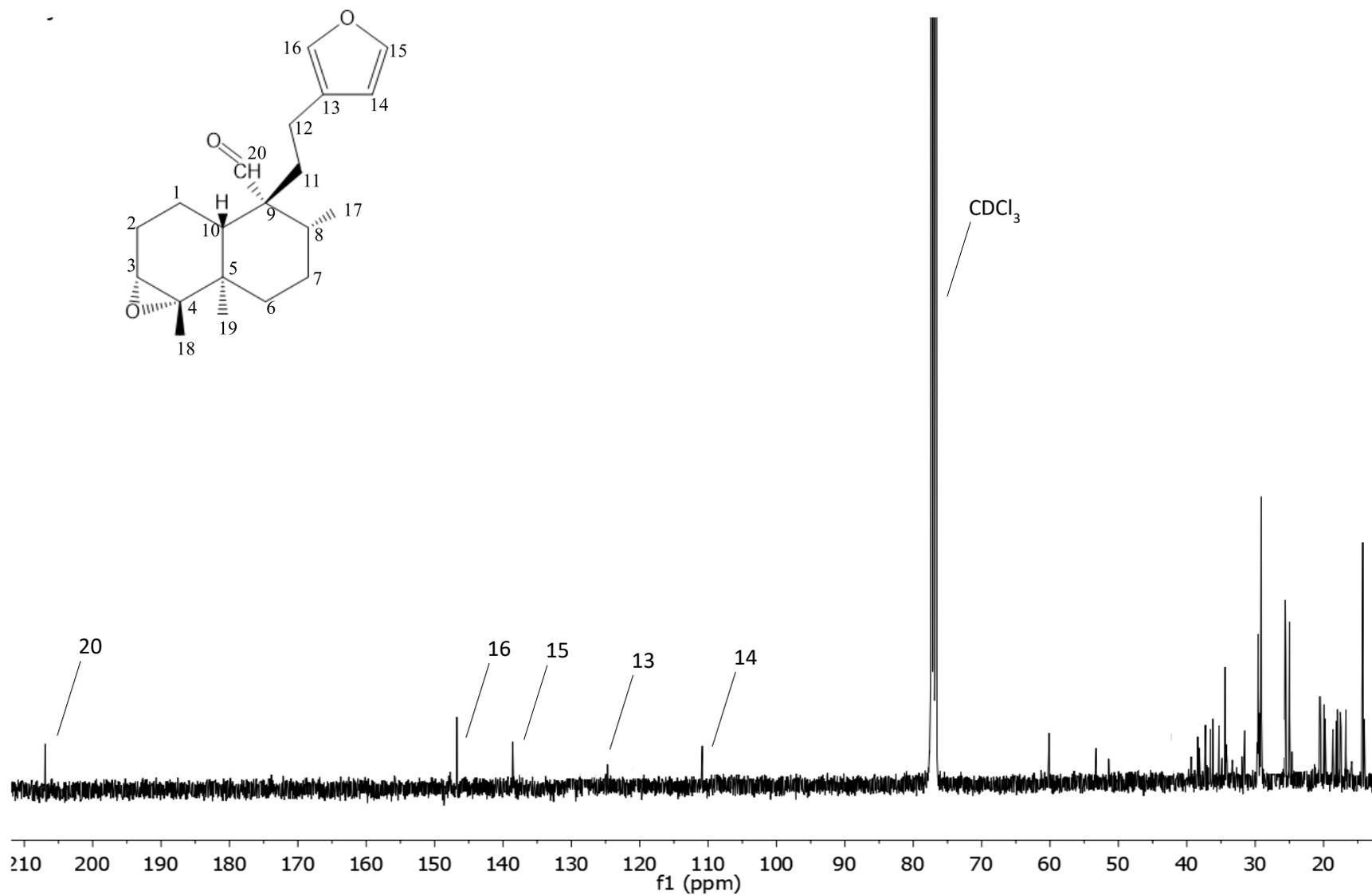


Figura 19. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) del compuesto hipoleina B.

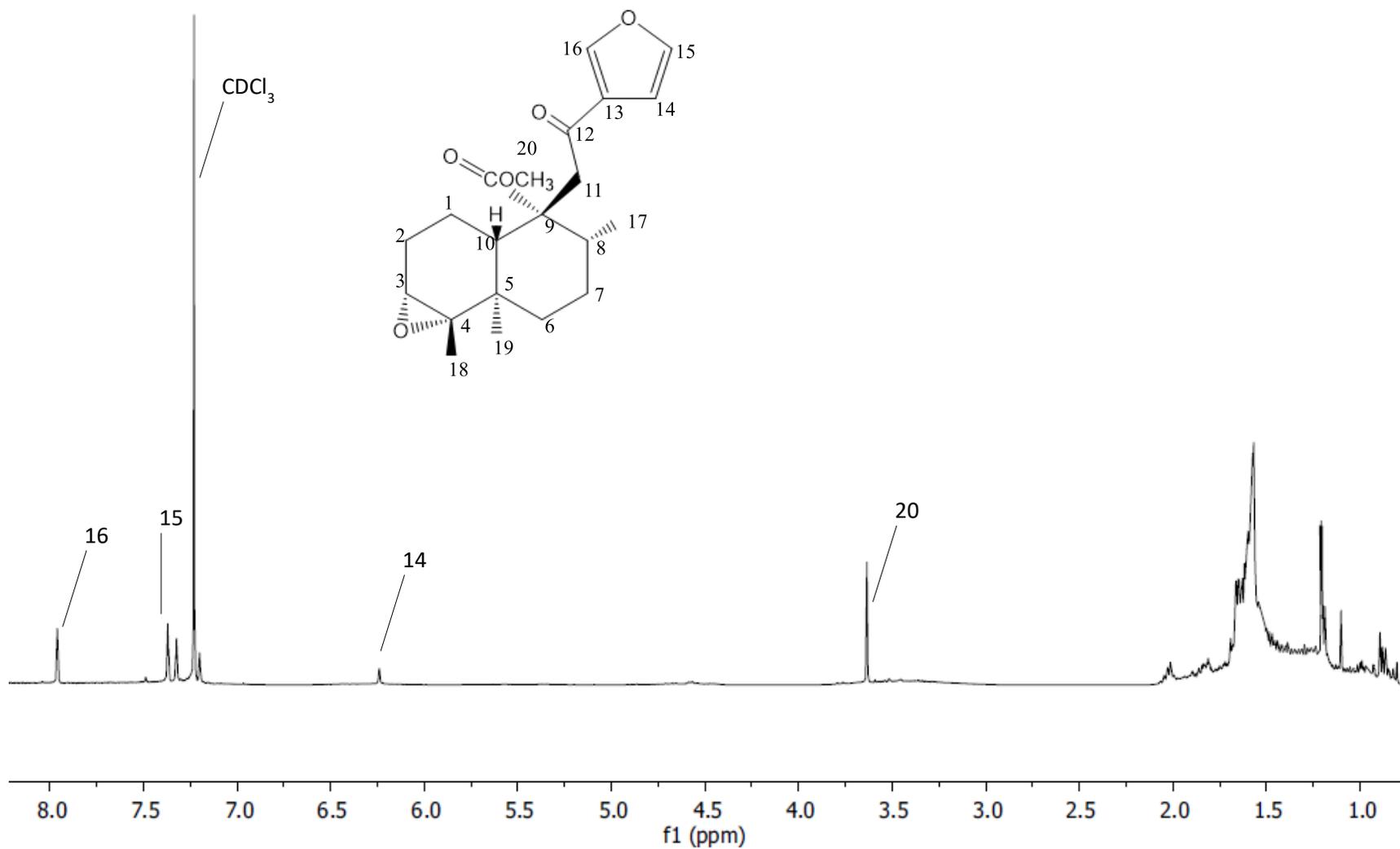


Figura 20. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) en CDCl₃ del compuesto Crotonpeno B.

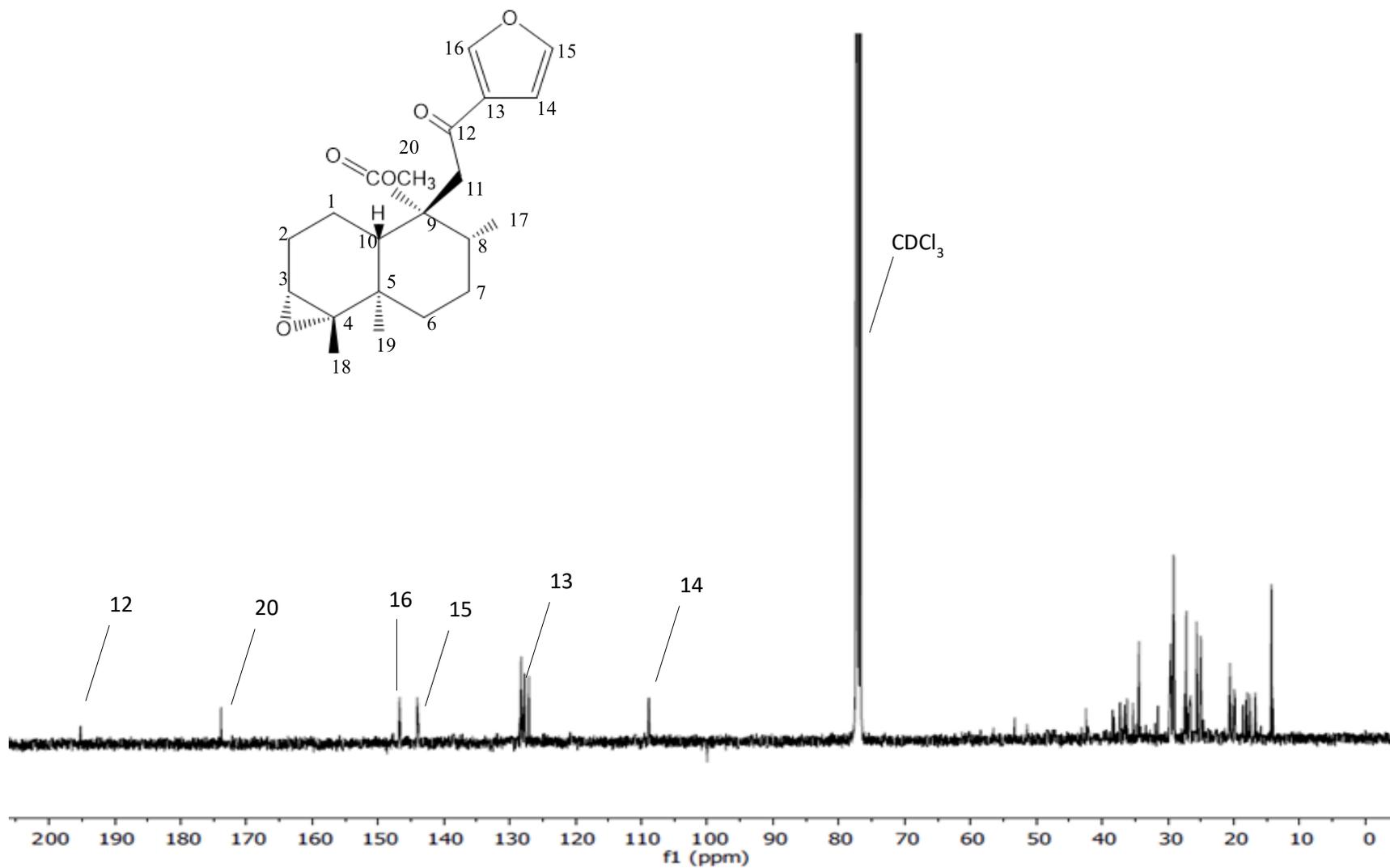


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C (100 Mz) en CDCl_3 del compuesto Crotonpeno B.

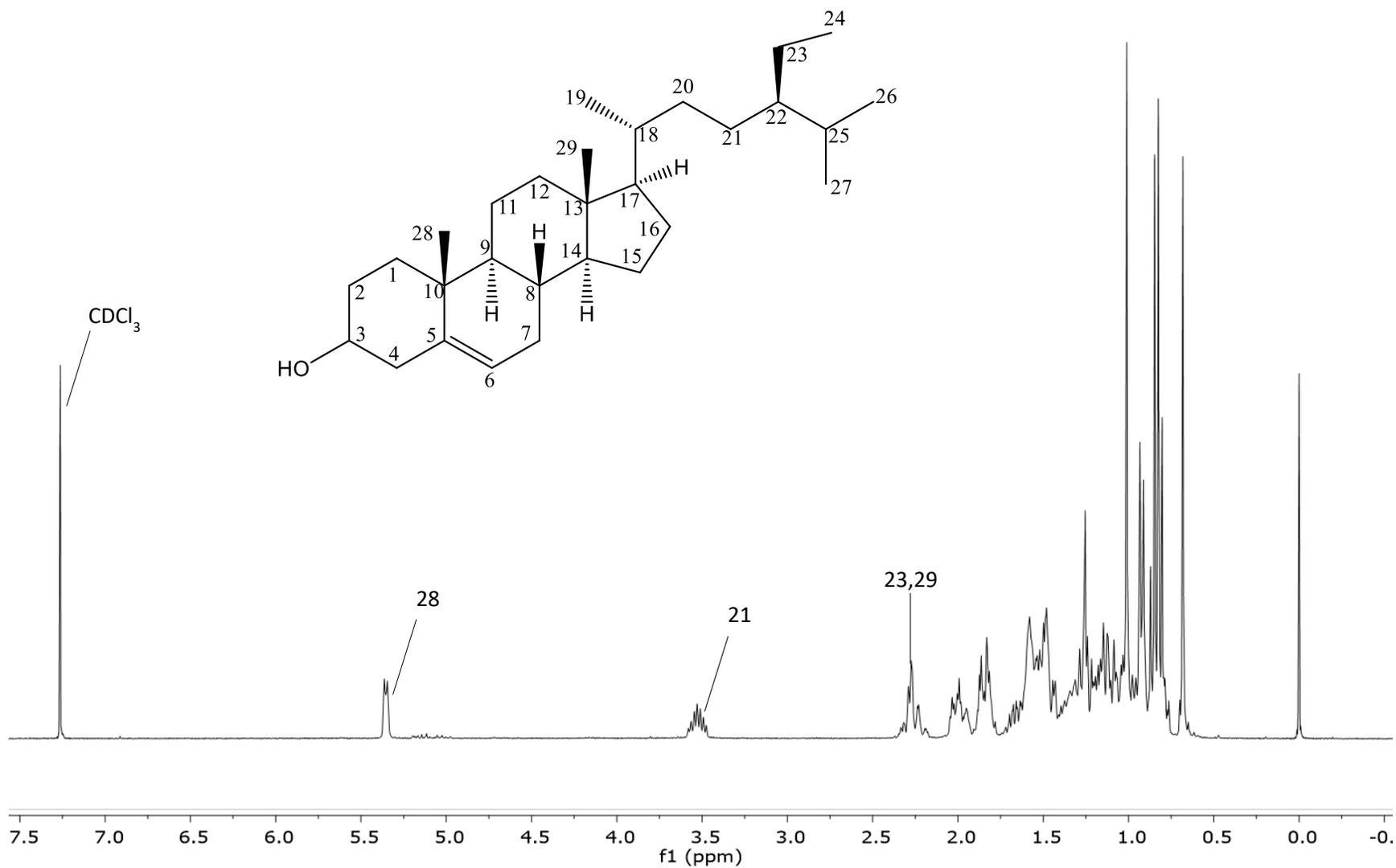


Figura 22. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) en CDCl_3 del compuesto β -sitosterol.

Tanto el crotonpeno B como las hipoleinas A y B fueron previamente aislados por Velázquez-Jiménez *et al.* (2018) y Sun *et al.* (2014) de los extractos metanólico y hexánico de las partes aéreas de *C. yanhuui* y *C. hypoleucus*, respectivamente. El espectro de ^1H RMN de la hipoleina B indica la presencia de tres grupos metilo entre los desplazamientos de 0.86 y 1.2 ppm (H17 al H19), así como las señales atribuidas a la presencia del anillo furano entre 6.2 y 8 ppm (H14 al H16) y el aldehído en 9.9 ppm, que fueron observadas en la hipoleina A, que a diferencia de la hipoleina B, presenta un grupo carbonilo en la posición 12. Estas señales se corroboraron con los desplazamientos de ^{13}C RMN descritos en la bibliografía. El crotonpeno B presentó un patrón de desplazamiento similar, con la diferencia de que carece del grupo aldehído.

Los diterpenos son los compuestos más abundantes en las especies de Croton (Salatino *et al.*, 2007). Estos metabolitos, generalmente de sabor amargo, son conocidos por sus propiedades antimicrobianas, antivirales, anti-inflamatorias, citotóxicas, hepatoprotectoras (Krishnamurthy *et al.*, 2010; Wan Chao & Lin, 2011) e inhibidoras de la actividad del óxido nítrico (Lin-Gen *et al.*, 2016).

Tanto las hipoleinas A-B como el crotonpeno B son diterpenos de tipo clerodano conformados por un par de anillos (A y B) y una cadena hidrocarbonada unida en la posición 9 (Silva *et al.*, 2011) y a su vez se clasifican como furanoditerpenoides, por la presencia de uno o más anillos furano (Bao *et al.*, 2016). Los anillos furano son propensos a la formación de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas con residuos de proteína, actuando como farmacóforos, y siendo responsables de la actividad biológica (Munro *et al.*, 2005). Aunque su transformación metabólica a través de CYP450 puede conducir a la formación de epóxidos reactivos (Loeper *et al.*, 1994), algunos furanoditerpenos como la salvinorina A, aislada de la especie *Salvia divinorum*, y el Kahweol, han demostrado que poseen propiedades analgésicas y antiinflamatorias, respectivamente (Roth *et al.*, 2001; Fukuma *et al.*, 2015).

En las especies de Croton, algunos furanoditerpenoides han sido evaluados por sus actividades citotóxicas contra líneas celulares de cáncer hepático, mamario, colon, pulmón, estómago (Pudhom & Sommit, 2011), leucemia humana (Liu *et al.*, 2014) y la actividad anti-ureasa (Fongang-Fotsing *et al.*, 2019).

Por otra parte, el β -sitosterol es un triterpeno que posee un amplio espectro de efectos farmacológicos, entre ellos su capacidad protectora contra la obesidad, diabetes, el cáncer (Cao *et al.*, 2019), hipercolesterolemia y fibrosis cística (Lampronti *et al.*, 2017). Su efecto hepatoprotector ha sido estudiado por Devaraj *et al.* (2020) que demostraron que el β -sitosterol mejoró los niveles de marcadores bioquímicos, el sistema antioxidante por SOD y Cat, y redujo significativamente los niveles de lipoperoxidación y marcadores fibróticos en ratas con daño hepático inducido por CCl₄. En el trabajo realizado por Kim *et al.* (2014), el β -sitosterol presentó un potencial terapéutico contra la fibrosis hepática, usando células esterales activas y un modelo de fibrosis inducida por dimetilnitrosamina. Aunque el β -sitosterol se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, y ha sido identificado en especies de Croton como *C. draco*, *C. urucurana*, *C. cajucada*, *C. cordiifolius*, *C. macrostachyus*, *C. caudatus* y *C. arboreus* (Salatino *et al.*, 2007), pocos estudios han establecido su relación con la protección hepática.

En el presente trabajo se sugiere que β -sitosterol puede relacionarse con la actividad hepatoprotectora de EC.

B. ESTUDIO FARMACOLÓGICO

6.3. DL₅₀ de EC

La prueba de toxicidad aguda consiste en la evaluación de un síndrome tóxico producido por una dosis o pocas dosis de un compuesto, extracto o fármaco administrado en el transcurso de un día (Parasuraman, 2011). En el ensayo DL₅₀ ningún animal murió durante los 14 días de observación después de las dosis de 10, 100, 1000 mg. de EC/ kg de peso en la primera fase, y 1600, 2900 y 5000 mg. de extracto crudo/ kg de peso en la segunda fase del estudio (Tabla 6).

Tabla 6. DL₅₀ de EC.

Extracto	Dosis intragástrica (mg/ kg)		
	10	100	1000
Fase I	10	100	1000
Mortalidad	0/3	0/3	0/3
Fase II	1600	2900	5000
Mortalidad	0/3	0/3	0/3
DL₅₀	>5000		

Durante el periodo de observación, las ratas comieron e incrementaron su masa corporal con normalidad. Condiciones como la dificultad para respirar, la pérdida de apetito y la muerte son señales de toxicidad (Bulus *et al.*, 2011), que no fueron observadas en el presente estudio. En la evaluación postmortem, el hígado, el bazo, los pulmones, los riñones y el estómago presentaron morfología macroscópica de hígado, pulmones, riñones, estómago y bazo mostraron color y morfología normal, comparado con el vehículo.

Muchas especies de la familia *Euphorbiaceae* son conocidas en diferentes partes del mundo como plantas tóxicas y/o medicinales. Sus efectos son el reflejo de la gran diversidad química de este grupo. Entre estas sustancias químicas se incluyen a los alcaloides y a los ésteres de forbol, dos grupos de compuestos presentes en especies del género *Croton* (Salatino *et al.*, 2007).

Diferentes extractos y aceites esenciales de especies de *Croton*, tales como *C. membranaceus*, *C. sparsiflorus*, *C. bonplandianum* y *C. zehntneri* se han evaluado para determinar su nivel de toxicidad a diferentes dosis, que van de 300 hasta 5000 mg/kg (Asare *et al.*, 2011; Jaya *et al.*,

2014; Sridhar, 2013) y son consideradas seguras. Sin embargo, la dosis de 477.18 mg/kg de aceite esencial de *C. polyandrus* produjo la muerte de los ratones de experimentación (Meireles *et al.*, 2016). La toxicidad del extracto depende de varios factores, tales como la composición química, la dosis y el tiempo de exposición. En el presente trabajo las ratas sobrevivieron a todas las dosis evaluadas durante las dos semanas de estudio, y una dosis mayor a 5000 mg/kg sugiere que EC no es tóxico (Lorke, 1983).

6.4. Actividad antioxidante de EC

La actividad antioxidante se evaluó a través del ensayo de DPPH, que determina la capacidad de EC para eliminar los radicales libres y así proveer una medición de su potencial antioxidante (Da Silva Brito *et al.*, 2018); así como por el ensayo de FRAP, que evalúa la habilidad de EC para reducir el complejo férrico incoloro (Fe^{+3} -tripiridil-s-triazina-TPTZ) a un complejo azul ferroso (Fe^{+2} tripiridil-s-triazina) por mecanismo de donación de electrones presentes en la muestra (Dudonné *et al.*, 2009; Min *et al.*, 2011)

Para el ensayo de DPPH, las dosis probadas (2 a 6 mg/ml) mostraron una respuesta antioxidante dosis-dependiente, con un % de inhibición de 28.13 y 78.36% para 2 y 6 mg/ml, respectivamente. Este resultado coincide con el extracto etanólico de *C. zambesicus* que presentó un % de inhibición de 72% (Abdalaziz *et al.*, 2016). A partir de los resultados dosis-dependiente se estimó el valor Cl_{50} , como la concentración de extracto requerida para reducir la concentración inicial de DPPH en un 50 %, (Atoui *et al.*, 2005). Para el EC, el Cl_{50} fue de 0.6307 mg eq. Trolox/ml. Los extractos de hojas de *C. rivinifolius*, *C. argyrophyllus* y *C. heliotropiifolius* presentaron un Cl_{50} de 0.14, 0.22 y 0.352 mg eq. Trolox/ml, respectivamente (Rondon *et al.*, 2015; Da Silva Brito *et al.*, 2018), lo que indica que una mayor cantidad o concentración de EC fue necesaria para inhibir la acción del radical DPPH, como potencial antioxidante (Teixeira *et al.*, 2007). En este tipo de ensayos, el número de moléculas de DPPH que se reducen suelen relacionarse con el número de grupos hidroxilo disponibles. Aunque la mayoría de los extractos etanólicos se componen por moléculas polares con abundancia de grupos hidroxilo libres, como fenoles y taninos (Rondon *et al.*, 2015), en el caso de EC, en correspondencia con el perfil fitoquímico, estos compuestos no se encuentran en mayor abundancia.

Para el ensayo de FRAP, EC tuvo una capacidad reductora de hierro de $279.8 \pm 3.3 \mu\text{M. eq. Fe}^{2+}/\text{mg}$. La composición del extracto es preponderante en la actividad antioxidante. Los extractos de hojas presentan una mayor actividad y menor CI_{50} que aquellos obtenidos de los tallos., así como aquellos ricos en compuestos fenólicos de tipo flavonoide (Abdalaziz *et al.*, 2016), como quercetina, kaempferol y quercitrina (Salatino *et al.*, 2007). Los aceites esenciales son ricos en espatulenol, cariofileno, germacreno y otros minoritarios que contienen hidrógenos alílicos y que contribuyen a la acción antioxidante (Morais *et al.*, 2019). Otros compuestos como carotenoides y fitoesteroles también presentan actividad antioxidante (Abdalaziz *et al.*, 2016).

En el EC se identificó la presencia limitada de compuestos de tipo flavonoides, así que la sinergia con otros compuestos, como terpenos (Sánchez-Peralta *et al.*, 2015), podría contribuir a su capacidad antioxidante (Banu *et al.*, 2016) y así ejercer un efecto antioxidante por romper la cadena de radicales libres al donar átomos de hidrógeno (Alam *et al.*, 2011). Los fitoquímicos con potencial antioxidante pueden contribuir a reducir la formación de metabolitos tóxicos de TAA generados durante su metabolismo y así proveer una protección hepática (Kaur *et al.*, 2019).

Existen diferentes mecanismos por los que los antioxidantes ejercen sus propiedades captadoras de radicales libres: actúan como barrera física para prevenir la generación de especies reactivas de oxígeno y su acceso a sitios biológicos importantes; forman una trampa química absorbiendo energía y quelando electrones; constituyen un sistema catalítico captador de especies reactivas; por medio de la unión a puntos diana de iones metálicos previniendo la formación de especies reactivas y rompiendo cadenas de oxido reducción (Mierziak *et al.*, 2014).

En su mayoría, los antioxidantes dependen de la tasa de transferencia de átomos de hidrógeno desde los compuestos hacia los radicales (Shon *et al.*, 2007). Los resultados de este experimento indican que EC contiene compuestos potenciales para donar átomos de hidrógeno a radicales libres y hacerlos más estables. La capacidad de EC para eliminar el radical DPPH y reducir Fe^{+3} puede contribuir en la disminución de los efectos del estrés oxidativo. El descubrimiento de compuestos antioxidantes es crítico para el descubrimiento de fármacos y el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Mierziak *et al.*, 2014).

6.5. Evaluación de parámetros bioquímicos

Un biomarcador es una molécula que se puede medir por técnicas analíticas bien establecidas y que evidencian el estado clínico, toxicológico y farmacológico de un organismo (Hunter *et al.*, 2010). En este sentido, los parámetros bioquímicos de ALT, AST, FAL, BIL-D, BIL-T, GGT, DHL, PT y ALB fueron evaluados.

6.5.1. Transaminasas

La evaluación de los parámetros bioquímicos se realizó para determinar el grado de daño hepático y la capacidad del extracto para recuperar la funcionalidad del hígado a sus estados basales. Las Figuras 23 y 24 muestran el efecto de TAA sobre los niveles de las enzimas transaminasas. De forma destacable, el grupo TAA presentó los mayores niveles de ALT y AST y estos resultados contrastan con el resto de los tratamientos. En cambio, en el grupo EC+TAA se presentó un decremento de 65.9 y 75.8% para ALT y AST respectivamente, en comparación con TAA, y mostró diferencias significativas entre los grupos EC y CT que no presentaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre sí.

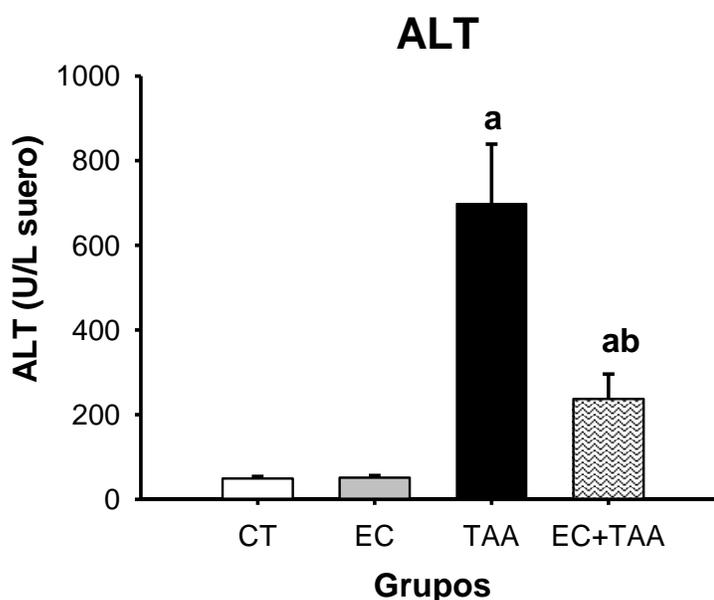


Figura 23. Efecto de EC sobre los niveles de ALT en el suero de ratas con adañio hepático agudo inducido por TAA. Los resultados son expresados en U/L. Las barras representan la media con el error estándar, $n=8$ por duplicado. Las diferencias con el vehículo (CT) son expresadas como **a**; mientras que las diferencias respecto a TAA con la letra **b**, $p<0.05$.

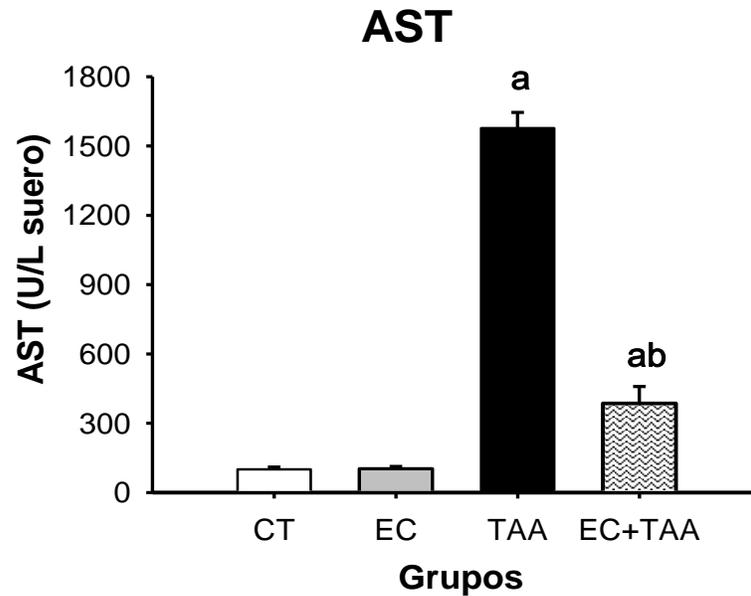


Figura 24. Efecto de EC sobre los niveles de AST en el suero de ratas con adañõ hepático agudo inducido por TAA. Los resultados son expresados en U/L. Las barras representan la media con el error estándar, n=8 por duplicado. Las diferencias con el vehículo (CT) son expresadas como **a**; mientras que las diferencias respecto a TAA con la letra **b**, $p < 0.05$.

El daño hepático inducido por xenobióticos se caracteriza por la liberación de las enzimas hepáticas al suero debido a la necrosis de los hepatocitos (Mirmiran *et al.*, 2019), y los resultados observados concuerdan con los trabajos realizados por otros autores (Miguel *et al.*, 2017) en modelos de necrosis hepática por una dosis aguda de TAA. El comportamiento de EC+TAA podría estar fuertemente relacionado a la capacidad de EC para proteger la célula del daño necrótico producido por TAA y reducir la tasa de liberación de transaminasas, así como contribuir a la estabilización de la membrana (Marchyshak *et al.*, 2018).

La TAA es un agente tóxico que causa necrosis de los hepatocitos y contribuye al desarrollo de la cirrosis a través de múltiples mecanismos, tales como el estrés oxidativo, el descenso del sistema de defensa antioxidante y la peroxidación lipídica. Particularmente, las transaminasas ALT y AST son usadas como biomarcadores de necrosis hepatocelular y sus niveles describen la intensidad del daño (Singh *et al.*, 2011).

6.5.2. Fosfatasa alcalina (FAL)

FAL es una enzima hidrolasa que se elimina en la bilis. Está presente en las células de la membrana canalicular de los hepatocitos y los conductos biliares, así como en otros órganos incluyendo huesos, placenta, riñones e intestino (Lowe & John, 2020). El grupo EC+TAA mostró una reducción significativa de los niveles de FAL y que fue comparable a lo observado en los grupos EC+CT (Figura 25).

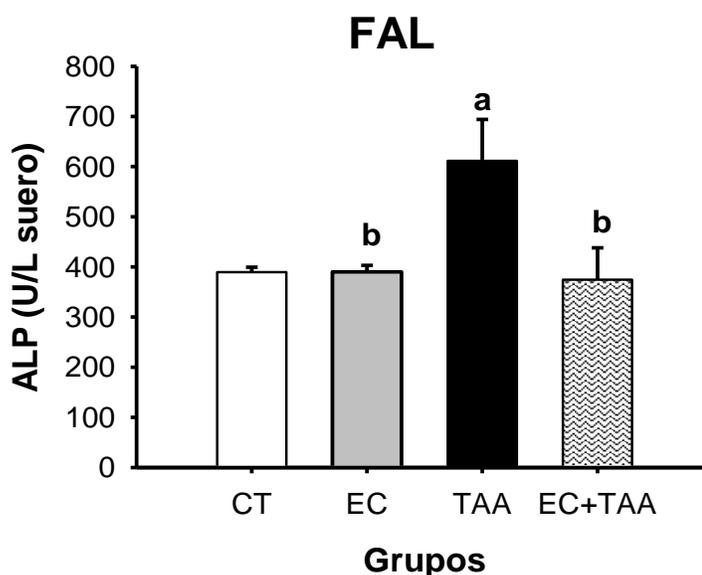


Figura 25. Efecto de EC sobre los niveles de FAL en el suero de ratas con daño hepático inducido por TAA. Los resultados son expresados en U/L. Las barras representan la media con error estándar, n=8, por duplicado. Las diferencias con el vehículo son expresadas como **a**; mientras que las diferencias respecto a TAA se expresan como **b**, $p < 0.05$.

La elevación de los valores normales de FAL, como se observó en el grupo TAA, se debe a la incapacidad del cuerpo para excretar la bilis acumulada, la obstrucción del tracto biliar (Church & Watkins, 2017), así como por el incremento en la síntesis de la enzima (Lowe & John) derivados de la acción del agente hepatotóxico. En este sentido, el decremento significativo en los niveles de FAL en EC y EC+TAA indica que los compuestos presentes en EC y su sinergia tienen la habilidad para reducir los efectos de la obstrucción biliar inducida por TAA al llevar los niveles de FAL a resultados comparables al grupo control.

6.5.3. Bilirrubina directa y bilirrubina total

Las Figuras 26 y 27 muestran que el grupo TAA presentó los mayores niveles de BIL-D y BIL-T en comparación con el resto de los tratamientos. Esto se debe a que la TAA conlleva a la inflamación y fibrosis de la triada portal, causante del bloqueo de los conductos biliares y la regurgitación de la bilirrubina no conjugada desde los hepatocitos dañados hacia los sinusoides (Alamri, 2019). Por otra parte, el grupo EC+TAA exhibió una reducción del 58 y 73% para BIL-D y BIL-T, respectivamente, lo que indica que EC contribuyó a regular la conjugación y excreción de la bilirrubina después de inducción de TAA.

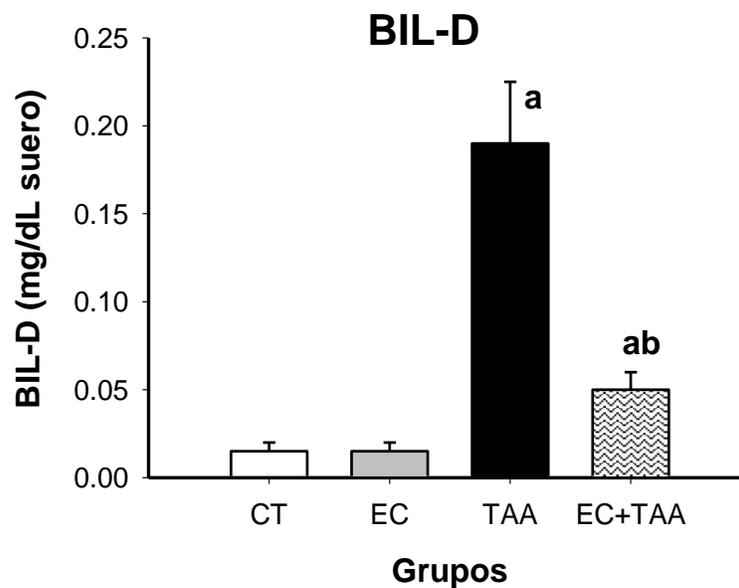


Figura 26. Efecto de EC sobre los niveles de BIL-D en el suero de ratas con daño hepático inducido por TAA. Los resultados son expresados en mg/dL. Las barras representan la media con error estándar, n=8, por duplicado. Las diferencias con el vehículo son expresadas como **a**; mientras que las diferencias respecto a TAA se expresan con **b**, $p < 0.05$.

La bilirrubina es el producto de la fragmentación regular de la hemoglobina y luego es liberada hacia la bilis (Bigoniya *et al.*, 2009). Sus niveles en suero son un reflejo de las condiciones necróticas de los hepatocitos (Akhtar *et al.*, 2016). Esta alteración junto con altos niveles de transaminasas son un signo de daño tóxico o agudo (Wang *et al.*, 2018).

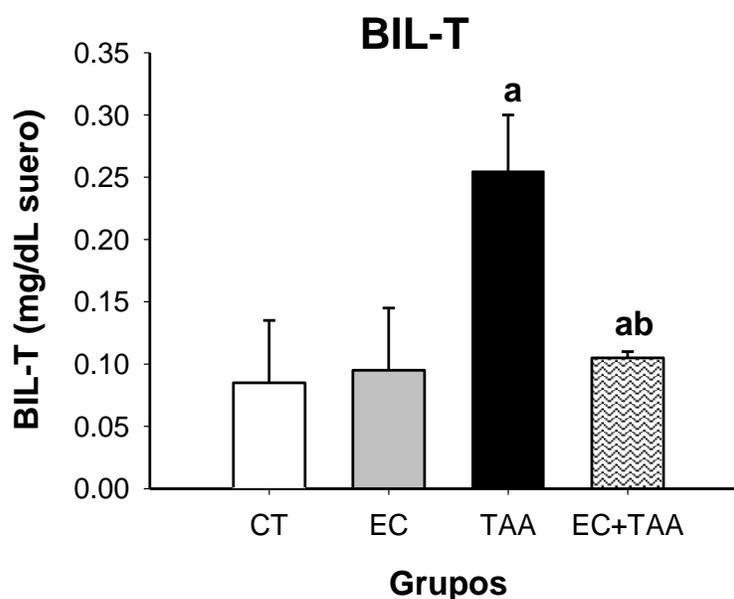


Figura 27. Efecto de EC sobre los niveles de BIL-T en el suero de ratas con daño hepático inducido por TAA. Los resultados son expresados en mg/dL. Las barras representan la media con error estándar, n=8, por duplicado. Las diferencias con el vehículo son expresadas como **a**; mientras que las diferencias respecto a TAA se expresan como **b**, $p < 0.05$.

6.5.4. Gamma glutamil transpeptidasa (GGT)

En el parámetro de GGT los grupos con TAA presentaron mayores niveles, a diferencia de EC+TAA que señaló una reducción del 99% (Figura 28). GGT es una enzima localizada en el hígado, riñones y páncreas, y su principal función en el hígado es la de catalizar la conjugación de las especies electrofílicas provenientes del metabolismo de TAA con GSH y facilitar la eliminación de los xenobióticos glutationizados. Cuando se elevan los niveles de GGT, se provoca la liberación de metales de transición potencialmente tóxicos, como hierro y cobre, que pueden participar en cadenas de reacciones prooxidantes responsables del daño celular, de ADN, así como al estrés oxidativo-nitrosativo. Estos efectos adversos ocurren por la acción de TAA (Stefano *et al.*, 2015).

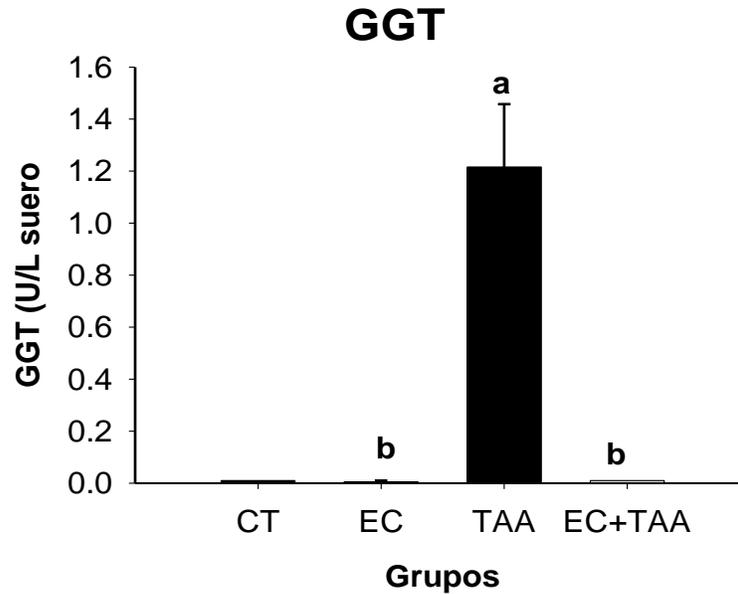


Figura 28. Efecto de EC sobre los niveles de GGT en el suero de ratas con daño hepático inducido por TAA. Los resultados son expresados en U/L. Las barras representan la media con error estándar, n=8, por duplicado. Las diferencias con el vehículo son expresadas como **a**; mientras que las diferencias respecto a TAA se expresan como **b**, $p > 0.05$.

El aumento en los niveles de GGT se debe a su liberación desde los hepatocitos al sistema circulatorio por cambios en la permeabilidad de la membrana y son reflejo del estrés oxidativo encaminado a la enfermedad crónica (Bigoniya *et al.*, 2009), o bien provenientes de los colangiocitos, cuyos niveles de GGT pueden ser hasta 200 veces más que en los hepatocitos (Visentin *et al.*, 2017). Aunque los mecanismos de inducción de GGT son inciertos, estos se han asociado con la proteína C-reactiva, un marcador general de estrés oxidativo, que conduce al sobreconsumo de GSH con un incremento compensatorio en la síntesis de GGT (Everhart & Wright, 2013; Koenig & Seneff, 2015).

6.5.5. Lactato deshidrogenasa (LDH)

LDH es una enzima esencial para la respiración anaerobia que convierte el ácido pirúvico, el producto final de la glucólisis, en ácido láctico y viceversa, con la producción de energía (Abdul-Hussein *et al.*, 2015; Chaudhary & Chauhan., 2015). Sus niveles en suero se incrementan en respuesta a la hipoxia, como un reflejo de la destrucción de los hepatocitos desde las primeras

etapas del daño (Sorensen *et al.*, 2007). En ausencia de la enfermedad hepática y muscular, es indicador de diferentes tipos de cáncer (Abdul-Huseein *et al.*, 2015; McGill *et al.*, 2017).

En la Figura 29 se observa que EC+TAA presentó una disminución importante en los niveles de esta enzima, mientras que el resultado observado en TAA ocurre en respuesta al daño celular, no específicamente en hígado. La inhibición farmacológica de LDH reduce en daño hepático y la apoptosis, desciende la expresión de citoquinas y mejor la tasa de sobrevivencia celular (Ferriera *et al.*, 2018).

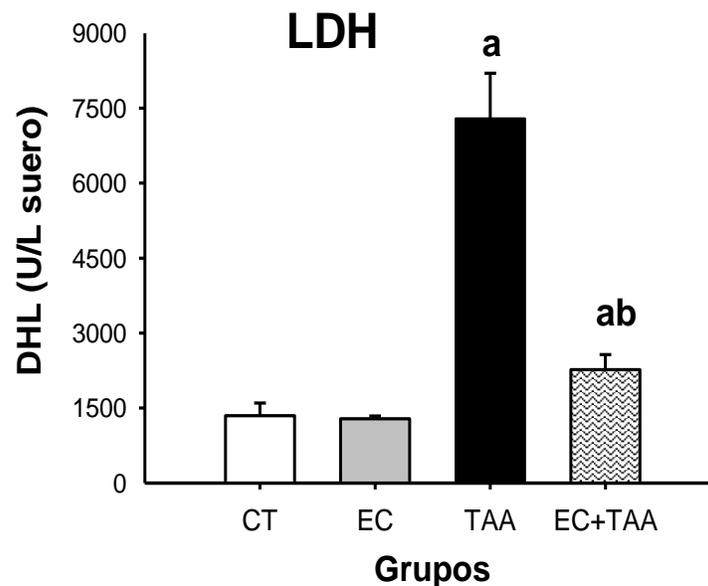


Figura 29. Efecto de EC sobre los niveles de LDH en el suero de ratas con daño hepático inducido por TAA. Los resultados son expresados en U/L. Las barras representan la media con error estándar, n=8, por duplicado. Las diferencias con el vehículo son expresadas como **a**; mientras que las diferencias respecto a TAA se expresan como **b**, $p < 0.05$.

6.5.6. Proteínas totales y albúmina

Los niveles de proteína en suero son marcadores de la intensidad del daño hepático debido a que los radicales libres producidos durante la biotransformación de TAA forman aductos con moléculas de esta naturaleza y el ADN, que afectan la capacidad del hígado para su síntesis (Gulati *et al.*, 2018). La oxidación de proteínas puede provocar la fragmentación, despliegue y plegamiento incorrecto, lo que resulta en la pérdida de la actividad (Headlamand & Davies, 2004).

En la Figuras 30 y 31 se observa que la administración de TAA provocó un ligero incremento en los niveles de proteínas totales y albúmina, respectivamente.

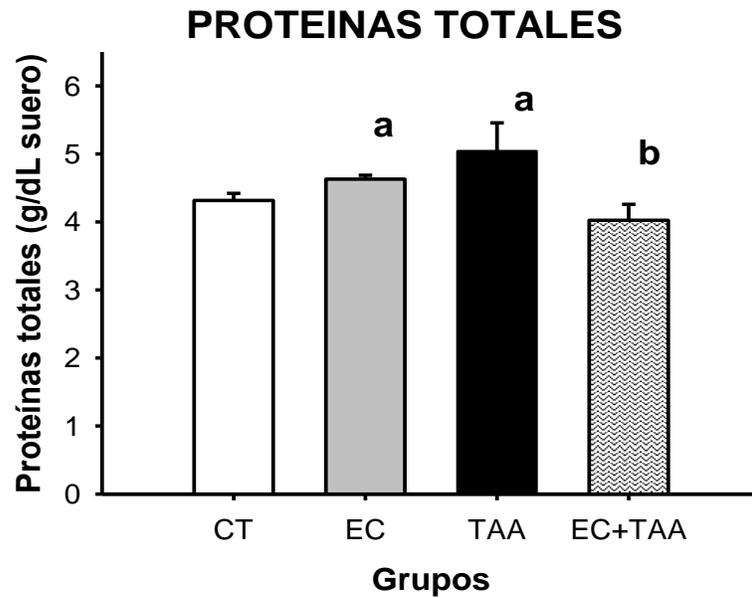


Figura 30. Efecto de EC sobre los niveles de proteínas totales en el suero de ratas con daño hepático inducido por TAA. Los resultados son expresados en g/dL. Las barras representan la media con error estándar, n=8, por duplicado. Las diferencias con el vehículo son expresadas como **a**; mientras que las diferencias respecto a TAA se expresan como **b**, $p < 0.05$.

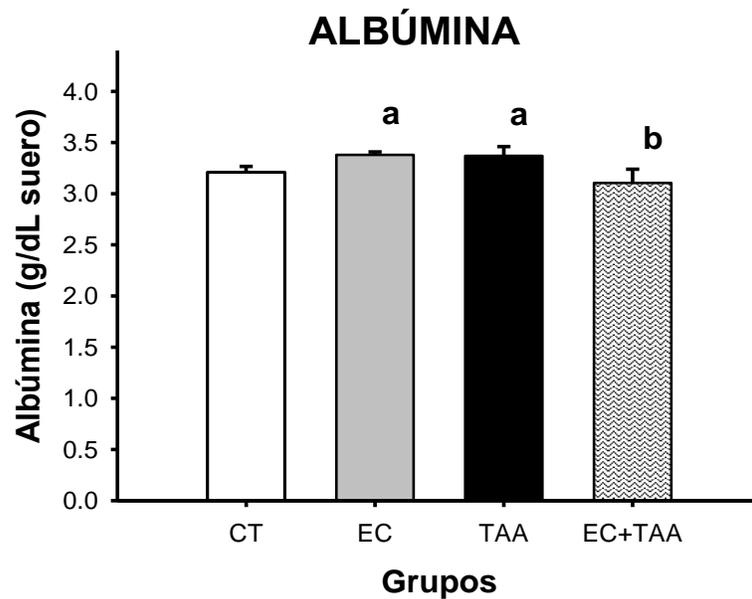


Figura 31. Efecto de EC sobre los niveles de albúmina en el suero de ratas con daño hepático inducido por TAA. Los resultados son expresados en g/dL. Las barras representan la media con error estándar, n=8, por duplicado. Las diferencias con el vehículo son expresadas como **a**; mientras que las diferencias respecto a TAA se expresan como **b**, $p < 0.05$.

Esta alteración se debe a su filtración hacia la circulación que provoca que se incrementen los niveles en suero (Gangadharan *et al.*, 2011). Por el contrario, el grupo EC+TAA los marcadores disminuyeron a valores comparables al grupo CT. Debido a que las proteínas tienen mayor diversidad estructural y estabilidad que el ADN y ARN, y llevan más información que los ácidos nucleicos, su alteración en el suero puede considerarse un reflejo de la fisiología celular (Aebersold *et al.*, 2005).

Los biomarcadores hepáticos describen la habilidad protectora de EC y sus fracciones contra los radicales libres y compuestos electrofílicos liberados desde la biotransformación de TAA, promoviendo la estabilidad celular, la depuración de enzimas transaminasas y bilirrubina, para mantener los niveles cercanos al grupo control, como se ha reportado en el extracto etanólico de *C. oblongifolius* (Ahmed *et al.*, 2002), el aceite esencial de *C. zehntneri* (Lima *et al.*, 2008), *C. sparsiflorus* (Jaya Santhi *et al.*, 2004), el extracto metanólico de *C. bonplandianus* (Dutta *et al.*, 2018) y *C. macrostachyus* (Yassab *et al.*, 2016), que han mostrado efectos antinecróticos contra CCl₄, paracetamol y N-nimetiltrinosamina. La regulación de los biomarcadores del hígado representa la recuperación del órgano a un estado normal (McGill *et al.*, 2017), donde terpenos, alcaloides, taninos y saponinas identificados en EC pueden ser los responsables de este efecto farmacológico.

6.6. Evaluación *in vitro* del sistema de defensa antioxidante endógeno

Los antioxidantes son un grupo constituido por moléculas y enzimas que actúan en sinergia para mejorar la defensa celular y combatir a las especies reactivas, donde cada antioxidante ataca a un agente oxidante específico para proveer protección en distintos ambientes celulares (Pisoschi & Pop, 2015) con un efecto interpendiente (Moussa *et al.*, 2019). Para el propósito de este trabajo, el efecto de EC fue evaluado a través de los niveles de SOD, Cat, GPx y GR como antioxidantes enzimáticos, así como en GSH como antioxidante no enzimático.

6.6.1. Superóxido dismutasa (SOD)

SOD es la primera y más poderosa enzima antioxidante presente en la célula. Actúa como un componente en la primera línea de defensa junto a Cat y GPx, a través de la dismutación de dos

moléculas del anión O_2^- a H_2O_2 y oxígeno molecular (Ighodaro & Akinloye, 2018), donde el H_2O_2 no es un radical pero rápidamente es convertido en el OH^\bullet , que es altamente reactivo, por medio de la reacción de Fenton o la intervención de Cat (Nandi *et al.*, 2019).

La Figura 32 muestra que, en comparación con el vehículo, los niveles de SOD de los grupos TAA y EC+TAA se redujeron a las 24 h después de la administración de TAA, sin encontrarse diferencias significativas entre sí ($p < 0.05$). Este fenómeno deriva de la hepatotoxicidad de TAA, cuya activación metabólica requiere de la formación de sus especies reactivas, TASO y TASO₂ (Hajovsky *et al.*, 2012), que se unen a lípidos microsomales conduciendo así a la peroxidación y la producción de ERO como OH^\bullet y O_2^- y H_2O_2 (De David *et al.*, 2011). Los productos de la peroxidación reaccionan con residuos de aminoácidos de SOD modificando los sitios de interacción enzima-sustrato, lo que provoca cambios microambientales y la pérdida de su actividad catalítica (Arya *et al.*, 2019).

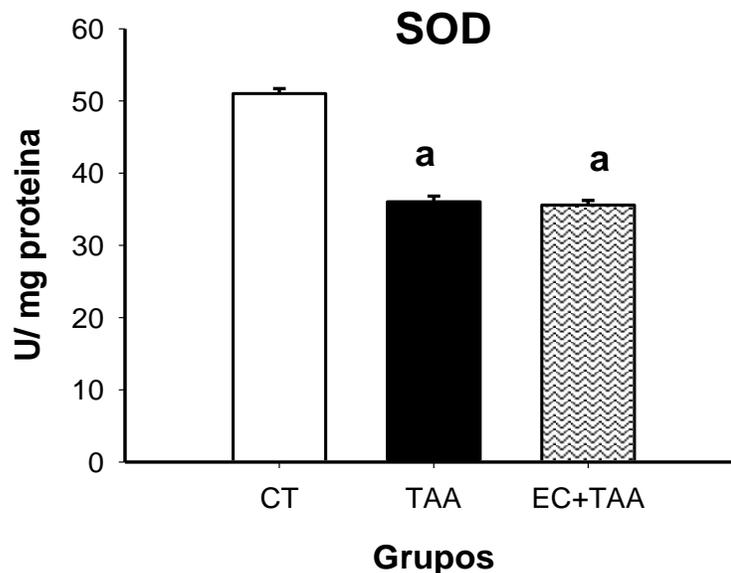


Figura 32. Niveles de SOD en hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA. Los resultados se expresan en U/mg de proteína. Las barras representan la media con error estándar, $n=8$, por duplicado. Las diferencias significativas respecto al vehículo se indican con **a**; mientras que las diferencias respecto a TAA son señaladas con **b**, $p < 0.05$.

6.6.2. Catalasa (Cat)

Cat es un antioxidante enzimático ampliamente distribuido en todos los tejidos animales. Descompone el H_2O_2 y protege a las células de los radicales $OH\bullet$ (Dudonné., 2009). Los $OH\bullet$ son las especies reactivas más potentes el sistema biológico y pueden reaccionar con ácidos grasos poliinsaturados y fosfolípidos de la membrana causando peroxidación, daño al ADN y a la célula (Dutta *et al.*, 2018). En este trabajo, tal como ocurrió en SOD, los niveles de Cat decrecieron en respuesta a la administración de TAA, aunque fue el grupo EC+TAA el que exhibió una mayor recuperación en los niveles (Figura 33).

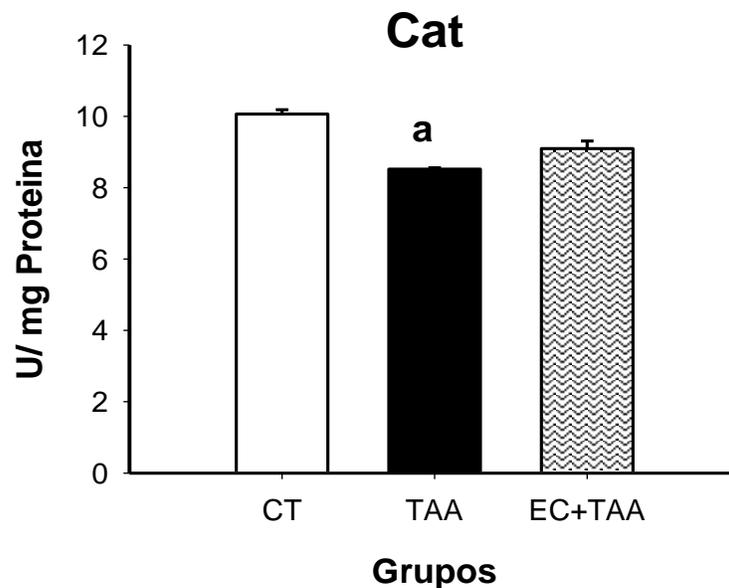


Figura 33. Niveles de Cat en hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA. Los resultados se expresan en U/mg de proteína. Las barras representan la media con error estándar, n=8, por duplicado. Las diferencias significativas respecto al vehículo se indican con **a**; mientras que las diferencias respecto a TAA son señaladas con **b**, $p < 0.05$.

La reducción en la actividad de Cat puede resultar en efectos adversos debido a la asimilación del anión O_2^- y el H_2O_2 (Gao *et al.*, 2013), que resulta en una intolerancia al oxígeno y promoción de reacciones de deterioro, oxidación de ADN, proteínas y muerte celular (De David *et al.*, 2011), así que su recuperación promueve la protección contra H_2O_2 y evita el daño celular. La administración de TAA a ratas puede causar cambios en la estructura celular, interferir en el

movimiento de ARN desde el núcleo al citoplasma, reducir el número de células viables, así como el consumo de oxígeno. En el mecanismo antioxidante, Cat otorga una protección mutua con SOD a través de su activación o desactivación cuando los agentes oxidantes son producidos (Li *et al.*, 2014).

6.6.3. Glutación (GSH y GSSG)

Glutación forma parte de la segunda línea de defensa antioxidante (Ighodaro & Akinloye, 2018), y actúa en conjunto con GPx, GR y glutación oxidasa (GOx) para mantener un ambiente celular reducido y combatir la formación de ERO. En este estudio, como respuesta al ataque de la TAA, los grupos TAA y EC+TAA presentaron mayores niveles tanto de GSH (Figura 34) como GSSG respecto al grupo CT, pero sin mostrar diferencias significativas entre sí ($p < 0.05$). Los niveles de celulares de GSH son hasta 1000 veces mayores que otros grupos de antioxidantes (Lee *et al.*, 2016) y su concentración se relaciona con el nivel de especies reactivas. Los bajos niveles están en favor de la activación de la apoptosis, mientras que los niveles incrementados de GSH a favor de la resistencia contra la apoptosis (He *et al.*, 2017).

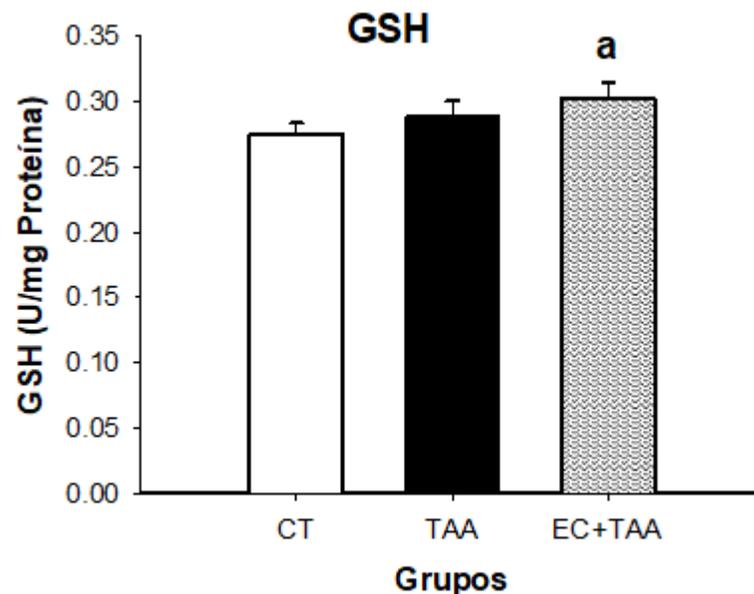


Figura 34. Niveles de GSH en hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA. Los resultados se expresan en U/mg Proteína. Las barras representan la media con error estándar, $n = 8$, por duplicado. Las diferencias significativas respecto al vehículo se indican con **a**, mientras que las diferencias respecto a TAA son señaladas con **b**, $p < 0.05$.

GSH, como regulador antioxidante, se une covalentemente a radicales libres derivados de la biotransformación de TAA como un paso inicial para su eliminación (Lei *et al.*, 2016), e incrementa la actividad de GPx y GR (Kurutas, 2016) para proteger a las células contra el daño oxidativo al reducir el H₂O₂ y captar los radicales de oxígeno y nitrógeno activos (Dutta *et al.*, 2018).

Bajo condiciones de estrés, el decremento de GSSG se considera como una pérdida de función mitocondrial y la posible necrosis celular (Sánchez-Rodríguez & Mendoza, 2019), lo que los niveles de GSSG en EC+TAA (Figura 35) pueden indicar el restablecimiento de la función hepática por acción de EC.

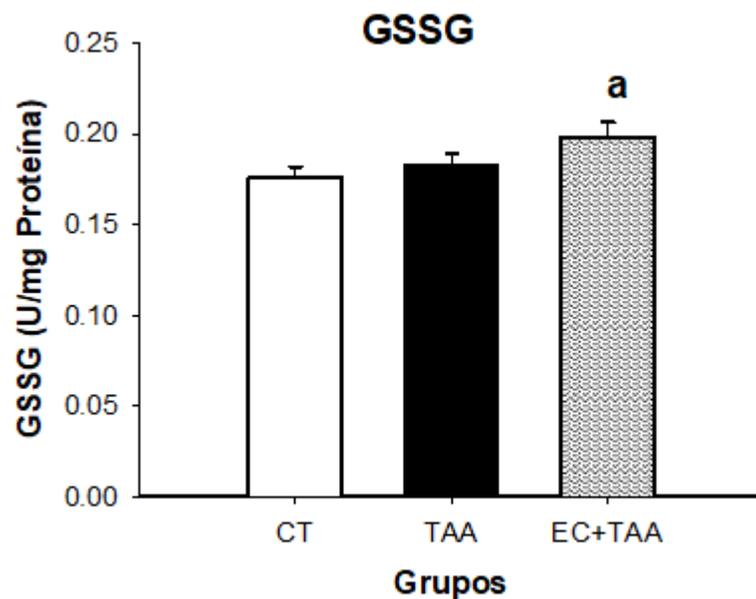


Figura 35. Niveles de GSSG en hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA. Los resultados se expresan en U/mg Proteína. Las barras representan la media con error estándar, n= 8, por duplicado. Las diferencias significativas respecto al vehículo se indican con **a**, mientras que las diferencias respecto a TAA son señaladas con **b**, p<0.05.

Los antioxidantes juegan un papel importante en la prevención y tratamiento de las enfermedades hepáticas crónicas, donde el bloqueo de la producción de radicales libres son importantes para la protección de la célula contra la hepatotoxicidad producida por TAA (Halliwell & Gutteridge, 2015).

6.6.4. Glutación peroxidasa (GPx) y Glutación reductasa (GR)

GPx es una selenoenzima que regula la reducción de hidroperóxidos utilizando GSH como agente reductor, con la formación de agua o alcohol (Bela *et al.*, 2015; Mbemba *et al.*, 2019). La oxidación del grupo selenol presente en GPx por el peróxido produce ácido selenénico que reacciona con GSH para generar sulfuro de selenio, que es altamente reactivo y susceptible al desplazamiento nucleofílico por otro átomo sulfuro. En un segundo ataque de GSH se regenera el selenol y GSSG como subproducto. El papel de GR es el de reciclar GSSG para convertirlo en GSH, que es esencial para la respuesta adaptativa hacia el estrés oxidativo (Moussa *et al.*, 2019).

Como se observa en las Figuras 36 y 37, los niveles de GPx y GR de los grupos TAA y EC+TAA no mostraron cambios significativos respecto al grupo control a las 24 horas después de la inducción de TAA, lo que refleja la acción antioxidante por parte de Cat para inhibir hidroperóxidos producto de la biotransformación de TAA (Marchyshak *et al.*, 2018), pero no la peroxidación de EC.

El ciclo redox de GSH es la principal fuente de protección contra el estrés oxidativo leve, mientras que Cat participa frente a niveles severos de oxidación (Azat *et al.*, 2019). La protección que ofrece GPx a la mitocondria, organelo que carece de Cat, contribuye a la estabilidad de la función celular (Mohammadi *et al.*, 2016).

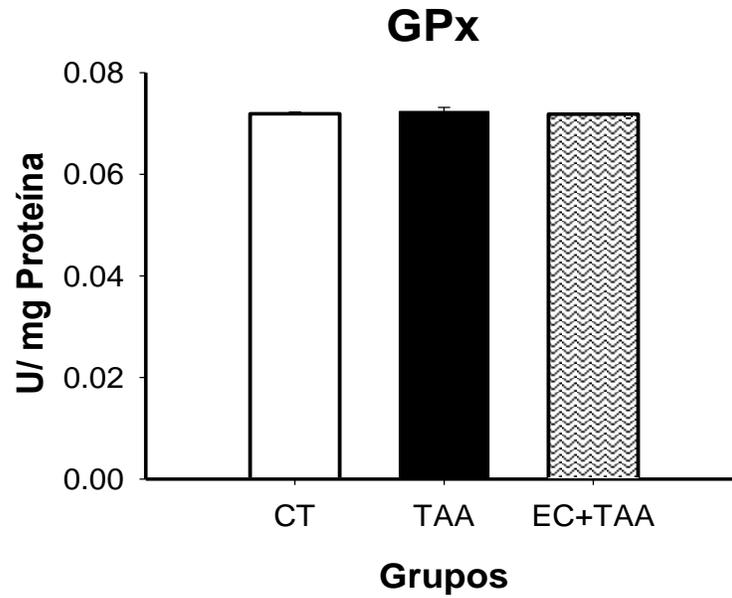


Figura 36. Niveles de GPx en hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA. Los resultados se expresan en U/mg Proteína. Las barras representan la media con error estándar, n= 8, por duplicado. Las diferencias significativas respecto al vehículo se indican con **a**, mientras que las diferencias respecto a TAA son señaladas con **b**, $p < 0.05$.

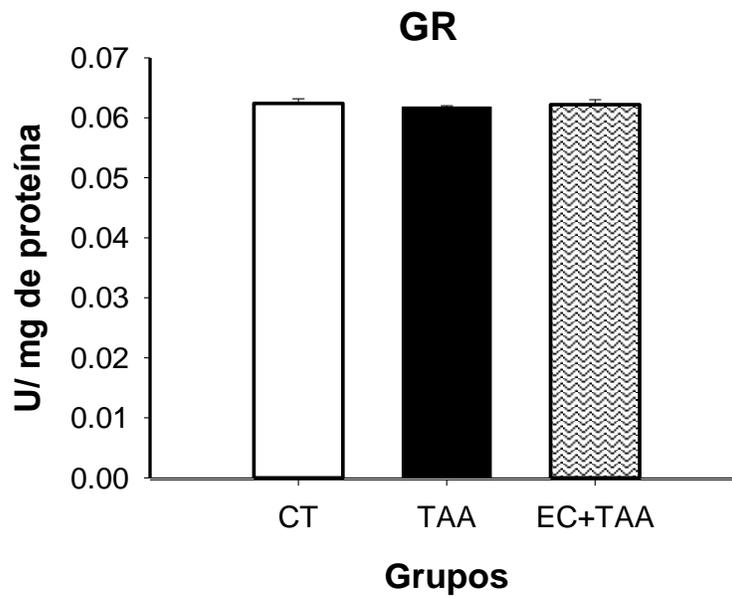


Figura 37. Niveles de GR en hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA. Los resultados se expresan en U/mg. Las barras representan la media con error estándar, n= 8, por duplicado. Las diferencias significativas respecto al vehículo se indican con **a**, mientras que las diferencias respecto a TAA son señaladas con **b**, $p < 0.05$.

6.6.5. Malonaldehído (MDA)

En el presente trabajo el grupo Ec+TAA presentó una mayor concentración de MDA en comparación con TAA (Figura 38), como una manifestación del estrés oxidativo (Mustafa *et al.*, 2013; Ndhala *et al.*, 2013). El requerimiento de GSH es mayor cuando el proceso de peroxidación incrementa y se ve reflejado a través de mayores niveles de MDA (Sanz *et al.*, 2002). Este fenómeno no ocurrió para EC+TAA y puede deberse a que MDA tiene una vida mayor las ERO por su capacidad para dispersarse hacia varias regiones de la célula, extendiendo su progreso e incrementando su detección (Luczaj *et al.*, 2017).

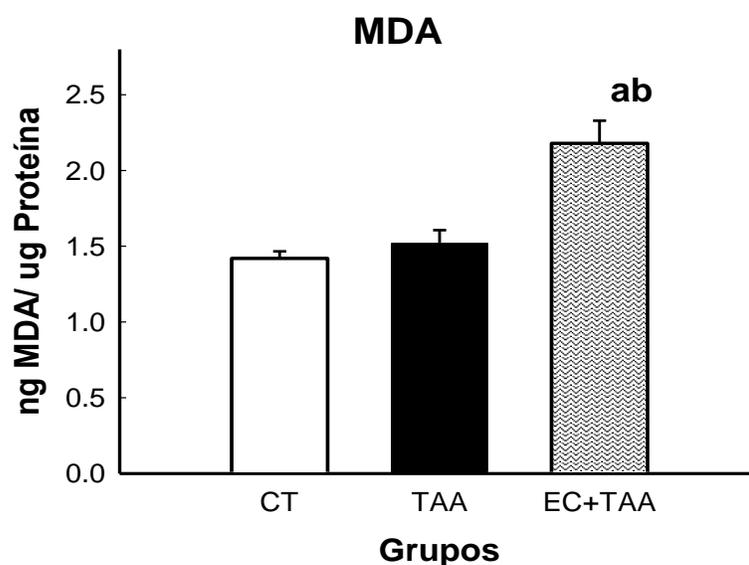


Figura 38. Niveles de MDA en hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA. Los resultados se expresan en ng/ μ g Proteína. Las barras representan la media con error estándar, n= 8, por duplicado. Las diferencias significativas respecto al vehículo se indican con **a**, mientras que las diferencias respecto a TAA son señaladas con **b**, $p < 0.05$.

Por otra parte, los extractos vegetales, pueden contener ácidos grasos insaturados que son susceptibles al deterioro por oxidación, y la presencia de compuestos antioxidantes ejerce un efecto protector que toma a lugar durante cierto tiempo y contribuye a extender su vida de anaquel (Brewer, 2011). En EC+TAA, el incremento en MDA puede relacionarse con un agotamiento de la fuente de compuestos antioxidantes naturales y su consecuente oxidación durante el almacenamiento.

El papel de los antioxidantes es reducir los peróxidos y defender contra sus efectos adversos (Peng *et al.*, 2018). En el caso de EC+TAA, la normalización de los valores disminuidos de CAT, SOD, y elevados de TBARS por TAA podrían ser normalizadas por efecto de EC, como se observó en ratas administradas con el extracto de hojas *C. bonplandianus* y que sufrieron los efectos hepatotóxicos del CCl₄ (Dutta *et al.*, 2018).

6.7. Expresión génica del sistema de defensa antioxidante

La expresión génica es el proceso mediante el cual las instrucciones del ADN son interpretadas por la célula y guiadas para la síntesis de productos funcionales como proteínas (Mitsis *et al.*, 2020), e inicia con la unión de ARN polimerasa a un promotor, continua con la transcripción del gen en ARN y concluye con la traducción en una proteína (García-Sánchez & Marqués-García, 2016). En este estudio se evaluó la expresión génica de las enzimas del sistema antioxidante, así como Nrf2 como factor de transcripción.

6.7.1. Superóxido dismutasa (SOD)

SOD es una metaloenzima que se une a un cofactor metálico para formar MnSOD presente en la mitocondria y CuZnSOD que se localiza en el citosol, cloroplastos y peroxisomas (Ighodaro & Akinloye, 2018). En la evaluación de la expresión génica de SOD los resultados muestran que la administración de TAA provocó una reducción en la expresión tanto de MnSOD (Figura 39) como de CuZnSOD (Figura 40), derivado del daño que sufre el ADN tras el ataque de radicales •OH provenientes de la detoxificación.

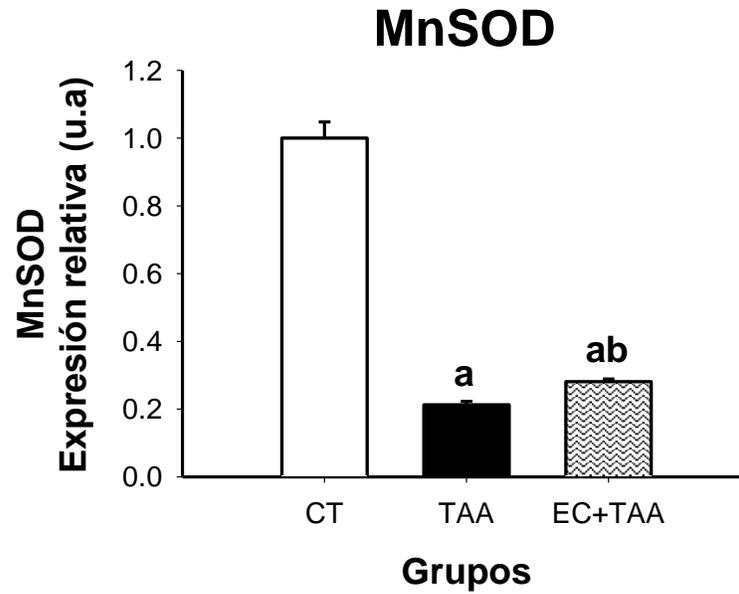


Figura 39. Expresión génica de MnSOD en el hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (u. a). Las barras representan la media con su error estándar, n=8. Las diferencias con el vehículo se indican con **a**, mientras que las diferencias respecto a TAA son señaladas con **b**, $p < 0.05$.

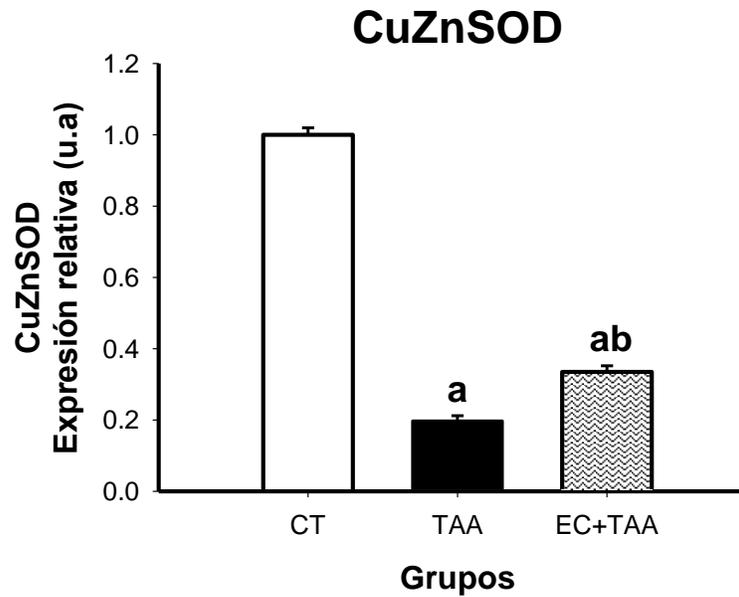


Figura 40. Expresión génica de CuZnSOD en el hígado de ratas con daño hepático inducido por TAA. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (u.a.). Las barras representan la media con su error estándar, n=8. Las diferencias con el vehículo se indican con **a**; mientras que las diferencias respecto a TAA son señalads con **b**, $p < 0.05$.

Los radicales $\bullet\text{OH}$ reaccionan con las bases púricas como guanina, la mayor donadora de electrones; o la desoxirribosa del ADN para sustraer sus hidrógenos desde los átomos de carbono para formar 5 radicales con centro de carbono (Dizdaroglu & Jaruga, 2012). Estos radicales participan en otras reacciones produciendo una variedad de aductos oxidados, entre ellos el 2,3,-didesoxipentosa-4-ulosa que en presencia de forma el radical peroxilo que participa en reacciones de fragmentación y producir 3'fosfoglicolato como un grupo terminal (Pogozelski & Tullius, 1998).

En el caso de EC+TAA, la dosis de EC provocó un ligero incremento en los niveles de expresión de las mismas proteínas, lo que podría describir la participación de antioxidantes de una tercer línea de antioxidantes reparadoras de ADN, proteínas y lípidos dañados, que incluye polimerasas, proteasas y peptidasas localizadas en el citosol y mitocondria (Ihgodaro & Akinloye, 2018). Estos datos coinciden con lo reportado por Vargas-Mendoza (2014) en ratas administras con 500 mg de tioacetamida/kg a las 24 h post-inducción.

6.7.2. Catalasa (Cat)

Cat es una enzima altamente eficiente que actúa en complementación a SOD. Se localiza principalmente en los peroxisomas, por lo que la degradación mitocondrial de H_2O_2 ocurre por GPx (Ihgodaro & Akinloye, 2018). Los bajos niveles de H_2O_2 tienden a regular los procesos fisiológicos en la mitocondria y mantener el balance tiol, pero en altas concentraciones es responsable del deterioro celular y hepático (Tsai *et al.*, 2009), como ocurrió por la administración de TAA, que provocó un decremento en la expresión génica de Cat, pero que a su vez fue medianamente compensada por la dosis de EC, como se observa en la Figura 41.

Los niveles de expresión observados en Cat en EC+TAA significan que EC posee una capacidad inhibitoria contra H_2O_2 y el anión O_2^- , evitando la peroxidación y el daño al ADN por activación del sistema de defensa antioxidante (Hajovsky *et al.*, 2012; Dutta *et al.*, 2018). La re-expression de Cat es ha sido indicado como un posible biomarcador para un respuesta positiva de los tratamientos (Matos *et al.* 2009).

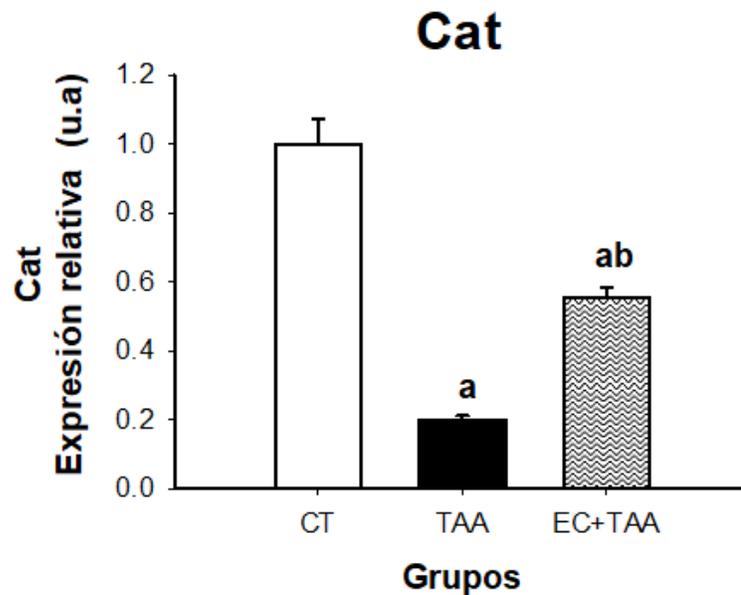


Figura 41. Expresión génica de Cat en el hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (u. a). Las barras representan la media con su error estándar, n= 8. Las diferencias con el vehículo se indican como a, mientras que las diferencias respecto a TAA son señaladas con b, p<0.05.

6.7.3. Glutación peroxidasa y Glutación reductasa

En comparación con los resultados observados en las pruebas *in vitro*, la expresión génica de GPx fue menor tanto para el grupo TAA como para EC+TAA (Figura 42), con diferencias significativas entre sí (p<0.05). GPx reduce la peroxidación lipídica evitando su acumulación de peróxidos y el consecuente daño a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Lei *et al.*, 2016; Mohammadi *et al.*, 2016), y se conforma por múltiples isoenzimas con distintas localizaciones subcelulares que exhiben diferentes patrones de expresión (Bela *et al.*, 2015). La disminución de GPx manifiesta la habilidad de los productos de la peroxidación para difundirse a través de la célula y llegar al núcleo

cuando el sistema antioxidante es inestable (Sanz *et al.*, 2002), y provocar daño al ADN a través de la oxidación de purinas y pirimidinas, rompiendo la doble cadena, así como hipermetilando o hidroxilando la cadena, para así alterar la señalización y propagación de las bases dañadas (Kryston *et al.*, 2011). En cambio, GR, responsable del equilibrio GSH/GSSG, no presentó diferencias en sus niveles de expresión respecto al grupo control (Figura 43).

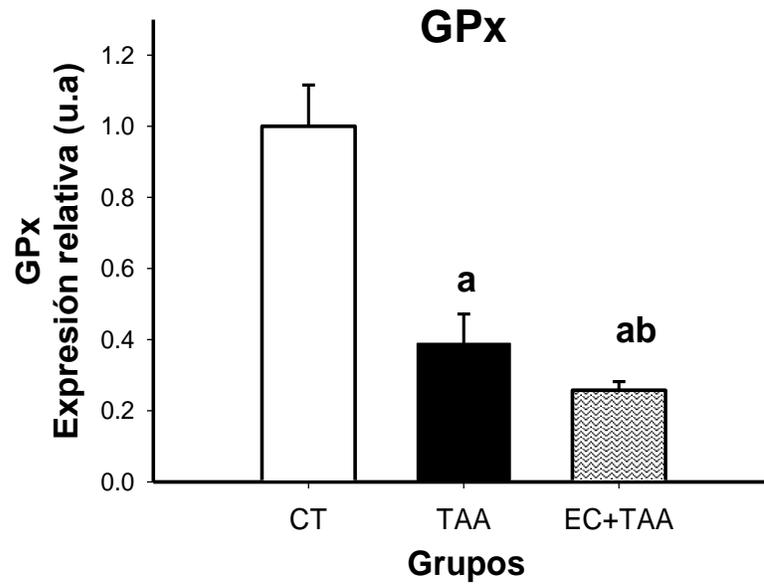


Figura 42. Expresión génica de GPx en el hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (u. a). Las barras representan la media con su error estándar, n= 8. Las diferencias con el vehículo se indica como **a**, mientras que las diferencias respecto a TAA son señaladas con **b**, $p < 0.05$.

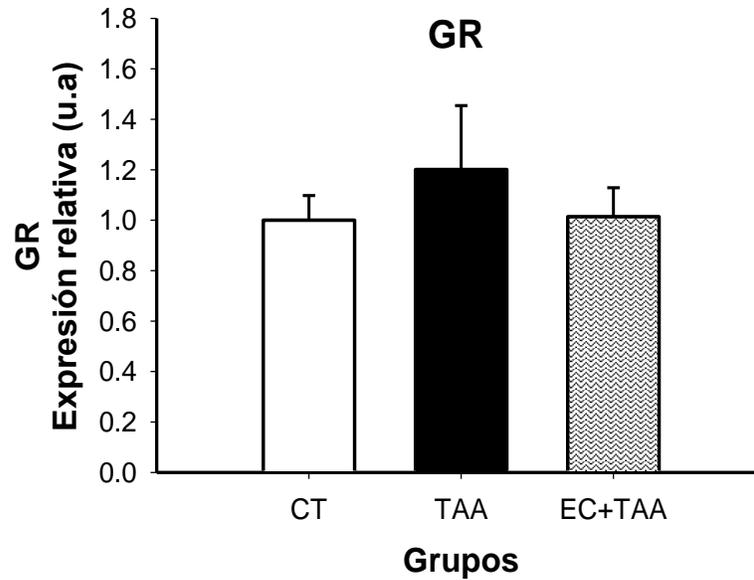


Figura 43. Expresión génica de GR en el hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (u.a). Las barras representan la medida con su error estándar, n=8, por duplicado. Las diferencias con el vehículo se indican como **a**, mientras que las diferencias respecto a TAA son señaladas como **b**, $p < 0.05$.

6.7.4. Nrf2

En contraste con los resultados observados en la expresión génica de SOD y Cat, la expresión de Nrf2 decreció significativamente en EC+TAA en comparación con los grupos CT y TAA (Figura 44). La activación de Nrf2 es generalmente considerada benéfica en la enfermedad hepática (Bataille & Manautou, 2012) porque juega un papel importante a través de la transcripción de los antioxidantes endógenos, pero en el presente trabajo se descartó la participación de este factor de transcripción.

Bajo condiciones normales la vida de Nrf2 es muy corta y se regula por Keap 1 (proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch) en el citoplasma (Holmström *et al.*, 2016), y así mantiene su forma “inactiva” (Taguchi *et al.*, 2011) hasta que es degradado en los proteosomas por ubiquitinación o fosforilación por glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) por medio de la vía del complejo ligasa de ubiquitina SCF β TrCP (Rada *et al.*, 2011). Por el contrario, la activación de Nrf2 ocurre en respuesta a electrófilos y por estrés oxidativo (Holmström *et al.*, 2016) que motiva su traslocación al núcleo para unirse al ADN y así regula la expresión de enzimas citoprotectoras. También puede activarse

la inhibición de $\text{NF}\kappa\beta$ para proteger a otras células diferentes a los hepatocitos. Lo que indica que la supresión de Nrf2 está asociado con la intervención de células inflamatorias (Li *et al.*, 2014).

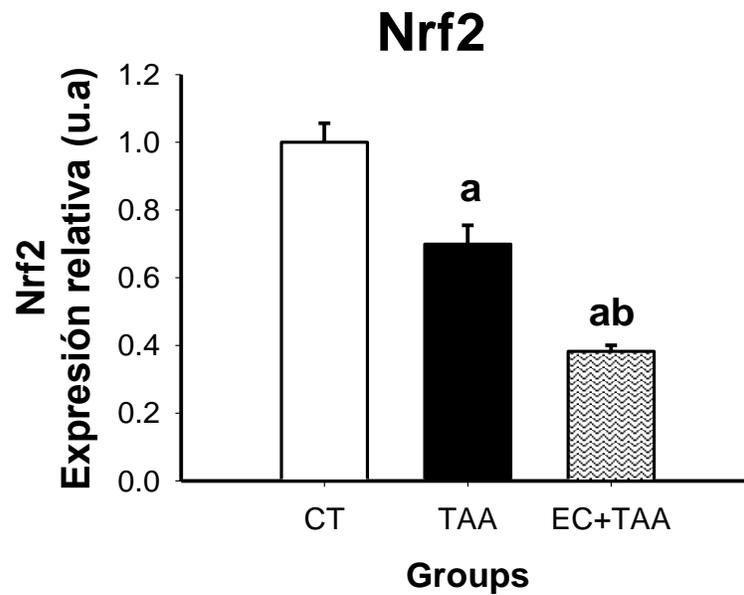


Figura 44. Expresión génica de Nrf2 en el hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (u. a). Las barras representan la media con su error estándar, $n=8$. Las diferencias con el vehículo se indican como **a**, mientras que las diferencias respecto a TAA son señaladas con **b**, $p<0.05$.

Dados los resultados, el incremento en los niveles de las enzimas antioxidantes, Nrf2 parece no ser suficiente para reducir el estrés oxidativo y la inflamación crónica porque los antioxidantes tienen a descender en un ambiente oxidativo. Proveer a las células con antioxidantes exógenos pueden mejorar la capacidad del organismo para contener o disminuir el estrés oxidativo que no puede ser inactivado por las fuentes endógenas (Poljsak *et al.*, 2013), o bien, promover su activación por mecanismos no dependientes de Nrf2 (Prasad, 2016), como ocurrió en EC+TAA.

6.8. Expresión de TNF- α como mediador de inflamación

El daño hepático agudo se caracteriza por la masiva y repentina muerte de las células, mientras que los hepatocitos dañados pueden agravar y exacerbar el daño por activación inmune, conduciendo a respuestas inflamatorias (Ferriero *et al.*, 2018) que permiten la contención y eliminación de agentes patógenos a través de la reparación de la zona afectada y la preservación de la homeostasis del organismo (Okechukwu *et al.*, 2013).

TNF- α es una citoquina que constituye uno de mayores inductores celulares, que incrementa su expresión durante la proliferación celular. Su activación se inicia en las células de Kupffer tras la exposición a agentes xenobióticos y un mediador proinflamatorio durante el estrés oxidativo relacionado con el daño hepático, conduce a la fibrosis y muerte por apoptosis (Morio *et al.* 2001; Dutta *et al.*, 2018). En este estudio, la toxicidad por TAA provocó un decremento en TNF- α , que en EC+TA fue más notorio (Figura 45).

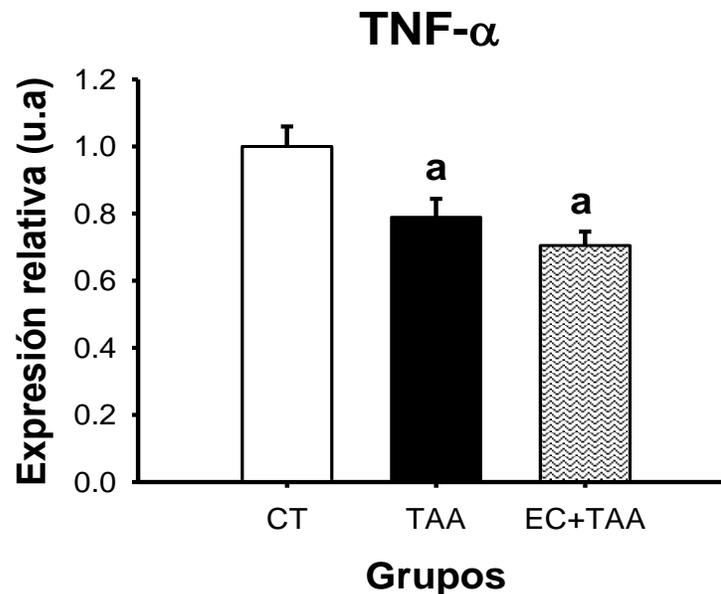


Figura 45. Expresión génica de TNF- α en el hígado de ratas con daño agudo inducido por TAA. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (u. a). Las barras representan la media con su error estándar, n=8. Las diferencias con el vehículo se indican como **a**, mientras que las diferencias respecto a TAA son señaladas con **b**, p<0.05.

La expresión reducida de mRNA de TNF- α indica una desactivación de las células de Kupffer e infiltración hepática por células del sistema inmune. El principal mecanismo para la progresión de

una enfermedad hepática crónica, independientemente de la causa, es la inflamación. A causa de la capacidad regenerativa del hígado, las lesiones necróticas no son necesariamente críticas (Marchyshak *et al.*, 2018).

Debido a que NF- κ B es un mediador central que regula la expresión de citoquinas (Dutta *et al.*, 2018) se asume que EC puede suprimir la activación de NF- κ B, y la subsecuente reducción de la expresión de TNF- α .

Las citoquinas actúan como mediadores centrales que se unen con receptores específicos de la membrana de células diana, así conducen a una cascada de reacciones como la inducción, amplificación o inhibición de la actividad de los genes regulados por ellos. Entre las rutas de señalización implicadas en la respuesta inflamatoria, los radicales libres juegan un papel importante debido que son mediadores químicos que activan la transcripción del factor nuclear NF κ β que promueve la expresión de proteínas como citoquinas y TNF α (Echeverri *et al.*, 2008).

6.9. Estudio biodirigido

Para determinar la fracción de EC responsable de la actividad antioxidante y hepatoprotectora se realizó un estudio biodirigido a través de la evaluación de los parámetros ALT, AST, FAL, GGT y LDH que presentaron los cambios más significativos al estudiar el efecto de EC.

6.9.1. Transaminasas

En la evaluación de las fracciones de EC (FAC, FAE y FCL), los niveles de las enzimas ALT como de AST se observaron altos y muy cercanos al grupo TAA (Figuras 46 y 47), lo que indica que a las 24 horas postinducción ninguna de ellas consiguió detener la acción necrótica de TAA. La pérdida de actividad biológica por el fraccionamiento se debe a factores como la fotooxidación y la ausencia de interacción sinérgica entre los compuestos presentes (Sánchez-Peralta *et al.*, 2015). La acción combinada de dos o mas grupos de compuestos puede resultar en un mayor efecto que una solo (Aro *et al.*, 2019), como fue observado en la evaluación de EC.

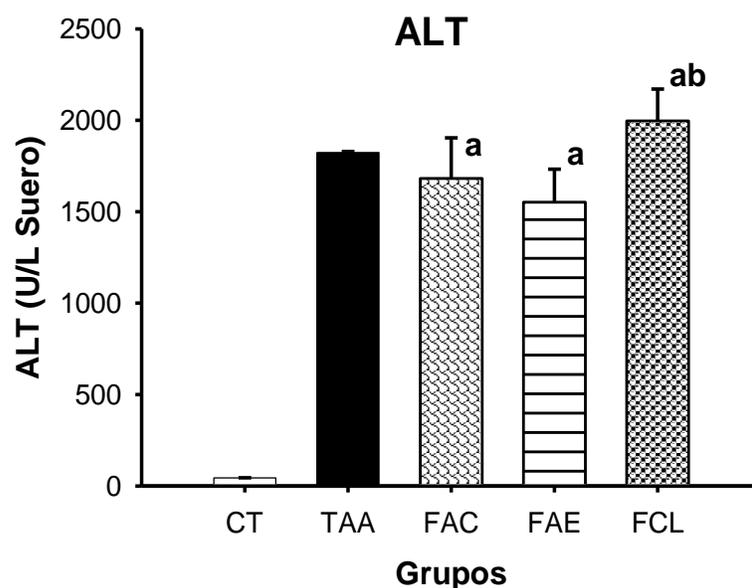


Figura 46. Efecto de las fracciones (FAC, FAE y FCL) sobre los niveles de ALT en el suero de ratas con daño hepático inducido por TAA. Los resultados son expresados en U/L. Las barras representan la media con error estándar, n=8, por duplicado. Las diferencias con el vehículo son expresadas como **a**; mientras que las diferencias respecto a TAA con la letra **b**, $p < 0.05$.

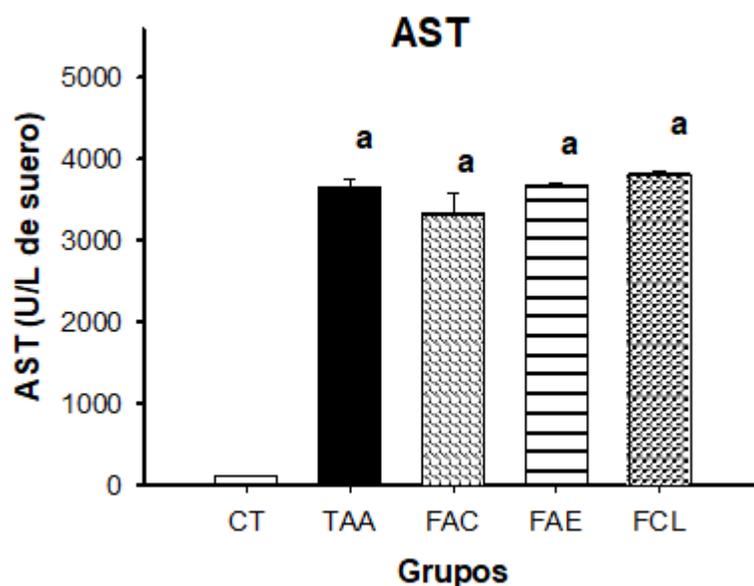


Figura 47. Efecto de las fracciones (FAC, FAE y FCL) sobre los niveles de AST en el suero de ratas con daño hepático inducido por TAA. Los resultados son expresados en U/L. Las barras representan la media con error estándar, n=8, por duplicado. Las diferencias con el vehículo son expresadas como **a**; mientras que las diferencias respecto a TAA con la letra **b**, $p < 0.05$

Durante la biotransformación de TAA diversas especies reactivas son producidas, entre ellas la tioacetamida sulfóxido y tioacetamida disulfóxido. Estos radicales libres dañan la célula por peroxidación lipídica que causa la pérdida de la permeabilidad de la membrana celular (Sing *et al.*, 2011), lo que podría explicar el incremento en los niveles de ALT y AST observados en los grupos TAA, FAC, FAE y FCL.

6.9.2. Fosfatasa alcalina (FAL)

En el estudio con las fracciones, éstas presentaron una reducción significativa respecto al grupo TAA, de 19.3, 28 y 45.2% para FAC, FAE y FCL, respectivamente (Figura 48). Este comportamiento también fue demostrado por Kaur *et al.* (2019) en las fracciones de *Cassia fistula*, cuyo pretratamiento seguido por la intoxicación por TAA reestableció la función hepática debido a su potencial hepatoprotector.

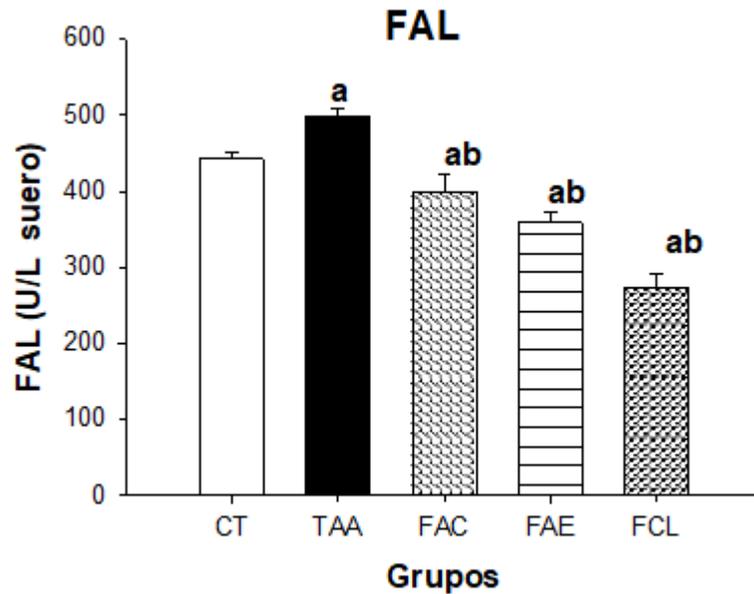


Figura 48. Efecto de las fracciones (FAC, FAE y FCL) sobre los niveles de FAL en el suero de ratas con daño hepático inducido por TAA. Los resultados son expresados en U/L. Las barras representan la media con error estándar, n=8, por duplicado. Las diferencias con el vehículo son expresadas como **a**; mientras que las diferencias respecto a TAA con la letra **b**, $p < 0.05$.

Los niveles de FAL en suero dependen de la actividad de varios tejidos generadores de la enzima, como hueso, riñón e intestino (Singh *et al.*, 2011), y se incrementan en el suero después del daño (Ukpabi-Ugo *et al.*, 2019), por lo que su disminución puede asociarse a la capacidad de las fracciones y sus compuestos presentes para favorecer su depuración a través de la bilis, a pesar de que los niveles de FAL pueden mantenerse elevados hasta por una semana después de liberarse la obstrucción biliar (Church & Watkins, 2017).

6.9.3. *Gamma glutamil transpeptidasa*

A diferencia del estudio en EC, las fracciones probadas no consiguieron disminuir los niveles de esta enzima en comparación a TAA, y aunque FAC presentó los niveles superiores, no existen diferencias significativas respecto a TAA (Figura 49). Si GGT es un marcador de la depresión de glutatión en el hígado, y sus altos niveles se relacionan con la disminución de los antioxidantes del sistema de defensa endógeno (Koenig & Seneff, 2015), los resultados observados en FAC, FAE y FCL indican que las fracciones probadas no tienen la capacidad hepatoprotectora ejercida por

EC, y confirman que la separación de los compuestos a través del fraccionamiento lleva a la pérdida de la actividad biológica.

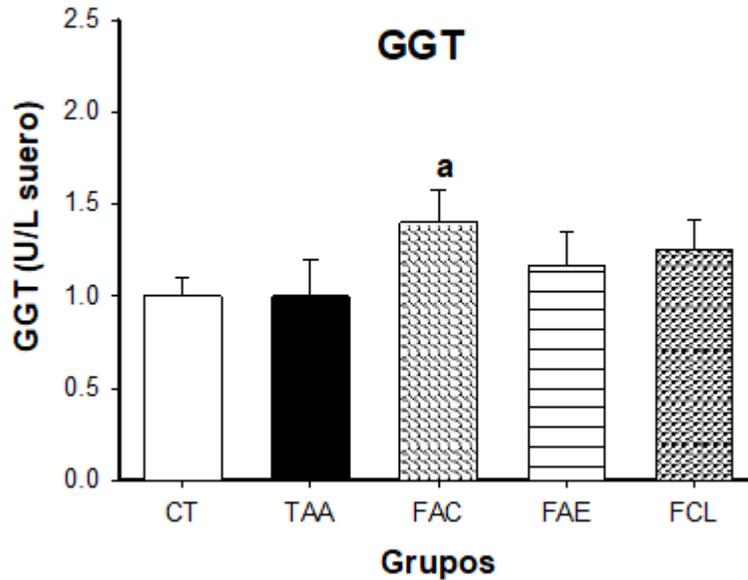


Figura 49. Efecto de EC sobre los niveles de GGT en el suero de ratas con daño hepático inducido por TAA. Los resultados son expresados en U/L. Las barras representan la media con error estándar, n=8, por duplicado. Las diferencias con el vehículo son expresadas como **a**; mientras que las diferencias respecto a TAA se expresan como **b**, $p < 0.05$.

6.9.4. Lactato dehidrogenasa

En la Figura 50 se observa que las fracciones probadas exhibieron decrementos importantes en la actividad de esta enzima, de 74.6, 30 y 42.3% para FAC, FAE y FCL respectivamente., y se relaciona ampliamente con la estabilidad de la célula frente al daño necrótico producido por la TAA (Faloppi *et al.*, 2016; Ferriero *et al.*, 2018).

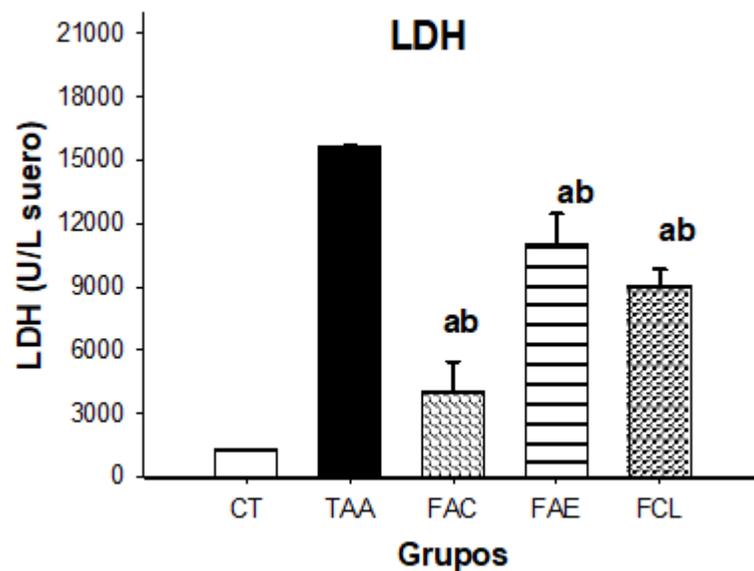


Figura 50. Efecto de las fracciones (FAC, FAE y FCL) sobre los niveles de LDH en el suero de ratas con daño hepático inducido por TAA. Los resultados son expresados en U/L. Las barras representan la media con error estándar, n=8, por duplicado. Las diferencias con el vehículo son expresadas como **a**; mientras que las diferencias respecto a TAA se expresan como **b**; $p < 0.05$.

VII. CONCLUSIONES

A través del presente trabajo se determinó que el uso del extracto etanólico de *Croton hypoleucus* es seguro, con una DL₅₀ mayor a 5000 mg/kg.

El efecto hepatoprotector del extracto etanólico de *C. hypoleucus* se asocia ampliamente con su capacidad para mantener los parámetros bioquímicos en suero., sin embargo, esta propiedad es afectada por el fraccionamiento químico.

El extracto etanólico de *Croton hypoleucus* posee actividad antioxidante moderada atribuida a la sinergia de los compuestos tipo fenol, taninos, saponinas, terpenos y esteroides presentes.

El principal mecanismo de hepatoprotección del extracto de *Croton hypoleucus* está asociado a sus propiedades antioxidantes y su capacidad para modular a catalasa como parte del sistema de defensa endógeno.

Croton hypoleucus afecta la expresión TNF- α , por lo que reduce la acción inflamatoria de tioacetamida, posiblemente debido los compuestos β -sitosterol, hipoleina A-B y crotonpeno B asilados e identificados en el extracto.

Las propiedades antioxidantes y hepatoprotectoras del extracto etanólico de *Croton hypoleucus* fueron demostradas a través de su capacidad para mantener los parámetros bioquímicos y modular la expresión de enzimas antioxidantes, así como normalizar GSH después del daño causado por TAA.

El extracto etanólico de *Croton hypoleucus* podría considerarse como una fuente de compuestos bioactivos para la prevención del daño hepático agudo en la medicina tradicional complementaria.

VIII. APÉNDICE

8.1. Preparación del reactivo de Meyer

Se disuelve 3.6 g de HgCl_2 en 100 ml de agua destilada. Por separado se disuelve KI en 40 ml de agua destilada. Se mezclan ambas soluciones y se afora a 250 ml con agua destilada.

8.2. Preparación del reactivo de Dragendorff

Solución A: 0.85 g de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ en 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua. Calentar.

Solución B: 8 g de KI disuelto en 30 mL de agua. Se mezclan las soluciones A y B en relación 1:1.

Al momento de su uso mezclar mezcla AB: ácido acético anhidro: agua (1:2:10).

8.3. Reactivo de Benedict

En 50 ml de agua destilada mezclar 4.3 g de sulfato de cobre pentahidratado, 4.3 g de citrato de sodio y 25 g de carbonato de sodio anhidro. Aforar a un volumen de 250 ml con agua destilada.

IX. REFERENCIAS

- Abdalaziz, M. N., Ali, A., Kabbashi, A. S. *In vitro* antioxidant activity and phytochemical screening of *Croton zambesicus*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. **2016**; 5(6):12-16.
- Abdel Salam, O. M., Mohammed, N. A., Sleem, A. A., Farrag, A. R. The effect of antidepressant drugs on thioacetamide-induced oxidative stress. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. **2013**; 17(6): 735-744.
- Abdul-Hussein, A., Al-Janbi, S., Qasum, A. Z., Muhammed, N. Z. Lactate dehydrogenase as an indicator of liver, muscular and cancer diseases. *Journal of Coastal Life Medicine*. **2015**; 3(7): 543-546.
- Adewusi, E. A., Afolayan, A. J. A review of natural products with hepatoprotective activity. *Journal of Medicinal Plants Research*. **2010**; 4 (13): 1318-1334.
- Aebersold, R., Anderson, L., Caprioli, R., Druker, B., Hartwell, L., Smith, R. Perspective: a program to improve protein biomarker discovery for cancer. *Journal of Proteome Research*. **2005**; 4(4): 1104-1109.
- Aebi, H. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*. **1984**; 105, 121-126.
- Aguilar, G. A., Rios, M. Three new sesquiterpenes from *Croton arboreus*. *Journal of Natural Products*. **2004**; 67(5): 914-917.
- Ahmadinejad, F., Geir-Moller, S., Hashemzadeh-Chaleshtori, M., Bidkhorji, G., Jami, M-S. Molecular mechanisms behind free radical scavengers function against oxidative stress. *Antioxidants*. **2017**; 6:51.
- Ahmed, B., Alam, T., Varsheney, M., Khan, S. A. Hepatoprotective activity of two plants belonging to the *Apiaceae* and the *Euphorbiaceae* family. *Journal of Ethnopharmacology*. **2002**; 79 (3): 313-316.
- Akhtar, T., Sheikh, N., Hassan-Abbsi, M. Alternative therapeutic approaches: hepatoprotective effect of neriumoleander extract in thioacetamide induced hepatotoxicity. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. **2016**; 9(8):16118-16124.
- Alam, N., Nam, Y. K., Gyun, S. P., Chun, C. J., Bok, Y. Y., Soo, L. T. Antioxidant, phenolic compounds concentration, xanthine oxidase and tyrosinase inhibitory activities of *Pleurotus cornucopiae*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. **2011**; 5(3): 229-239.
- Alamri, Z. Z. Effect of luteolin and quercetin on thioacetamide induced hepatic fibrosis in rats. *International Journal of Pharmacology*. **2019**; 15(7):863-871.
- Almazroo, O. A., Miah, M. K., Venkataramanan, R. Drug metabolism in the liver. *Clinics in liver disease*. **2017**; 21(1): 1-20.
- Arauz, J., Rivera-Espinoza, Y., Shibayama, M., Favari, L., Flores Beltrán, R. E., Muriel, P. Nicotinic acid prevents experimental liver fibrosis by attenuating the prooxidant process. *International Immunopharmacology*. **2015**; 28(1): 244-251.
- Arauz, J., Ramos-Tovar, E., and Muriel, P. Redox state and methods to evaluate oxidative stress in liver damage: From bench to bedside. *Annals of Hepatology*. **2016**; 15(2), 160–173.
- Aro, A. O., Dzoyem, J. P., Awouafack, M. D., Selep, M. A., Eloff, J. N., McGaw, L. J. Fractions and isolated compounds from *Oxyanthus speciosus* subsp. *Stenocarpus* (Rubiaceae) have promising antimycobacterial and intracellular activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **2019**; 19:108.

- Arya, A., Azarmehr, N., Mansourian, M., Doustimotlagh, A. H. Inactivation of the superoxide dismutase by malondialdehyde in the nonalcoholic fatty liver disease: a combined molecular docking approach to clinical studies. *Archives of Physiology and Biochemistry*. **2019**; 1–8.
- Asare, G. A., Sittie, A., Bugyei, K., Gyan, B. A., Adjei, S., Addo, P., Wiredu, E. K., Nyarko, A. K., Out-Nyarko, L. S., Adjei, D. N. Acute toxicity studies of *Croton membranaceus* root extract. *Journal of Ethnopharmacology*. **2011**; 134(3): 938-943.
- Asrani, S. K., Debarbhavi, H., Eaton, J., Kamath P. S. Burden of liver diseases in the world. *Journal of Hepatology*. **2018**; 70(1): 151-171.
- Atoui, A. K., Mansouri, A., Boakou, G., Kefalas, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*. **2005**; 89: 27-36.
- Azab, A., Nassar, A., Azab, A. N. Anti-inflammatory activity of natural products. *Molecules*. **2016**; 21(10): 1321.
- Azat, A. M., Shehab, D. A., Abdulrazak, M. A. Antioxidant categories and mode of action. *Intechopen*. **2019**; <https://www.intechopen.com/books/antioxidants/antioxidant-categories-and-mode-of-action>.
- Banu, G. S., Letha, N., Ganesan, K., Nair, P. S. K., Azalewor, H. G. Evaluation of *In vitro* antioxidant activity and phytochemical screening of *Croton macrostachyus* Hochst. by using different solvent extracts. *American Journal of Pharmtech Research*. **2016**; 6(1): 73-85.
- Banales, J. M., Huebert, R., Karisen, M., Strazzabosco, M., LaRusso, N. F., Gores, G. J. Cholangiocyte pathobiology. *Naturel Reviews Gastroenterology and Hepatology*. **2019**; 16 (5): 239-281.
- Bao, H., Zhang, Q., Ye, Y., Lin, L. Naturally occurring furanoditerpenoids: distribution, chemistry and their pharmacological activities. *Phytochemistry Reviews*. **2016**; 16(2): 235-270.
- Baskol, M., Dolbun Seckin, K., and Baskol, G. Advanced oxidation protein products, total thiol levels and total oxidant/antioxidant status in patients with nash. *The Turkish Journal of Gastroenterology*. **2015**; 25(1): 32–37.
- Bataille A. M., Manautou J. E. Nrf2: a potential target for new therapeutics in liver disease. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. **2012**; 92(3): 340-348.
- Bautista, M., Andres, D., Cascales, M., Morales-González, J. A., Sánchez-Reus, M. I. Effect of Gadolinium chloride on liver regeneration following thioacetamide-induced necrosis in rats. *International Journal of Molecular Sciences*. **2010**; 11(11): 4426-4440.
- Bela, K., Horváth, E., Gallé, A., Szabados, L., Tari, I., Csizár, J. Plant glutathione peroxidases: emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *Journal of Plant Physiology*. **2015**; 176: 192-201.
- Bessey, O. A., Lowry, O. H., Brock, M. J. A method for the rapid determination of alkaline phosphatases with five cubic millimeters of serum. *Journal of Biological Chemistry*. **1946**; 164-321-329.
- Bhaargavi, V., Jyotsna, G.S.L., Tripurana, R. A review on hepatoprotective activity. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. **2014**; 5: 690-702.
- Bhamidimarri, K. R., Schiff E. Drug-induced cholestasis. *Clinical Liver Disease*. **2013**; 17(4): 519-531.

- Bhatti, H. N., Khera, R. A. Biotransformations of diterpenoids and triterpenoids: A review. *Journal of Asian Natural Products Research*. **2014**; 16(1): 70-104.
- Bedi, O., Bijjem, K. R. V., Kumar, P., Gauttam, V. Herbal induced hepatoprotection and hepatotoxicity: A critical Review. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*. **2016**; 60 (1): 6-21.
- Benzie, I. F., Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. **1996**; 239(1), 70-76.
- Bhooshan, P. K., Ibrahim, R. S. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2010**; 3(1): 2-12.
- Bigoniya, P., Singh, C. S., Shukla, A. A Comprehensive Review of Different Liver Toxicants Used in Experimental Pharmacology. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. **2009**; 1(3): 124-135.
- Birk, J., Meyer, M., Aller, I., Hansen, H. G., Odermatt, A., Dick, T. P., Meyer, A. J., Appenzeller-Herzog, C. Endoplasmic reticulum: reduced and oxidized glutathione revisited. *Journal of Cell Science*. **2013**; 126: 1604-1617.
- Bonkovsky, H. L., Kleiner, D. E., Gu, J., Odin, J. A., Russo, M. W., Navarro, V. M., Fontana, R. J., Ghabril, M. S., Bernhart, H., Hoofnagle, J. H. Clinical presentations and outcomes of bile duct loss caused by drugs and herbal and dietary supplements. *Hepatology*. **2017**; 65(4): 1267-1277.
- Bracher, F., Randau, P. K., Lerche, H. Crotonopone, a new tropone derivative from *Croton zehntneri*. *Fitoterapia*. **2008**; 79(3): 236-237.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. **1976**; 72:248-254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. **1995**; 28, 25-30.
- Braunwald, E., Ghany, M., Hoofnagle, J., Berk, P., Wolkoff, A., Dienstag, J., Fauci, A. S., Kasper, D. L., Hauser, S., Longo, D. Harrison. Principios de Medicina Interna. 17ª edición México: Editorial Mc Graw-Hill Interamericana de México; **2009**.
- Brewer, M.S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **2011**; 10, 221–247.
- British Medical Association. Complementary Medicine: New Approaches to Good Practice. *Complementary Therapies in Medicine*. **1993**; 1(4): 218-220.
- Bulus, T., Atawodi, S. E., Mamman, M. Acute toxicity effect of the aqueous extract of *Terminalia avicennioides* on white albino rats. *Science World Journal*. **2011**; 6(2): 1-4.
- Burgos, A., Barua, J., Flores-Giubi, M. E., Banza, D., Ferro, E., Alvarenga, N. L. Antibacterial activity of the alkaloid extract and isolated compounds from *Croton bonplandianum* Baill. (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. **2015**; 17(4): 922-27.
- Buxbaum, E. Proteins in the lab. In: Fundamentals of Protein Structure and Function. Springer International Publishing. Switzerland. **2015**; 65-93.
- Cao, Z. Q., Wang, X. X., Lu, L., Xu, J. W., Li, X. B, Zhang, G. R., Ma, Z. J., Shi, A. C, Wang, Y., Song, Y. J. β -Sitosterol and gemcitabine exhibit synergistic anti-pancreatic cancer activity by

- modulating apoptosis and inhibiting epithelial-mesenchymal transition by deactivating Akt/GSK-3 β signaling. *Frontiers in Pharmacology*, **2019**; 9:1525.
- Cartaxo, S. L., Souza, M. M., Albuquerque, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northwestern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. **2010**; 131(2): 326-342.
- Casas-Grajales, S., Muriel, P. Antioxidants in liver health. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*. **2015**; 6(3): 59-72.
- Cattley, R. C., Cullen, J. M. Liver and gall bladder. In: Hascheck, W.M., Rousseaux, C.G., Wallig, M.A. (Eds.), Hascheck and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology, third ed. Academic Press—Elsevier. **2013**; pp. 1509–1566.
- Cederbaum, A. I. Molecular mechanisms of the microsomal mixed function oxidases and biological and pathological implications. *Redox Biology*. **2015**; 4: 60-73.
- Cervantes, M. A., Flores, O. H., Valdés, J. Las *Euphorbiaceae halófilas y gipsófilas* de México, excepto *Euphorbia*. *Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica*. **2001**; 72(1): 1-83.
- Chambel, S. S., Santos-Goncalves, A., Duarte, T.L. The dual role of Nrf2 in nonalcoholic fatty liver disease: regulation of antioxidant defenses and hepatic lipid metabolism. *BioMed Research International*. **2015**; 597134.
- Chanda, S., Mehendale, M., Faseb, J. Role of nutritional fatty acid and L-carnitine in the outcome of thioacetamide hepatotoxicity. *FASEB Journal*. **1994**; 8: 1061–1068.
- Chandan, B. K., Saxena, A. K., Shukla, S., Sharma, N., Gupta, D. K., Suri, K. A., Suri, J., Bhadauria, M., Singh, B. Hepatoprotective potential of *Aloe barbadensis* Mill. against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology*. **2007**; 111(3): 560-566.
- Chaudhary, A., Chauhan, V. Lactate dehydrogenase as an indicator of liver diseases. *Journal of Advanced Medicinal and Dental Sciences Research*. **2015**; 3(5): S20-S22.
- Chávez, E., Reyes-Gordillo, K., Segovia, J., Shibayama, M., Tsutsumi, V., Vergara, P., Moreno, M. G., Muriel, P. Resveratrol prevents fibrosis, NF-kappaB activation and TGF-beta increases induced by chronic CCl4 treatment in rats. *Journal of Applied Toxicology*. **2008**; 28(1): 35-43.
- Chavez, P. I., Jolad, S., Hoffmann, J., Cole, J.R. Four new 12-deoxyphorbol diesters from *Croton californicus*. *Journal of Natural Products*. **1982**; 45(6): 745-748.
- Chen, T. M., Subeq, Y. M., Lee, R. P., Chiou, T. W., Hsu, B. G. Single dose intravenous thioacetamide administration as a model of acute liver damage in rats. *International Journal of Experimental Pathology*. **2008**; 89(4): 223-231.
- Chtourou, Y., Fetoui, H., Jemai, R., Ben Slima, A., Makni, M., Gdoura, R. Naringenin reduces cholesterol-induced hepatic inflammation in rats by modulating matrix metalloproteinases-2, 9 via inhibition of nuclear factor κ B pathway. *European Journal of Pharmacology*. **2015**; 746: 96-105.
- Church, R. J., Watkins, P. B. The transformation in biomarker detection and management of drug-induced liver injury. *Liver International*. **2017**; 37(11): 1582-1590.

- Compagnone, R. S., Chavez, K., Mateu, E., Orsinim, G., Arvelo, F., Suarez, A. I. Composition and cytotoxic activity of essential oils from *Croton matourensis* and *Croton micans* from Venezuela. *Records of Natural Products*. **2010**; 4(2): 101-108.
- Contreras-Zentella, M. L., Hernández-Muñoz, R. Is liver enzyme release really associated with cell necrosis induced by oxidant stress? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2016**; 1-2.
- Cordeiro, K. W., Felipe, J. L., Malange, K. F., Prado, P. R., Figueiredo, P. O., Garcez, F. R., Freitas, K. F., Garcez, W. S., Freitas, K. C., Garcez, W. S., Toffoli-Kadri, M. C. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Croton urucurana* Baillon bark. *Journal of Ethnopharmacology*. **2016**; 183: 128-135.
- Couto, N., Wood, J., Barber, J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine*. **2016**; 95, 27–42.
- Coy-Barrera, C. A., Gómez, D. C., Castiblanco, F. A. Importancia medicinal del género *Croton* (Euphorbiaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. **2016**; 21 (2): 234-247.
- Czaja, A.J. Nature and implications of oxidative and nitrosative stresses in autoimmune hepatitis. *Digestive Diseases and Sciences*. **2016**; 61(10): 2784-2803.
- Czaja, M. J., Ding, W. X., Donohue, T. M., Friedman, S. L., Kim, J. S., Komatsu, M., Lemasters, J. J., Lemoine, A., Lin, J. D., Ou, J. H., Perlmutter, D. H., Randall, G., Ray, R. B., Tsung, A., Yin, X. M. Functions of autophagy in normal and diseased liver. *Autophagy*. **2013**; 9(8): 1131-1158.
- Danan, G., Benichou, C. Causality assessment of adverse reactions to drugs—I. A novel method based on the conclusions of international consensus meetings: Application to drug-induced liver injuries. *Journal of Clinical Epidemiology*. **1993**; 46 (11): 1323–1330.
- Dancygier, H. Hepatic Biotransformation. In: Clinical Hepatology. Berlin; Springer. **2010**.
- Da Silva, R. P. F. F., Rocha-Santos, T. A. P., Duarte, A. C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *Trends in Analytical Chemistry*. **2016**; 76: 40-51.
- Da Silva-Brito, S. S., Silva, F., Malheiro, R., Baptista, P., Pereira, J.A. *Croton argyrophyllus* kunth and *Croton heliotropiifolius* Kunth: Phytochemical characterization and bioactive properties. *Industrial Crops & Products*. **2018**; 113, 308-315.
- De David, C., Rodrigues, G., Bona, S., Meurer, L., González-Gallego, J., Tuñón, M. J., Marroni, N. P. Role of Quercetin in Preventing Thioacetamide-Induced Liver Injury in Rats. *Toxicologic Pathology*. **2011**; 39(6), 949–957.
- Degu, A., Engidawork, E., Shibeshi, W. Evaluation of the anti-diarrheal activity of the leaf extract of *Croton macrostachyus* Hocsht. Ex Del. (Euphorbiaceae) in mice model. *Complementary and alternative medicine*. **2016**; 16(1): 379.
- Delgado-Montemayor, C., Cordero-Pérez, P., Salazar-Aranda, E., Waksman-Minsky, N. Models of hepatoprotective activity assessment. *Medicina Universitaria*. **2015**; 17(69): 222-228.
- De Moraes, N. L., Ribeiro, D. M., Dos Santos, S. M., Ferreira, C. J., Cavalcanti, F. I., de Albuquerque, T., Mota, C. R., Araújo, R. M., Viana, G. S., Martins, R. D., Havt, A., Ximenes, R. M. Antinociceptive effect of the essential oil obtained from the leaves of *Croton cordiifolius* Baill. (Euphorbiaceae) in Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. **2015**; 2015: 620865.
- Dent, M., Dragovic-Uzelac, V., Penic, M., Brncic, M., Bosiljkov, T., Levaj, B. The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in

- Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technology and Biotechnology*. **2013**; 1: 84–91.
- Devaraj, A., Roy, A., Royapuram, V. G., Magesh, A., Varikalam, S. A., Arivarasu, L., Marimuthu, P. B. β -sitosterol attenuates carbon tetrachloride-induced oxidative stress and chronic liver injury in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **2020**; DOI: 10.1007/s00210-020-01810-8.
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Research*. **2012**; 46(4): 382-419.
- Domitrovic, R., Potocnjak, I. A comprehensive overview of hepatoprotective natural compounds: mechanism of action and clinical perspectives. *Archives of Toxicology*. **2016**; 90 (1): 39-79.
- Donfack, J. H., Fotso, G. W., Ngameni, B., Tsofack, F. N., Tchoukoua, A., Ambassa, P., Abia, W. A., Tchana, A. N., Giardina, S., Buonocore, D., Finzi, P. V., Vidari, G., Marzatico, F., Ngadjui, B. T., Moundipa, P. F. In vitro hepatoprotective and antioxidant activities of the crude extract and isolated compounds from *Irvingia gabonensis*. *Asian Journal of Traditional Medicines*. **2010**; 5:79-88.
- Dong, V., Nanchal, R., Karvellas, I. Pathophysiology of acute liver failure. *Nutrition in clinical practice*. **2019**; 35 (26).
- Doumas, B. T., Watson, W. A., Briggs, H. G. Albumin standars and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clinica Chimica Acta*. **1971**; 258(1): 21-30.
- Dudonné, S., Vltrac, X., Countiere, P., Woillez, M., Mérillon, J. M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2009**; 57(5): 1768-1774.
- Duke, J., Vasquez, R. Amazonian Ethnobotanical Dictionary. Boca Raton; *CRC Press*. **1994**.
- Dutta, S., Chakraborty, A. K., Dey, P., Kar, P., Guha, P., Sen, S., Kumar, A., Sen, A., Chaudhuri, T. K. Amelioration of CCl₄ induced liver injury in swiss albino mice by antioxidant rich leaf extract of *Croton bonplandianus* Baill. **2018**; 13(4): e0196411.
- Echeverri, R., Nancy, P., Mockus, S. Factor nuclear κ B (NF- κ B): Signalosoma y su importancia en enfermedades inflamatorias y cáncer. *Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia*. **2008**; 56(2): 133-146.
- Esmeraldino, L. E., Souza, A. M., Sampaio, S. V. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararacá*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. *Phytomedicine*. **2005**; 12(8): 570-576.
- Everhart, J. E., Wright, E.C. Association of -Glutamyl Transferase (GGT) Activity with Treatment and Clinical Outcomes in Chronic Hepatitis C (HCV). *Hepatology*. **2013**; 57(5): 1725–1733.
- Faloppi, L., Bianconi, M., Memeo, R., Casadei Gardini, A., Giampieri, R., Bittoni, A., Andrikou, K., Del Prete, M., Cascinu, S., Scartozzi, M. Lactate Dehydrogenase in Hepatocellular Carcinoma: Something Old, Something New. *BioMed Research International*. **2016**; 1–7.
- Fayaz, S. M., Kumar, V. S. S., Rajanikant, G. K. Necroptosis: who knew there were so many interesting ways to die? *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*. **2014**; 13(1), 42-51.
- Fernandes, H. M. B., Leao, A. D., Oliveira-Filho, A. A., Sousa, J. P., Oliveira, T. L., Lima, E. O., Silva, M. S., Tavares, J. F. Antimicrobial activity and phytochemical screening of extracts from

- leaves of *Croton polyandrus* Spreng. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. **2013**; 5(3): 223-226.
- Fernando, C. D., Soysa, P. Total phenolic, flavonoid contents, *in vitro* antioxidant activities and hepatoprotective effect of aqueous leaf extract of *Atalantia ceylanica*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **2014**; 14: 395.
- Ferriero, R., Nusco, E., De Cegli, R., Carissimo, A., Manco, G., Brunetti-Pierri, N. Pyruvate dehydrogenase complex and lactate dehydrogenase are targets for therapy of acute liver failure. *Journal of Hepatology*. **2018**; 69: 325-335.
- Fongang-Fotsing, S. Dawe, A., Angelbert Fusi, A., Jean Jules, B. K., Ulrich, K. K. D., Lateef, M., Ngouela, S. A. Crotoliganfuran, a new clerodane-type furano-diterpenoid from *Croton oligandrus* Pierre ex Hutch. *Natural Product Research*, **2019**; 1–9.
- Fontana, R. J., Hayashi, P. H., Gu, J., Reddy, K. R., Barnhart, H., Watkins, P. B., Serrano, J., Lee, W. M., Chalasani, N., Stolz, A., Davern, T., Talwakar, J. A. Idiosyncratic drug-induced liver injury is associated with substantial morbidity and mortality within 6 months from onset. *Gastroenterology*. **2014**; 147(1): 96-108.
- Fromenty, B. Inhibition of mitochondrial fatty acid oxidation in drug-induced hepatic steatosis. *Liver Research*, **2019**; 3 (3-4): 157-169.
- Fukuma, Y., Sakai, E., Nishishita, K., Okamoto, K., Tsukuba, T. Cafestol has a weaker inhibitory effect on osteoclastogenesis than kahweol and promotes osteoblast differentiation. *BioFactors*. **2015**; 41(4): 222-231.
- Gangadharan, B., Antrobus, R., Chittenden, D., Rossa, J., Bapat, M., Klenerman, P., Barnes, E., Dwek, R. A., Zitzmann, N. New approaches for biomarker discovery: the search for liver fibrosis markers in hepatitis C patients. *Journal of Proteome Research*. **2011**; 10(5): 2643-2650.
- Gao, H., Li, N., Wang, J. Y., Zhang, S. C., Lin G. Definitive diagnosis of hepatic sinusoidal obstruction syndrome induced by pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Digestive Diseases*. **2012**; 13(1): 33-9.
- Gao, H. Y., Li, G. Y., Huang J., Han, Y., Sun, F. Z., Du, X. W., An, L. J., Wang, H. Y., Wang, J. H. Protective effect of Zhuyeqing liquor, a Chinese traditional health liquor, on acute alcohol-induced liver injury in mice. *Journal of Inflammation*. **2013**; 10(1): 1-9.
- García-Sánchez A and Marqués-García F. Review of Methods to Study Gene Expression Regulation Applied to Asthma. *Methods in Molecular Biology*. **2016**; 1434:71–89.
- Gayosso-De-Lucio, J., Bautista, M., Velázquez-González, C., De la O, A. M., Morales-González, J. A., Benedi, J. Chemical composition and hepatotoxic effect of *Geranium schiedeanum* in a thioacetamide-induced liver injury model. *Pharmacognosy Magazine*. **2015**; 10(3): S574-S580.
- George, J., Tsuchishima, M., Tsutsumi, M. Molecular mechanisms in the pathogenesis of N-nitrosodimethylamine induced hepatic fibrosis. *Cell death & disease*. **2019**; **10**: 18.
- Giday, M., Teklehaymanot, T., Aminut, A., Mekennen, Y. Medicinal plants of the Shinasha, Agewawi and Amhara peoples in northwest Ethiopia. *Journal of Ethnopharmacology*. **2007**; 110(3): 516-525.

- Gordillo, M. M., Ramírez, J. J., Durán, R. C., Arriaga, E. J., García, R., Cervantes, A., Hernández, R. M. Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México (Parte A). *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica*. **2002**; 73 (2): 155-281.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., David, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*. **1949**; 177(2): 751-766.
- Gounden, V., Vashisht, R., Jialal, I. Hypoalbuminemia. In: StatPearls. Treasure Island. StatPearls Publishing. **2020**; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526080/>.
- Govind, P. Medicinal plants against liver diseases. *International research journal of pharmacy*. **2011**; 2(5): 115-121.
- Granado-Serrano, A. B., Martín, M. A., Bravo, L., Goya, L., Ramos, S. Quercetin modulates Nrf2 and glutathione-related defenses in HepG2 cells: Involvement of p38. *Chemico-Biological Interactions*. **2012**; 195(2): 154-164.
- Gu, Z., Manatou, J. E. Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. *Experts Reviews in Molecular Medicine*. **2012**; 14.
- Guo-AnZou, Z. H. S., Hong-Wu, Z., Yuan, W., Jun-Shan, Y., Zhong-Mei, Z. Flavonoids from the Stems of *Croton caudatus* Geisel. var. *tomentosus* Hook. *Molecules*. **2010**; 15:1097-1102.
- Guerrero, M. F., Carrón, R., Martín, M. L., San Román, L., Reguero, M. T. Antihypertensive and vasorelaxant effects of aqueous extract from *Croton schiedeanus* Schlecht in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **2001**; 75(1): 33-37.
- Gulati, K., Reshi, M. R., Rai, N., Ray, A. Hepatotoxicity: Its mechanisms, experimental evaluation and protective strategies. *American Journal of Pharmacology*. **2018**; 1(1): 1-9.
- Gwaltney-Brant, S. M. Nutraceutical in hepatic diseases Chapter 17. In: Gupta, R. C. Nutraceuticals. Efficacy, Safety and Toxicity. *Elsevier Inc*. **2016**. 87-99.
- Haga, Y., Kanda, T., Sasaki, R., Nakamura, M., Nakamoto, S., Yokusuka, O. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatic cirrhosis: comparison with viral hepatitis-associated steatosis. *World Journal of Gastroenterology*. **2015**; 21(46): 12989-12995.
- Hajovsky, H., Hu, G., Koen, Y., Sarma, D., Cui, W., Moore, D. S., Staudinger, J. L., Hanzlik, R. P. Metabolism and Toxicity of Thioacetamide and Thioacetamide S-Oxide in Rat Hepatocytes. *Chemical Research Toxicology*. **2012**; 25(9): 1955–1963.
- Halliwell, B. H., Gutteridge, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 5th edition. **2015**; Oxford University Press.
- Hammoutene, A., Rautou, P. E. Role of liver sinusoidal endothelial cells in the non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*. **2019**; 70 (6): 1278-1291.
- Harborne, J. B. Phytochemical methods –A guide to modern techniques of plant analysis. New Delhi: *Springer Pvt. Ltd*; **2005**.
- He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., Ma, X. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cellular Physiology and Biochemistry*. **2017**; 17: 532-553.
- Headlamand, H. A, Davies, M. J. Markers of protein oxidation: different oxidants give rise to variable yields of bound and released carbonyl products. *Free Radical Biology & Medicine*. **2004**; 36(9): 1175-1184.

- Hermenean, A., Mariasiu, T., Navarro-González, I., Vegara-Meseguer, J., Miutescu, E., Chakraborty, S., Pérez-Sánchez, H. Hepatoprotective Activity of Chrysin is Mediated Through TNF α in Chemically-Induced Acute Liver Damage: An in vivo Study and Molecular Modeling. *Experimental and Therapeutic Medicine*. **2017**; 13(5), 1671–1680.
- Hernández-Ortega, L. D., Alcántar-Díaz, B. E., Ruiz-Corro, L. A., Sandoval-Rodríguez, A., Bueno-Topete, M., Armendariz-Borunda, J., Salazar-Montes, A. M. Quercetin improves hepatic fibrosis reducing hepatic stellate cells and regulating pro-fibrogenic/anti-fibrogenic molecules balance. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. **2012**; 27(12): 1865–1872.
- Hissin, P. J., Hilf, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*. **1976**; 74(1): 214-226.
- Holmström, K. M., Kostov, R. V., Dinkova-Kostova, A. T. The multifaceted role of Nrf2 in mitochondrial function. *Current Opinion in Toxicology*. **2016**; 1: 80-89.
- Hunter DJ, Losina E, Guermazi A, Burstein D, Lasserre MN, Kraus V. A pathway and approach to biomarker validation and qualification for osteoarthritis clinical trials. *Curr Drug Targets*. **2010**; May; 11(5):536-45.
- Idle, J. R., Gonzalez, F. J. Metabolomics. *Cell Metabolism*. **2007**; 6(5): 348-351.
- Ighodaro, O. M., Akinloye, O. A. First line defense antioxidants- superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx): Their fundamental role in the entire antioxidant defense grid. *Alexandria Journal of Medicine*. **2018**; 54(4): 287-293.
- Ihsan, U. A., Ullah, K. F., Khongorzul, P., Ahmad, K. L., Naveed, M., Yasmeen, S., Cao, Y., Taleb, A., Maiti, R., Akhter, X. L., Li, X., Cheng, Y., Khan, H. U., Alam, K., Zhou, X. Role of oxidative stress in pathology of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and male infertility and antioxidants function in ameliorating oxidative stress. *Biomed & Pharmacotherapy*. **2018**; 106: 714-723.
- INEGI. Características de las defunciones registradas en México durante 2017. Comunicado de Prensa No. 525/18. **2018a**; Consultado el 22 de octubre de 2019. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSociodemo/DEFUNCIONES2017.pdf>.
- INEGI. Defunciones generales registradas por entidad federativa de residencia habitual de la persona fallecida según sexo, 2010 a 2017. **2018b**; Consultado el 22 de octubre de 2019. Disponible en: https://www.inegi.org.mx/app/tabulados/pxweb/inicio.html?rxid=75ada3fe-1e52-41b3-bf27-4cda26e957a7&db=Mortalidad&px=Mortalidad_01.
- INNSZ. Medicina tradicional. Generalidades y aspectos éticos. **2017**. Disponible en: <http://www.innsz.mx/opencms/contenido/investigacion/comiteEtica/medicinaTradicional.html>.
- Iqbal, E., Abu-Salim, K., Lim, L. B. L. Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) from Brunei Darussalam. *Journal of King Saud University- Science*. **2015**; 27(3): 224-232.
- Jaeschke, H. Toxic responses of the liver. In: Klaasen, C.D. (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology, the Basic Science of Poisons. Eighth edition. *McGraw-Hill Medical*. **2013**; 639-664.

- Jaradat, N., Hussen, F., Al Ali, A., Alniss, H., Dweikat, M. Phytoconstituents, free radical scavenging potential, total phenols, and total flavonoids for violet horned poppy from Jerusalem mountains. *Journal of Materials and Environmental Sciences*. **2015**; 6(10): 2958-2966.
- Jaya Santhi, R., Beaulah, G. A., Sadiq, A. M., CHakkaravarthy, V. M. Hepatoprotective activity of methanolic extract of *Croton sparciflorus* on DED induced hepatotoxicity in Wistar albino rats. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*. **2014**; 4(4): 1002-1011.
- Jayakumar, K., Murugan, K. *Solanum* alkaloids and their pharmaceutical roles: A Review. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*. **2016**; 3(6):00075.
- Jeeshna, M. V., Paulsamy, S., Mallikadevi, T. Phytochemical constituents and antimicrobial studies of the exotic plant species, *Croton bonplandianum* Baill. *Journal of life sciences*. **2011**; 3(1): 23-27.
- Jennings, R., Premanandan, C. Hepatobiliary System. En: Veterinary Histology. Ohio States University Libraries. **2017**; <https://open.umn.edu/opentextbooks/textbooks/veterinary-histology>.
- Jiang, X., Du, B., Zheng, J. Glutathione-mediated biotransformation in liver modulates nanoparticle transport. *Nature Nanotechnology*. **2019**. doi:10.1038/s41565-019-0499-6.
- Kaczmarek, A., Vandenabeele, P., Krysko, D. V. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity*. **2013**; 38(2): 209-223.
- Kaur, S., Sharma, D., Singh, A. P., Kaur, S. Amelioration of hepatic function, oxidative stress, and histopathologic damages by *Cassia fistula* L. fraction in thioacetamide-induced liver toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*. **2019**; 26(29):29930-29945.
- Kang, M. J., Song, W. H., Shim, B. H., Oh, S. Y., Lee, H. Y., Chung, E. Y., Sohn, Y., Lee, J. Pharmacologically Active Metabolite of Currently Marketed Drugs: Potential Resources for New Drug Discovery and Development. *Pharmaceutical Society of Japan*. **2010**; 130(10): 1325–1337.
- Koenig, G., Seneff, S. Gamma-glutamyltransferase: A predictive biomarker of cellular antioxidant inadequacy and disease risk. *Disease Markers*. **2015**; 2015:818570.
- Kolios, G., Valatas, V., Kouroumalis, E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World Journal of Gastroenterology*. **2006**; 12(46): 7413-7420.
- Krishnamurthy, T. P., Bajaj, J., Sharma, A., Maimaran, S., Bommenahalli, R. P. K., Pottkad, V. Hepatoprotective activity of terpenoids and terpenoid fractions of *Scoparia dulcis* L. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. **2010**; 10(4), 263-270.
- Kryston, T. B., Georgiev, A. B., Pissis, P., Georgakilas, A. G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research*. 2011; 711(1-2): 193-201.
- Kulakov, A. Liver and biotransformation of Xenobiotics. **2019** [Consultado el 12 de enero de 2020]. Disponible en: <http://fbilt.cz/en/skripta/ix-travici-soustava/5-jatra-a-biotransformace-xenobiotik/>.
- Kullak-Ublick, G. A., Andrade, R. J., Merz, M., End, P., Benesic, A., Gerbes, A. L., Aithal, G. O. Drug-induced liver injury: recent advances in diagnosis and risk assessment. *Gut*. **2017**; 66(6): 1154-1164.

- Kumar, G. S., Jayaveera, K. N., Kumar, C. K., Sanjay, U. P., Swamy, B. M., Kumar, D.V. Antimicrobial effects of Indian medicinal plants against acne-inducing bacteria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. **2007**; 6(2): 717-723.
- Kumar, S. V., Sanjeev, T., Ajay, S., Pravesh Kumar, S., Anil, S. A review on hepatoprotective activity of medicinal plants. *International Journal of Advanced Research in Pharmaceutical & Bio Sciences*. **2012**; 2(1): 31-38.
- Kumar, Y. S., Das, S. Phytochemical screening and antidiarrhoeal activity of aqueous extracts of *Croton sparsiflorus* Morong. *International Journal of Pharma Research & Review*. **2013**; 2(7): 12-16.
- Kurutas, E. B. The Importance of Antioxidants which Play the Role in Cellular Response against Oxidative/Nitrosative Stress: Current State. *Nutrition Journal*. **2016**; 15(1): 71.
- Ladep, N. G., Akbar, S. M.F., Al Mahtab, M. Global epidemiology of Chronic liver disease. Global epidemiology of chronic liver disease. *Clinical Epidemiology of chronic liver diseases*. **2018**; 41-55.
- Lahlou, S. Leal-Cardoso, J. H., Magalhães, P. J. Essential oil of *Croton nepetaefolius* decreases blood pressure through an action upon vascular smooth muscle: studies in DOCA-salt hypertensive rats. *Planta Medica*. **2000**; 66(2); 138-143.
- Lampronti, I., Dehecchi, M. C., Rimessi, A., Bezzerri, V., Nicolis, E., Guerrini, A., Tacchini, M., Tamanini, A., Munari, A., Aversa, A., santagelo, A., Lippi, G., Sachetti, G., Pinton, P., Gambari, R., Agostini, M., Cabrini, G. β -sitosterol reduces the expression of chemotactic cytokine genes in cystic fibrosis bronchial epithelia Cells. *Frontiers in Pharmacology*; **2017**; 8:236.
- Lee, D. H., Son, D. J., Park, M. H., Yoon, D. Y., Han, S. B., Hong, J. T. Glutathione peroxidase 1 deficiency attenuates concanavalin A-induced hepatic injury by modeulation of T-cell activation. *Cell Death & Disease*. **2016**; 7(4): e2208.
- Lee, J. K, Kim, J.H., Shin, H. K. Therapeutic effects of the oriental herbal medicine Sho-saiko-to on liver cirrhosis and carcinoma. *Hepatology Research*. **2011**; 41:825–837.
- Lee, K. Y., Choi, J, H., Jeong, H. G. Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Food and Chemical Toxicology*. **2007**; 45(11): 2118-2125.
- Lee, S. R. Critical role of zinc as either an antioxidant or a prooxidant in cellular systems. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2018**; 1-11.
- Lee, W. M. Drug-induced hepatotoxicity. *The New England Journal of Medicine*. **2003**; 349: 474-485.
- Lefkowitz, J. H. Anatomy and function. In: Dooley, J. S., Lok, A. S. F., Burroughs, A. K., Heathcote, E. J. Shelorck's diseases of the liver and biliary system. 12th Edition. United Kingdom; *Wiley-Blackwell*. **2011**. 12-15.
- Lei, X.G., Zhu, J-H., Cheng. W-H., Bao, Y., Ho, Y-S., Reddi, A. R., Holmgren, A., Arnér, E. S. J. Paradoxical roles of antioxidant enzymes: basic mechanisms and health implications. *Physiological Reviews*. **2016**; 96(1): 307–364.
- Levitt, D. G., Levitt, M. D. Human serum albumin homeostasis: a new look at the roles of synthesis, catabolism, renal and gastrointestinal excretion, and the clinical value of serum albumin measurements. *International Journal of General Medicine*. **2016**; 9:229-55.

- Li, J., Gao, Y., Chu, S., Zhang, Z., Xia, C., Mou, Z., Song, X. Y., He, W. B., Guo, X. F., Chen, N. H. Nrf2 pathway activation contributes to anti-fibrosis effects of ginsenoside Rg1 in a rat model of alcohol- and CCl₄-induced hepatic fibrosis. *Acta Pharmacologica Sinica*. **2014**; 35(8): 1031–1044.
- Li, J., Zhao, Y-R., Tian, Z. Roles of hepatic stellate cells in acute liver failure: from the perspective of inflammation and fibrosis. *World Journal of Hepatology*, **2019**; 11(5): 415-420.
- Li, S., Tan, H. Y., Wang, N., Zhang, Z. J., Lao, L., Wong, C. W., Feng, Y. The role of oxidative Stress and antioxidants in liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. **2014**; 16(11); 26087–26124.
- Lima, L. R. D., Pirani, J. R. Taxonomic revision of *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll Arg) Pax (Euphorbiaceae ss). *Biota neotropica*. **2008**; 8(2): 177-215.
- Lima, F. C., Sousa, D. F., Lima J. R., Tome, A. R., Cardoso, J. H. L., Quiroz, M.G.R., Campos, A. R. *Croton zehntneri* essential oil prevent acetaminophen induced acute hepatotoxicity in mice. *Records of Natural Products*. **2008**; 2(4): 135-140.
- Lin-Gen, L., Ung, C.O.L., Feng, Z.L., Huang, L., Hu, H. Naturally occurring diterpenoids dimers: Source, biosynthesis, chemistry and bioactivities. *Planta Medica*. **2016**; 82(15): 1309–1328.
- Liu, C. P., Xu, J. B., Zhao, J. X., Xu, C. H., Dong, L., Ding, J., Yue, J. M. Diterpenoids from *Croton laui* and their cytotoxic and antimicrobial activities. *Journal of Natural Products*. **2014**; 77(4): 1013-1020.
- Loeper, J., Descatoire, V., Letteron, P., Moulis, C., Degott, C., Dansette, P., Pessayre, D. Hepatotoxicity of germander in mice. *Gastroenterology*, **1994**; 106 (2), 464–472.
- Lorke, D. A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology*. **1983**; 54(4): 275-287.
- Lowe D, John S. Alkaline Phosphatase. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; **2020**. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459201/>
- Luczaj, W., Gegotek, A., Skrzydlewska, E. Antioxidants and HNE in redox homeostasis. *Free Radical Biology and Medicine*. **2017**; 111: 87-101.
- Luo, M., Dong, L., Li, J., Wang, Y., Shang, B. Protective effects of pentoxifylline on acute liver injury induced by thioacetamide in rats. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. **2015**; 8(8): 8990-8996.
- Mahendale, H. M., Chilakapati, J. Thioacetamide. En: McQueen, C. A. *Comprehensive toxicology*. Segunda Edición. United Kingdom; *Elsevier*. **2010**. 627-638.
- Mannervik, B. Measurement of glutathione reductase activity. *Current Protocols in Toxicology*. **2001**.
- Marchyshak, T., Yakovenko, T., Shmarakov, I., Tkachuk, Z. The potential protective effect of oligoribonucleotides-D-mannitol complexes against thioacetamide-induced hepatotoxicity in mice. *Pharmaceuticals*. **2018**; 11:77.
- Martínez, G. M., Jiménez, R. J., Cruz, D. R., Juárez, A. E., García, R., Cervantes, A., Mejía, H. R. Los géneros de la familia *Euphorbiaceae* en México. *Anales del Instituto de Biología. Universidad Autónoma de México. Serie botánica*. **2002**; 72(2): 155-281.
- Marchesini, G., Bugianesi, E., Forlani, G., Cerrelli, F., Lenzi, M., Manini, R., Natale, S., Vanni, E., Villanova, N., Melchionda, N., Rizzetto, M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*. **2003**; 37(4): 917-923.

- Martinek, R. Improved micro-method for determination of serum bilirubin. *Clinica Chimica Acta*. **1966**; 13: 61-170.
- Maroyi, A. Ethnopharmacological uses, phytochemistry, and pharmacological properties of *Croton macrostachyus* Hochst. Ex Delile: A comprehensive review. *Evidence-Based complementary and alternative medicine*. **2017a**; 2017: 1-7.
- Maroyi, A. Ethnomedical uses and pharmacological activities of *Croton megalobotrys* Müll Arg: A systematic review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. **2017b**; 16(10): 2535-2543.
- Maslak, E., Gregorius, A., Chlopicki, S. Liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) function and NAFLD; NO-based therapy targeted to the liver. *Pharmacological Reports*. **2015**; 67(4): 689–694.
- Mata-Santos, H. A., Dutra, F. F., Rocha, C. C., Lino, F. G., Xavier, F. R., Chinalia, L. A., Hossy, B. H., Castelo-Branco, M. T., Teodoro, A. J., Paiva, C. N., dos Santos Pyrrho, A. Silymarin reduces profibrogenic cytokines and reverses hepatic fibrosis in chronic murine schistosomiasis. *Antimicrob Agents Chemother*. **2014**; 58(4): 2076-2083.
- Matos, J. M., Witzmann, F. A., Cummings, O. W., Schmidt, C. M. A pilot study of proteomic profiles of human hepatocellular carcinoma in the United States. *Journal of Surgical Research*. **2009**; 155(2): 237-243.
- Mbemba, F. R., Mutwale, K. P., Mboloko, E. J., Reclame, J. Kabamba, N. N. Subcellular localization of glutathione peroxidase, change in glutathione system during ageing and effects on cardiometabolic risks and associated diseases. Intechopen. **2019**; <https://www.intechopen.com/online-first/subcellular-localization-of-glutathione-peroxidase-change-in-glutathione-system-during-ageing-and-ef>.
- McGill, M. R., Woolbright, B. L., Weemhoff, J. L., & Jaeschke, H. Mechanistic Biomarkers in Liver Diseases. *Biomarkers in Liver Disease*. **2017**; 1–27.
- McGovern, A. J., Vitkovtsky, I. V., Jones, D. L., Mullins, M. Can AST/ALT ratio indicate recovery after acute paracetamol poisoning? *Clinical Toxicology*. **2015**; 53(3): 164–167.
- Meireles, D. R. P., Fernandes, H. M. B., Rolim, T. L., Batista, T. M., Manguiera, V. M., De Sousa, T. K. G., Pita, J. C. L. R., Xavier, A. L., Beltráp. D. M., Tavares, J. F., Silva, M. S., Medeiros, K. K. P., Sobral, M. V. Toxicity and antitumor efficacy of *Croton polyandrus* oil against Ehrlich ascites carcinoma cells. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. **2016**; 1-8.
- Meng, X., Li, Y., Li, S., Gan, R. Y., Li, H. B. Natural products for prevention and treatment of chemical-induced liver injuries. *Comprehensive Reviews in food science and food safety*. **2018**; 17: 472-495.
- Mierziak, J., Kostyn, K., Kulma, A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with environment. *Molecules*. **2014**; 19(10): 16240–16265.
- Miguel, F. M., Schemitt, E.G., Corales, J. R., Hartmann, R. M., Morgan-Martins, M. I., Marroni, N. P. Action of vitamin E on experimental severe acute liver failure. *Arquivos de gastroenterologia*. **2017**; 54 (2): 123-129.
- Mihara, M., Uchiyama, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*. **1978**; 86(1):271-278.
- Miller, M., McNaughton, W., Zhang, X., Thompson, J., Charbonnet, R., Bobrowski, P., Lao, J., Trentacosti, A. M., Sandoval, M. Treatment of gastric ulcers and diarrhea with the

- Amazonian herbal medicine sangre de grado. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. **2000**; 279(1): G192-G200.
- Min, B., McClung, A. M., Chen, M. H. Phytochemicals and antioxidant capacities in rice brans of different color. *Journal of Food Science*. **2011**; 76(1): 17-126.
- Mirmiran, P., Gaeini, Z., Bahadoran, Z., Aizi, F. Elevated serum levels of aminotransferases in relation to unhealthy foods intake: Tehran lipid and glucose study. *BMC Endocrine Disorders*. **2019**; 19:100.
- Mitsis, T., Efthimiadou, A., Bacopoulou, F., Wlachakis, D., Chrousos, G. P., Eliopoulos, E. Transcription factors and evolution: an integral part of gene expression. *World Academy of Sciences*. **2020**; DOI: 10.3892/wasj.2020.32
- Mittal, M., Riwan, S. M., Tran, K., Reddy, S. P., Malik, A. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants & Redox signaling*. **2014**; 20 (7): 1127-1147.
- Moghimpour, E., Handali, S. Saponin: Properties, methods of evaluation and applications. *Annual Research & Review in Biology*. **2015**; 5(3): 207-220.
- Mohammadi, M., Jafar-Rezaie, M., Rostamzadeh, A., Allahveisi, A., Reza-Mohammadi, H., Mohammadi, F., Moayeri, A. Signaling pathways of melatonin in prevention of liver disorders via suppressing of oxidative stress in cellular level. *Biomedical & Pharmacology Journal*. **2016**; 9(2):555-561.
- Mokdad, A. A., Lopez, A. D., Shahrzaz, S., Lozano, R., Mokdad, A. H., Stanaway, J., Murray, C. J., Naghavi M. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *BMC Medicine*. **2014**; 12: 145.
- Molavian, H., Tonekaboni, A. M., Kohandel, M., Sivaloganathan, S. The Synergetic Coupling among the Cellular Antioxidants Glutathione Peroxidase/Peroxiredoxin and Other Antioxidants and its Effect on the Concentration of H₂O₂. *Scientific Reports*. **2015**; 5: 1-8.
- Morais, S. E., Cossolosso, D. S., Silva, A. A. S., de Niraes, F. M. O., Texeira, M. J., Campello, C. C., Bonilla, O. H., Paula, J. V. K., Vila-Nova, N. S. Essential oils from *Croton* species: chemical composition, *in vitro* and *in silico* antileishmanial evaluation, antioxidant and cytotoxicity activities. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **2019**; 30(1): 2404-2412.
- Morales-Flores, F., Aguilar, M. I., King-Díaz, B., De Santiago-Gómez, J. R., Lotina-Hennsen, B. Natural diterpenes from *Croton ciliatoglanduliferus* as photosystem II and photosystem I inhibitors in spinach chloroplasts. *Photosynthesis Research*. **2007**; 91(1): 71-80.
- Morales, L., Véles, N., Muñoz, G. O. Hepatotoxicidad: patrón colestásico inducido por fármacos. *Asociaciones colombianas de Gastroenterología, endoscopia digestiva, coloproctología y hepatología*. **2016**; 36-47.
- Moreira, V.F., Garrido, E. Pruebas de función hepática: B, AST, ALT, FA y GGT. *Revista Española de Enfermedades digestivas*. **2015**. <https://bit.ly/2zbw9Ao>.
- Morio, L. A., Chiu, H., Sprowles, K. A., Zhou, P., Heck, D. E., Gordon, M. K., Laskin, D. L. Distinct roles of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2001**; 172(1): 44-51.
- Moussa, Z., Judeh, Z. M. A., Ahmed, S. Nonenzymatic exogenous and endogenous antioxidants. *IntechOpen*. **2019**; <https://bit.ly/3fdxohW>.

- Mosca, F., Indra, H. G., Villasante, J., Almajano, M. P. Continuous or batch solid-liquid extraction of antioxidant compounds from seeds of *Sterculia apetala* plant and kinetic release study. *Molecules*. **2018**; 23: 1759.
- Munro, T. A., Rizzacasa, M. A., Roth, B. L., Toth, B. A., Yan F. Studies toward the pharmacophore of Salvinorin A, a potent kappa opioid receptor agonist. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2005**; 48(2): 345-348.
- Muriel, P., Moreno, M. G., Hernández Mdel, C., Chávez, E., Alcantar, L. K. Resolution of liver fibrosis in chronic CCl₄ administration in the rat after discontinuation of treatment: effect of silymarin, silibinin, colchicine and trimethylcolchicinic acid. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. **2005**; 96(5): 375-380.
- Muriel, P., Ramos-Tovar, E., Montes-Páez, G., Buendía-Montaño, L. D. Experimental models of liver damage mediated by oxidative stress. En: Muriel, P. (Ed.). *Liver Pathophysiology. Therapies and antioxidants*. **2017**; 530 p.
- Murray, R. L. Alanine aminotransferase. En: Kaplan LA, Pesce AJ (Eds). *Clinical Chemistry. Theory, analysis and correlation*. CV Mosby St Louis 1984:1090.
- Mustafa, H. N., El Awdan, S. A., Hegazy, G. A. Protective role of antioxidants on thioacetamide-induced acute hepatic encephalopathy: Biochemical and Ultrastructural study. *Tissue and Cell*. **2013**; 45(5): 350-362.
- Nafees, I. M. Phytochemical and antibacterial screening of *Croton bonplandianum* leaf extracts. *International Journal of science and research methodology*. **2016**; 3(3): 73-76.
- Nandi, A., Yan, L.-J., Kumar, J. C., Das, N. Role of catalase in oxidative stress- an age-associated degenerative disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2019**; 11: 9613090.
- Nardi, G. M., Felippi, R., Dalbó, S., Siqueira-Junior, J. M., Arruda, D. C., Delle Monache, F., Timbola, A. K., Pizzolatti, M. G., Ckless, K., Ribeiro-do-valle, R. M. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. *Phytomedicine*. **2003**; 10(2-3): 176-84.
- Nascimento, A. M., Ferreira, D.M., de Souza, E. F., de Souza, M. L., Sasaki, G., Lacomini M., Werner, M. F., Cipriani, T. R. Gastoprotective effect and chemical characterization of a polysaccharide fraction from leaves of *Croton cajucara*. *International Journal of Biological Macromolecules*. **2017**; 95: 153-159.
- Ndhlala, A. R., Aderogba, M. A., Ncube, B., Van Staden, J. Anti-oxidative and cholinesterase inhibitory effects of leaf extracts and their isolated compounds from two closely related *Croton* species. *Molecules*. **2013**; 18(2), 1916-1932.
- Ndhlala, A. R., Mupure, C., Chitindingu, K., Benhura, M. A., Muchuweti, M. Antioxidant potentials and degrees of polymerization of six wild fruits. *Scientific Research and Essays*. **2006**; 1(3): 87-92.
- Ndunda, B. E. Phytochemistry and bioactivity investigations of three kenyan *Croton* Species. University of Naibori. Thesis of Doctor of Philosophy Degree in Chemistry. **2014**. Naibori, Kenya.
- Neha, J. M. R., Mishra, R. Antioxidant activity of Trikatu magaExt. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biochemical Sciences*. **2011**; 2: 624-268.
- Newell, P., Villanueva, A., Friedman, S. L., Koike, K., Llovet, J. M. Experimental models of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. **2008**; 48(5), 858-879.

- Niranjan A. Biological activity of Kalmegh and its active principles –A review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*. **2010**; 1(2): 125-135.
- Noman, N. E., Gupta, N., Sheikh, N. S., Varacallo, M. Physiology, Albumin. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, **2020**. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459198/>.
- Obey, J. K., Wright, A., Orjala, J., Kauhanen, J., Tikkanen-Kaukanen, C. Antimicrobial activity of *Croton macrostachyus* stem bark extracts against several human pathogenic bacteria. *Journal of Pathogens*. **2016**; 1-5.
- Okechukwu, P. N., Ekeuku, S. Inhibition of arachidonic acid-induced ear edema, mast-cell stabilizing and free radical effect of dichloromethane crude extracts from the leaves of *Labisia pumila*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. **2013**; 1(1): 93-5.
- Oleszek, W., Hamed, A. Saponin - based surfactants. In: Kjellin, M., Johansson, I. editors. Surfactants from Renewable Sources Resources. Chichester, UK; *John Wiley & Sons Ltd*. **2010**. 239-249.
- Paik, Y. H., Kim, J., Aoyama, T., De Minicis, S., Bataller, R., Brenner, D. A. Role of NADPH oxidases in liver fibrosis. *Antioxidants & Redox Signaling*. **2014**; 20(17): 2854-2872.
- Panda, K. S., Bastia, A. K., Dutta, K. S. Acticandidal activity of *Croton roxburgii* Balak. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. **2010**; 2(4).55-59.
- Paradies, G., Paradies, V., Ruggiero, F. M., Petrosillo, G. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*. **2014**; 20(39): 14205-14218.
- Parasuraman, S. Toxicological screening. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapy*. **2011**; 2(2):74-79.
- Pardo, R. D. A., Ortíz-Romero, L. T., Tacha, A. L., Murillo-Perea, E., Méndez-Arteaga, J. J., Murillo-Arango, W. Estudio química y etnobotánico de *Croton leptostachyus*. *Revista de la Academia Colombiana de las Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. **2014**; 38(149): 356-363.
- Parekh, J., Chanda, S. V. In vitro antimicrobial activity and phytochemical an analysis of Some Indian medicinal plants. *Turkish Journal of Biology*. **2016**; 31(1): 53-58.
- Payo-Hill, A., Dominicis, M. E., Mayor, J., Oquendo M., Sarduy, R. Tamizaje fitoquímico preliminar de especies del género *Croton*. *Revista Cubana de Farmacia*. **2001**; 35(3): 203-206.
- Peng, C-H., Lin, H-T., Chung, D-J. Huang, C-N., Wang, C-J. Mulberry Leaf Extracts prevent obesity-induced NAFLD with regulating adipocytokines, inflammation and oxidative stress. *Journal of Food and Drug Analysis*. **2018**; 26(2), 778–787
- Peng, H., Wisse, E., Tian, Z. Liver natural killer cells: subsets and roles in liver immunity. *Cellular & Molecular Immunology*. **2016**; 13: 328-336.
- Pérez-Vargas, J. E., Zarco, N., Vergara, P., Shibayama, M., Segovia, J., Tsutsumi, V., Muriel P. I. Theanine prevents carbon tetrachloride-induced liver fibrosis via inhibition of nuclear factor κ B and down-regulation of transforming growth factor β and connective tissue growth factor. *Human & Experimental Toxicology*. **2016**; 35(2): 135-146.
- Pisoschi, A. M., Pop, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2015**; 97: 55-74.
- Plaa, G. L. Evaluation of hepatotoxicity: physiological and biochemical measures of hepatic function in animals. En: McQueen, C. A. *Comprehensive toxicology*. Segunda Edición. United Kingdom; *Elsevier*. **2010**. 129-140.

- Poisson, J., Lemoinee, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D., Rautou, P. E. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *Journal of Hepatology*. **2017**; 66 (1): 212-227
- Pogozelski, W. K., Tullius, T. D. Oxidative strand scission of nucleic acids: Routes initiated by hydrogen abstraction from the sugar moiety. *Chemical Reviews*. **1998**; 98(3): 1089-1108.
- Poljsak, B., Suput, D., Milisav, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2013**; 2013: 11.
- Porchezian, E., Ansari, S. H. Hepatoprotective activity of *Abutilon indicum* on experimental liver damage in rats. *Phytomedicine*. **2005**; 12(1-2): 62-64.
- Pradeep, H. A., Khan, S., Ravikumar, K., Ahmed, M. F., Rao, M. S., Kiranmai, M., Reddy, D. S., Ahamed, S. R., Ibrahim, M. Hepatoprotective evaluation of *Anogeissus latifolia*. *In vitro* and *in vivo* studies. *World Journal of Gastroenterology*. **2009**; 15(38): 4816-4822.
- Prasad K. N. Simultaneous activation of Nrf2, elevation of antioxidants and reduction in glutamate level: An essential strategy for prevention and improved management of neurodegenerative Diseases. *Journal of Alzheimers Disease & Parkinsonism*. **2016**; 6(1): 6.
- Pudhom, K., Sommit, D. Clerodane diterpenoids and a trisubstituted furan from *Croton oblongifolius*. *Phytochemistry Letters*. **2011**; 4(2): 147–150.
- Qiu, M., Cao, D., Gao, Y., Li, S., Zhu, J., Yang, B., Zhoy, Y., Jin, J., Zhao, Z. New clerodane diterpenoids from *Croton crassifolius*. *Fitoterapia*. **2016**; 108: 81-86.
- Que, X., Hung, M. Y., Yeang, C. Oxidized phospholipids are proinflammatory and proatherogenic in hypercholesterolaemic mice. *Nature*. **2018**; 558(7709): 301-306.
- Rada P., Rojo A.I., Chowdhry S., McMahon M., Hayer J.D., Cuadrado A. SCF/b-TrCP Promotes Glycogen Synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner. *Molecular and Cellular Biology*. **2011**; 31(6): 1121-1133.
- Raffer, I., Graberg, T., Kotronen, A., Strömmer, L., Mattson, C. M., Kim, R. W., Ehrenborg, E., Andersson, H. B., Yki-Järvinen, H., Schuppe- Koistiene, I., Ekblom, B., Cotgreave, I., Glinghammar, B. Isoform-specific alanine aminotransferase measurement can distinguish hepatic from extrahepatic injury in humans. *International Journal of Molecular Medicine*. **2012**; 30(5): 1241-1249.
- Raghunath, A., Sundarraj, K., Nagarajan, R., Arfuso, F., Bian, J., Kumar, A. P., Sethi, G., Perumal, E. Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation, and potential applications. *Redox Biology*. **2018**; 17: 297-314.
- Rai, N., Ray, A., Jamil, S. S., Gulati, K. Cellular and molecular mechanisms of action of polyherbal preparation UNIM-352 in experimental models of bronchial asthma. *Indian Journal of Experimental Biology*. **2015**; 53(10): 625-631.
- Rajesh, A., Vijay, K., Pravesh, K. S., Radheshyam, K., Aakash, Y. Hepatoprotective models and screening methods: a review. *Journal of Drug Discovery and Therapeutics*. **2014**; 2(21): 49-56.
- Revathi, P., and Parimelazhagan, T. Traditional knowledge on medicinal plants used by the Irula tribe of Hasanur Hills, Erode District, Tamil Nadu, India. *Ethnobotanical Leaflets*. **2010**; 14: 136-160.

- Rej, R., Horder, M. Aspartate aminotransferase. L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotranferase, EC 2.6.2.1. Routine U.V. method. In: Bergmeyer HU Editor. *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd ed., vol III. Weinheim. *Verlag Chemie*, **1984**; 416-424.
- Reyes-Gordillo, K., Segovia, J., Shibayama, M., Vergara, P., Moreno, M. G., Muriel, P. Curcumin protects against acute liver damage in the rat by inhibiting NF-kappaB, proinflammatory cytokines production and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2007**; 1770(6): 989–996.
- Richter, K., Konzack, A., Pihlajaniemi, T., Heljasvaara, R., Kietzmann, T. Redox-fibrosis: impact of TGFbeta1 on ROS generators, mediators and functional consequences. *Redox Biology*. **2015**; 6, 344-352.
- Roberts, R. A., Ganey, E. P., Ju, C., Kamendulis, L. M., Rusyn, I., Kaluning, J. E. Role of the kupffer cell in mediating hepatic toxicity and carcinogenesis. *Toxicological sciences*. **2007**; 96 (1): 2-15.
- Rondon, M., García, I., Cornejo, X., Rojas, J., Terán, W. Phytochemical screening and antioxidant activity of seven medicinal plants species from Ecuador. *Pharmacology on line*. **2015**; 3: 19-28.
- Roth, B. L, Baner, K., Westkaemper, R., Siebert, D., Rice, K. C., Steinberg, S., Ernsberger, P., Rothman, R. B. Salvinorin A: a potent naturally occurring nonnitrogenous kappa opioid selective agonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2001**; 99(18): 11934–11939.
- Saito, H., Hayashi, H. Transformation rate between ferritin and hemosiderin assayed by serum ferritin kinetics in patients with normal iron stores and iron overload. *Nagoya Journal of Medical Science*. **2015**; 77(4): 571-583.
- Salatino, A., Faria, S. M., Negri, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **2007**; 18(1):11-33.
- Samoylenko, A., Hossain, J. A., Mennerich, D., Kellokumpu, S., Hiltunen, J. K., Kietzmann, T. Nutritional countermeasures targeting reactive oxygen species in cancer: from mechanisms to biomarkers and clinical evidence. *Antioxidants & Redox Signaling*. **2013**; 19(17), 2157-2196.
- Sánchez-Mendoza, M. E., Reyes-Trejo, B., De la Rosa, L., Rodríguez-Silverio, J., Castillo-Henkel, C., Arrieta J. Polyalthic acid isolated from *Croton reflexifolius* has relaxing effect in Guinea Pig Tracheal Smooth Muscle. *Pharmaceutical Biology*. **2008**; 46(10-11): 800-807.
- Sánchez-Peralta, W. F., Ospina-Giraldo, L. F., Pérez, J. C.C., Murillo-Arango, W., Méndez, A. J. J. Phytochemical screening, free radical scavenging, and anti-inflammatory activity of *Croton leptostachyus* Kunth leaf extracts. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. **2015**; 8 (5): 190-194.
- Sánchez-Rodríguez, M. A., Mendoza-N, V. M. Oxidative stress indexes for diagnosis of health or disease in humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2019**; ID 4125152.
- Santos-López, J. A., Garcimartín, A., Merino, P., López-Oliva, M. E., Bastida, A., Benedí, J., Sánchez-Muniz, F. J. Effects of silicon vs. Hydroxytyrosol-enriched restructured pork on liver oxidation status of aged rats fed high-saturated/high cholesterol diets. *PLOS one*. **2016**; 11(1):e0147469.

- Sanz, N., Díez-Fernández, C., Andrés, D., Cascales, M. Hepatotoxic and aging: endogenous antioxidant systems in hepatocytes from 2-,6-,12-, 18- and 30 month- old rats following a necrogenic dose of thioacetamide. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2002**; 1857: 12-20.
- Sarin, H. Conserved molecular mechanisms underlying the effects of small molecule xenobiotic chemotherapeutics on cells. *Molecular and Clinical Oncology*. **2016**; 4(3): 326-368.
- Sarin, S. K., Choudhury, A. Acute on chronic liver failure: terminology, mechanisms, and management. *Natural Reviews Gastroenterology and Hepatology*. **2016**; 13 (3): 131-149.
- Sathaye, S., Bagul, Y., Gupta, S., Kaur, H., Redkar, R. Hepatoprotective effects of aqueous leaf extract and crude isolates of *Murraya koenigii* against in vitro ethanol-induced hepatotoxicity model. *Experimental and Toxicologic Pathology*. **2011**; 63(6): 587-591.
- Schemitt, E. G., Colares, J. R., Hartmann, R. M., Morgan-Martins, M. I., Marroni, C. A., Tuñón, M. J., Marroni, N. P. Effect of glutamine on oxidative stress and inflammation in a rat model of fulminant hepatic failure. *Nutrición Hospitalaria*. **2016**; 33: 210-219.
- Seeff, B. L., & Fontana, R. J. Drug-induced liver injury. En: J. S. Dooley, Anna, S. F. Lok., A. K. Burroughs, Heathcote, E. J. (Eds). *Sherlock's disease of liver and biliary system*. Twelfth Edition. **2011**; Wiley-Blackwell. United Kingdom.
- Selvakumar, S., Kumar, U. M. Preliminary phytochemical analysis of various extracts of *Croton bonplandianus*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. **2017**; 8(3): 1486-1490.
- SENASICA. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. **1999**; <http://publico.senasica.gob.mx/?doc=743>.
- Senoner, T., Schindler, S., Stättner, S., Öfner, D., Troppmair, J. Associations of oxidative stress and postoperative outcome in liver surgery with an outlook to future potential therapeutic. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2018**; ID 3950818. <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2019/3950818/>
- Sheng, Y., Abreu, I. A., Cabelli, D. E., Maroney, M. J., Miller, A., Teixeira, M., Valentine, J. S. Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. *Chemical Reviews*. **2014**; 114(7): 3854-3918.
- Shon, M. Y., Leeb, J., Choid, J. H., Choi, S. Y., Nam, S. H., Seo, K. I., Lee, S. W., Sung, N. J., Park, S. K. Antioxidant and free radical scavenging activity of methanol extract of *chungkukjang*. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2007**; 20(2): 113-118.
- Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*. **2015**; 4: 180-183.
- Silva, L., Gomes, A. C., Rodilla, J. M. L. Diterpene lactones with labdane, halimane y clerodana frameworks. *Natural Product communications*. **2011**; 6(4): 497-504.
- Silverman, R.B.; Holladay, M.W. Drug Metabolism. En: *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, 3rd ed.; *Academic Press*: San Diego, CA, USA, **2014**; 517.
- Singh, A., Bhat, T. K., Sharma, O. P. Clinical Biochemistry of Hepatotoxicity. *Journal of Clinical Toxicology*. **2011**; 4: 1-19.
- Smedsrod, B., LeCouteur, D., Ikejima, K., Jaeschke, H., Kawada, N., Naito, M., Knolle, P., Nagy, L., Senoo, H., Vidal-Vanaclocha, F., Yamaguchi, N. Hepatic sinusoidal cells in health and disease: update from the 14th International Symposium. *Liver International*. **2009**; 29(4): 490-499.

- Sofowora, A. Medicinal Plants and Traditional Medicinal in Africa. 2nd (Ed.). Sunshine House, Ibadan, Nigeria: *Spectrum Books Ltd.*, Screening Plants for Bioactive Agents. **1993**; 134-156.
- Somit, D., Proyankar, D., Tapas Kumar, C. Quantification and correlation of the bioactive phytochemicals of *Croton bonplandianum* leaves of Sub-Himalayan region of West Bengal. *Asian Journal of pharmaceutical and clinical research*. 2013; 6 (3):142-147.
- Song, B. J., Akbar, M., Abdelmegeed, M. A., Byun, K., Lee, B., Yoon, S. K. Hardwick, J. P. Mitochondrial dysfunction and tissue injury by alcohol, high fat, nonalcoholic substances and pathological conditions through post-translational protein modifications. *Redox Biology*. **2014**; 3: 109-123.
- Sorensen, B. S., Alsner, J., Overgaard, J., Horsman, M. R. Hypoxia induced expression of endogenous markers in vitro is highly influenced by pH. *Radiotherapy & Oncology*. **2007**; 83(3): 362-366.
- Sørensen, K. K., Simon-Santamaria, J-. McCuskey, R. S., Smedsrød, B. Liver sinusoidal endothelial cells. *Comprehensive physiology*, **2015**; 5: 1751-1774.
- Sridhar, N., Surya, B. V, Kiran, V. S., Sasidhar, D., Kanthal, L. K. Comparative anti-inflammatory and antioxidant evaluation of *Jatropha gossypifolia* and *Croton bonplandianum*. *International Journal of Research in Pharmacy and Science*. **2013**; 4(1): 16-27.
- SSA. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. **2002**; <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>
- Staal, G. E. J., Helleman, P. W., De Wael, J., Veeger, C. Purification and properties of an abnormal glutathione reductase from human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1969**; 185(1): 63-69.
- Stalker, M. J., Hayes, M. A. Liver and biliary systems. In: Maxie, M. G. (Ed), Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic animals, fifth ed. *Elsevier*. **2007**. 297-388.
- Starkel, P., Leclercq, I. A. Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology*. **2011**; 25 (2), 319-333.
- Stefano G. B., Kream R. M. Nitric oxide regulation of mitochondrial processes: commonality in medical disorders. *Annals of Transplantation*. **2015**; 20:402-407.
- Suárez, A. I., Compagnone, R. S., Salazar-Bookaman, M. M., Tillet, S., Delle Monache, F., Di Giulio, C., Bruges, G. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* bark aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*. **2003**; 88(1): 11-4.
- Su, L-J., Zhang, J-H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F., Peng, Z-Y. Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis autophagy and ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2019**; ID 5080843
- Sumanth, N. K., Kurpad, N, S., Venkataswamy, L., Chandrappa, M. Liver fibrosis: a compilation on the biomarkers status and their significance during disease progression. *Future Science OA*. **2017**; 4(1): FSO250.
- Sun, Y., Wang, M., Ren, Q., Li, S., Xu, J., Ohuzumi, Y., Xie, C., Jin, D-Q., Guo, Y. Two novel clerodane diterpenes with NGF-potentiating activities from the twigs of *Croton yanhuui*. *Fitoterapia*. **2014**; 95:229-233.
- Sultana, N., Saify, Z. S. Enzymatic biotransformation of terpenes as bioactive agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. **2013**; 28(6), 1113-1128.

- Surendran, S., Eswaran, M. B., Vijayalumar, M., Rao, C. V. *In vitro* and *in vivo* hepatoprotective activity of *Cissampelos pareira* against carbon-tetrachloride induced hepatic damage. *Indian Journal of Experimental Biology*. **2011**; 49(12): 939-945.
- Swaroop, T. V. S. S., Gowda, K. P. S. Hepatotoxicity mechanisms and its biomarkers. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*. **2012**; 1(2): 675-82.
- Taguchi K., Motohashi H., Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution: Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway. *Genes to Cells*. **2011**; 1 (6): 123–140.
- Tala, M. F., Tan, N. H., Ndontsa, B. L., Tane, P. Triterpenoids and phenolic compounds from *Croton macrostachyus*. *Biochemical Systematics and Ecology*. **2013**; 51: 138–141.
- Tang, X., Gao, J., Wang, Y., Fan, Y. M., Xu, L. Z., Zhao, X. N., Xu, Q., Qian, Z. M. Effective protection of *Terminalia catappa* L. Leaves from damage induced by carbon tetrachloride in liver mitochondria. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **2006**; 17(3): 177-182
- Tasci, I., Mas, N., Mas, M. R., Tuncer, M., Comert, B. Ultrastructural changes in hepatocytes after taurine treatment in CCl₄ induced liver injury. *World Journal of Gastroenterology*. **2008**; 14(31): 4897-4902
- Teixeira, S., Mendes, A., Alves, A., Santos, L. Simultaneous distillation–extraction of high volatile compounds from *Cistus ladanifer* L. *Analytica Chimica Acta*. **2007**; 584(2): 439-446.
- Teugwa, M. C., Sonfack, D.C. Fokom, R., Penlap, B. V., Amvam, Z. P. H. Antifungal and antioxidant activity of crude extracts of three medicinal plants from Cameroon pharmacopeia. *Journal of Medicinal Plant Research*. **2013**; 7(21): 1537–1542.
- Thangaraj, P. *In vitro* antheamolytic activity. In: P. Thangaraj (Ed). *In Vitro Antihaemolytic Activity*. Springer. United Kingdom. **2016**; 57.
- Theodorsen, L., Stromme, J. γ -Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilida: the substrate of choice for routine determinations of γ -glutamyl-transferase activity in serum? *Clinica Chimica Acta*. **1976**; 72:205-220.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur M., Kaur, G., Kaur, H. Phytochemical screening and extraction: a review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. **2011**; 1(1): 98-106.
- Tripathy, B., Satyanarayana, S., Abedulla-Khan, K., Raja, J., Shyamalendu, T. Phytochemical screening and evaluation of antibacterial activity of *Croton bonplandianum* leaves. *Journal of Pharmaceutical advanced research*. **2018**; 1(1): 38-42.
- Tsai, C. F., Hsu, Y. W., Chen, W. K., Chang, W. H., Yen, C. C., Ho, Y. C., Lu, F. J. Hepatoprotective effect of electrolyzed reduced water against carbon tetrachloride induced liver damage in mice. *Food and Chemical Toxicology*. **2009**; 47(8): 2031-2036.
- Ukpabi-Ugo, J. C., Ndukwe, P., Iwuoha, A. G. Hepatoprotective effect of methanol extract of *Justifica carnea* leaves on carbon tetrachloride-intoxicated albino rats. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*. **2019**; 8(2):381.
- Vanderlinde, R, E. Measumerent of total lactate dehydrogenase activity. *Annals of Clinical and Laboratory Science*. **1985**; 15(1):13-31.
- Vargas, M. D. Evaluación antimicrobiana in vitro de los extractos de hexano, acetato de etilo, metanol y acuoso de *Croton hypoleucus* y metanol de *Leucophyllum frutescens*. Tesis de maestría en ciencias biomédicas y de la salud. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. **2014**; 18 p.

- Vargas-Mendoza N, Madrigal-Santillán E, Morales-González A, Esquivel-Soto, J., Esquivel-Chirino, C., García-Luna, M., Gayosso, J., Morales-González, J. Hepatoprotective effect of silymarin. *World Journal of Hepatology*. **2014**; 6:144-9, <http://dx.doi.org/10.4254/wjh.v6.i3.144>.
- Velázquez-Jiménez, E., Vargas-Mendoza, D., Gayosso-de-Lucio, J. A., González-Montiel, S., Villagómez-Ibarra, J. R. Three novel epoxy-clerodanes bearing a furan ring from *Croton hypoleucus*. *Phytochemistry letters*. **2018**. 24: 21-26.
- Vernon, H., Kasi, A. Anatomy, abdomen and pelvis, liver. **2019**. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500014/>.
- Vigor C, Fabre N, Fourasté I, Moulis C. Three clerodane diterpenoids from *Croton eluteria* Bennett. *Phytochemistry*. **2001**; 57:1209-12.
- Visentin, M., Lenggenhager, D., Gai, Z., Kullak-Ublick, G. A. Drug-induced bile duct injury. *Molecular basis of disease*. **2017**. 1864 (4): 1498-1506.
- Visweswari, G., Christopher, R., Rajendra, W. Phytochemical screening of active secondary metabolites present in *Withania somnifera* root: role in traditional medicine. *International Journal of Pharmaceutical sciences and research*. **2018**. Disponible en: <http://ijpsr.com/bft-article/phytochemical-screening-of-active-secondary-metabolites-present-in-withania-somnifera-root-role-in-traditional-medicine/?view=fulltext>. Consultado el 1 de octubre de 2019.
- Wallace, M. C., Hamesch, K., Lunova, M., Kim, Y., Weiskirchen, R., Strnad, P., Friedman, S. L. Standard operating procedures in experimental liver research: thioacetamide model in mice and rats. *Laboratory Animals*, **2015**; 49(1):21-29.
- Wan Chao, W.; Lin, B-F. Hepatoprotective diterpenoids isolated from *Andrographis paniculate*. *Chinese Medical Journal*, **2011**; 3(3): 136-143.
- Wang GX. In vivo anthelmintic activity of five alkaloids from *Macleaya microcarpa* (Maxim) Fedde against *Dactylogyrus intermedius* in *Carassius auratus*. *Veterinary Parasitology*, **2010**; 171: 305–313.
- Wang, Y., Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species. *Chemical Research in toxicology*. **2008**; 21, 276-281
- Wang, Y., Liu, M., Yang, H., Ma, C., Jia, P., Jia, D., & Hou, A. Association between increased serum alkaline phosphatase and the coronary slow flow phenomenon. *BMC Cardiovascular Disorders*, **2018**; 18(1).
- Wen-Hui, X., Wei-Yi, L., Qiang, L. Chemical constituents from *Croton* species and their biological activities. *Molecules*, **2018**; 23: 2333.
- Weng, H-L., Cai, X., Yuan, X., Liebe, R., Dooley, S., Li, H., Wang, T-L. Two sides of one coin: massive hepatic necrosis and progenitor cell-mediated regeneration in acute liver failure. *Frontiers in Physiology*. **2015**; 6:178.
- Wilson, S. R., Zucker, P. A., Huang, R-R, C., Spector, A. Development of synthetic compounds with glutathione peroxidase activity. *Journal of The American Chemical Society*. **1989**; 111: 5936–5939.
- Wohlleber, D., Knolle, P. A. The role of liver sinusoidal cells in local hepatic immune surveillance. *Clinical and translational immunology*, **2016**; 5(12): e117.
- Xiong, F., Yong-Song, G. Cautiously using natural medicine to treat liver problems. *World Journal of Gastroenterology*. **2017**; 23 (19): 3388-3395.

- Yang, X., Schnackenberg, L. K., Shi, Q., Salminen, W. F. Hepatic toxicity biomarkers. In: Gupta, R. C. (Ed.). *Biomarkers in Toxicity Academic Press. Elsevier*. **2014**. Pp. 241-260.
- Yassab M, Nedi T, Solomon D, Shibeshi W. Hepatoprotective Effect of *Croton macrostachyus* Hochst. Ex Del Leaves against CCl₄-induced liver damage. *Ethiopian Pharmaceutical Journal*. **2016**; 32(1): 23-36.
- Yeh C. N., Maitra A., Lee K. F., Jan Y.-Y., Chen M.F. Thioacetamide-induced intestinal-type cholangiocarcinoma in rat: An animal model recapitulating the multi-stage progression of human cholangiocarcinoma. *Carcinogenesis*. **2003**; 25:631–636.
- Yin, C., Evanson, K. J., Ashina, K., Stainier, D. Y. R. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration and cancer. *The journal of clinical investigation*, **2013**; 123 (5):1902-1910.
- Yuan, L., Kaplowitz, N. Mechanisms of Drug-induced Liver Injury. *Clinics in Liver Disease*. **2013**; 17 (4): 507–518.
- Zhang, A., Sun, H., Wang, X. Recent advances in natural products from plants for treatment of liver diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2013**; 63:570–577.
- Zhang, Q-W., Lin, L-G., Y, W-C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*. **2018**; 13:20.
- Zhao J, Deng JW, Chen YW, Li SP. Advanced phytochemical analysis of herbal tea in China. *J Journal of Chromatography A*, **2013**; 1313:2-23.
- Zheng-Hong, P., De-Sheng, N., Jin-Lei, L., Bo Pan, L., Dian-Peng, L. A new triterpenoid saponin from the root of *Croton lachnocarpus* benth. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*. **2013**; 28 (1): 48-51.