



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**Evaluación del efecto hepatoprotector del extracto
hexánico de la inflorescencia de *Cirsium vulgare*
(Asteraceae) en un modelo de cirrosis en rata.**

TESIS

Que para obtener el título de:
Licenciada en Biología

Presenta:
Alicia Rodríguez Pastén

Director: Dr. Tomás Eduardo Fernández Martínez

Mineral de la Reforma. 2014



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
Licenciatura en Biología

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR, UAEH

PRESENTE

Por este conducto le comunico que el Jurado asignado a la pasante de Licenciatura en Biología **Alicia Rodríguez Pastén**, quien presenta el trabajo recepcional de tesis intitulado **"Evaluación del efecto hepatoprotector del extracto hexánico de la inflorescencia de *Cirsium vulgare* (Asteraceae) en un modelo de cirrosis en rata"**, después de revisarlo en reunión de sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

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

PRESIDENTE: Quím. Blanca Estela Pérez Escandón

PRIMER VOCAL: M. en C. Othon Straffon Muris

SEGUNDO VOCAL: Dr. Mario Isidoro Ortiz Ramírez

Mario Ortiz Ramirez

TERCER VOCAL: Dr. Tomás Eduardo Fernández Martínez

SECRETARIO: Dr. Miguel Ángel Villavicencio Nieto

Miguel A. Villavicencio

PRIMER SUPLENTE: Dr. Héctor Antonio Ponce Monter

SEGUNDO SUPLENTE: Biól. María del Carmen González Rodríguez

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi más atenta consideración.

ATENTAMENTE
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"
Mineral de la Reforma, Hidalgo a 29 de septiembre de 2014

M. en C. Miguel Angel Cabral Perdomo
Coordinador Adjunto de la Licenciatura en Biología



c.c.p. Archivo



Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería,
Carretera Pachuca - Tulancingo Km. 4.5, Ciudad del Conocimiento,
Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
Tel. +52 771 7172000 exts 2532, Fax 2109
cabralma@uaeh.edu.mx mcabralperdomo@gmail.com



Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Química Medicinal y Farmacología del Centro de investigación en Biología de la Reproducción (CIBIOR), del Área Académica de Medicina del Instituto de Ciencias de la Salud (ICSa), Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la dirección del Dr. T. Eduardo Fernández Martínez. Con apoyo de parte de FOMIX-Hidalgo 2008 con clave de proyecto 2008-C01-97092.

Dedicado a...

*Arnulfo Pastén. Porque no olvido tus palabras -¿Estás jugando a tus experimentos?
¡De grande vas a ser científica!- y tal vez te fuiste sin saberlo pero...tenías razón, es lo
que más me gusta, me encantaría que lo supieras, abuelito. Gracias por quererme y
consentirme siempre, te quiero y no dejo de extrañarte, el futbol no es lo mismo sin ti,
amigo.*

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS.

Al Dr. Eduardo Fernández. Le agradezco sus enseñanzas, su paciencia, su tiempo, sus consejos y en especial su apoyo incondicional en el aspecto académico y personal. También agradezco toda su confianza y el haberme permitido trabajar con usted siempre en un ambiente tan ameno. Es un honor haber trabajado y convivido con usted que es una gran persona y de corazón quiero expresarle todo mi cariño y gratitud.

A la Dra. Mineko Shibayama y al M. en C. Mario Segura por su amable apoyo para realizar la parte histológica de este trabajo. En especial al maestro Mario, gracias por la paciencia que me tuvo durante las clases de biología celular y por toda su gentileza.

Al Dr. Luis Soria. Gracias por siempre mantener un ambiente tan ameno y cordial durante mi estancia en el laboratorio.

A mis sinodales. Química Blanca Estela Pérez, M. en C. María del Carmen González, Dr. Miguel Ángel Villavicencio, Dr. Héctor Ponce, Dr. Mario Ortiz, y M. en C. Othón Traffon. Agradezco a todos su tiempo, su apoyo y comentarios para mejorar este trabajo y en especial quiero agradecer su amabilidad y todas sus atenciones.

AGRADECIMIENTOS.

Al Sr. Muffin porque siempre me acompañas y me haces muy feliz todos los días, te amo! :3

Alejandro y Camila, porque los dos han alegrado mi vida. Ustedes me motivan a mejorar porque trato de ser un buen ejemplo para ustedes. Los amo con todo mi corazón y me hace muy feliz tenerlos cerca y verlos crecer.

A mi madre, Betty Pastén. Todo lo que he hecho en la vida te lo debo a ti, gracias por enseñarme el camino y apoyarme incondicionalmente; por tu amor, paciencia y confianza, por cuidarme tanto, estar siempre pendiente y hacer lo posible para que yo tenga lo mejor. Gracias por todo lo que me has dado y enseñado. Te amo mamá y soy muy afortunada por tenerte, sin ti no lo habría logrado.

A mi padre, Pedro Rodríguez Venegas. Gracias por todo lo que haces por mí, por estar siempre cerca para preguntar si necesito algo y hacer lo posible por complacerme; por la paciencia que me tienes y el amor que me has dado; gracias por cuidarme tanto y estar siempre pendiente de mí. Te amo papá y sin tu apoyo no lo habría logrado.

A mi abuela Ceci. Gracias, abue por consentirme con esos detalles y pláticas que me alegran el día. Te quiero mucho y me hace muy feliz tenerte cerca.

A mi hermana, Diana Rodríguez. Gracias por todo lo que haces por mí, por darme tu apoyo incondicional en todos los aspectos, por cuidarme, impulsarme, regañarme cuando hace falta y sobre todo por enseñarme tantas cosas de la vida; por aguantar mis malos ratos y consentirme cuando estoy de visita (lo disfruto realmente), por ser mi hermana, mi amiga y hasta mi cómplice y estar para mí sin importar el día ni la hora. Gracias por ser un ejemplo tan maravilloso que me motiva todos los días y por incluirme en tu vida, me haces muy feliz. Te amo con todo mi corazón.

A mi cuñado, Carlos Aguilar. Cuñado, muchas gracias por todo tu apoyo, por la paciencia que me tuviste con las clases de matemáticas (me quitaste lo burrero), por platicar conmigo, escuchar todas mis historias, aconsejarme y motivarme a echarle ganas a lo que hago. Gracias por consentirme cuando estoy con ustedes, por hacerme reír tanto y por tu cariño y comprensión. Te quiero mucho, cuñado.

A mi familia en general. Gracias a todos mis tíos y primos por su apoyo incondicional y por todo su cariño. A mis tíos Gerardo y Alicia, y en especial gracias a mi abuelita por haber sido otra madre para mí, por tanto amor y cuidado. Los llevo en mi corazón sin olvidar cada cosa que aprendí de ustedes.

A mis amigos...

Karen. Wera, no tengo como pagarte todo lo que haces por mí, desde escucharme y aguantar mis malos ratos, hasta consecuentar mis barbaridades. Gracias por ayudarme en TODO, por cuidarme, consentirme, preocuparte por mí y desvelarte conmigo haciendo tareas, estudiando, haciendo correcciones de la tesis, platicando o simplemente acompañándome mientras hago cualquier cosa. Gracias por nunca dejarme sola.

Araceli. Wera, mil gracias por tu todo tu apoyo, por esas desveladas para estudiar o hacer tareas, por explicarme siempre con paciencia lo que no entendía porque recuerda que nunca tengo nada, nunca hago nada, nunca sé nada... por tantas risas, por ser esa amiga tan maravillosa que siempre ha estado ahí para cualquier situación y por compartir tantos buenos y malos ratos conmigo. Son las mejores y me siento muy afortunada de tenerlas, no es fácil encontrar personas tan buenas y especiales como ustedes y sobre todo con quien disfrutar las vacaciones como solo nosotras sabemos hacerlo jajaja... sin ustedes estaría perdida. Las amo weras!

César. Amigower, que te puedo decir, gracias por recibir mis llamadas a media noche llorando porque no me quedaba la tarea y consolarme, por cuidarme esas veces que hizo falta, por aguantarme, por tu confianza, por tantas horas de

diversión (dentro y fuera de la uni), por ayudarme siempre que pudiste y por ser el mejor de los amigowers. Te quierooo!

Pedro. Gracias por ser mi traductor cuando no entendía los artículos en inglés y por acompañarme al laboratorio algunas veces aun cuando no te gustan las ratas, gracias por todo, todo tu cariño y paciencia, por hacerme reír hasta que me duela el estómago y por tu apoyo en general. Te quierooo!

Gracias a ustedes 4, la universidad fue la mejor etapa de mi vida.

Gracias en especial a ti Marianiguis, por todo lo que me enseñaste en el laboratorio, por la paciencia que me tuviste, por estar ahí apoyándome con este trabajo que sin tu ayuda no sé qué habría hecho. Gracias por escucharme tantas veces, por tu confianza, por alegrarme tantas horas en el laboratorio con historias divertidas (también las del negocio jajaja), por hacerme reír tanto y también por apoyarme en momentos difíciles, pero sobre todo gracias por permitirme ser tu amiga y compartir tantas cosas conmigo. Te quiero muchísimo, Mariana y sin ti no habría sido lo mismo esta etapa, tu apoyo fue fundamental.

Cynthia. Gracias por todo tu apoyo en el aspecto académico y personal, por alegrar este tiempo en el laboratorio, por tu amistad y tu confianza, por preocuparte por mí y acompañarme siempre, encontré una gran amiga y me siento muy afortunada. Ah, y muchas gracias por ser mi colega en el negocio jeje. Te quiero mucho!!

Pablo. Gracias por tantos años tan bonitos, por todo el tiempo que compartiste conmigo en el que siempre tuve tu apoyo en cuestiones personales y escolares, sobre todo tu apoyo al inicio de este trabajo, fuiste una parte fundamental en esta etapa de mi vida.

Emmanuel. Gracias por ofrecer siempre tu apoyo, por el tiempo compartido, por alegrarme todos los días con tus mensajes y por esas visitas al laboratorio que aprecio tanto en verdad y, especialmente la primera que me hizo tan feliz.

ÍNDICE.

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Hígado humano.....	3
1.2 Morfología externa del hígado.....	4
1.3 Morfología interna del hígado.....	5
1.4 Funciones hepáticas.....	10
1.5 Vesícula biliar y bilis.....	10
1.6 Enfermedades hepáticas.....	11
1.7 Modelos experimentales de daño hepático.....	17
1.8 Daño inducido por tetracloruro de carbono (CCl ₄).....	18
1.9 Marcadores de daño hepático.....	19
1.10 Herbolaria y fitofármacos.....	21
2. ANTECEDENTES.....	25
2.1 Género <i>Cirsium</i> y sus efectos biológicos.....	25
2.2 Propiedades hepatoprotectoras del género <i>Cirsium</i>	27
2.3 <i>Cirsium vulgare</i> y sus propiedades biológicas.....	28
2.3.1 Características de la planta.....	28
2.3.2 Propiedades biológicas de la planta.....	30
3. JUSTIFICACIÓN.....	32
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	33
5. HIPÓTESIS.....	33
6. OBJETIVOS.....	33
6.1 Objetivo general.....	33
6.2 Objetivos particulares.....	33
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
7.1 Obtención del extracto hexánico de <i>C. vulgare</i>	34
7.2 Evaluación farmacológica.....	34
7.3 Tinciones histológicas.....	38
7.4 Análisis estadístico.....	39

8. RESULTADOS.....	40
8.1 Marcadores bioquímicos.....	40
8.2 Análisis histológico.....	49
9. DISCUSIÓN.....	51
10. CONCLUSIONES.....	58
11. PERSPECTIVAS.....	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ANEXOS.....	66
ANEXO 1. GLOSARIO.....	66
ANEXO 2. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Localización anatómica del hígado humano.....	4
Figura 2. Lóbulos hepáticos.....	5
Figura 3. Anatomía interna del hígado.....	6
Figura 4. Lobulillo hepático clásico y triada portal.....	7
Figura 5. Lobulillo hepático clásico y lobulillo hepático de Rappaport.....	7
Figura 6. Esquema de hepatocito.....	8
Figura 7. Células del sinusoides hepático.....	9
Figura 8. <i>Cirsium vulgare</i>	29
Figura 9. Fosfatasa alcalina.....	40
Figura 10. Gamma glutamil-transpeptidasa.....	41
Figura 11. Bilirrubinas totales.....	42
Figura 12. Alanina-aminotransferasa.....	43
Figura 13. Lipoperoxidación.....	44
Figura 14. Catalasa.....	45
Figura 15. Glucógeno.....	46
Figura 16. Colágena.....	47
Figura 17. Panel de resultados histológicos.....	50

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Listado de plantas utilizadas en el tratamiento de hepatopatías.....	22
Tabla 2. Tratamiento administrado a cada grupo.....	36
Tabla 3. Resumen de marcadores bioquímicos.....	48

RESUMEN.

La cirrosis es el estadio final de un daño persistente en el hígado, por ejemplo enfermedades como hepatitis o enfermedad hepática por alcohol (EHA); involucra daños como necrosis, colestasis y desarrollo de fibrosis. Es una de las causas principales de muerte en México y en otros países del mundo; uno de sus vectores es el consumo prolongado de alcohol, sin embargo existen otros como virus, la obstrucción de conductos biliares o el uso constante de algunos fármacos que son metabolizados en el hígado. Además, existen pocas alternativas farmacológicas para su tratamiento y de las que hay muchas son paliativas o costosas. Debido a la gravedad del problema es necesario buscar opciones diferentes para el tratamiento de padecimientos hepáticos, o bien, para proteger al hígado contra algunos daños; así, durante varios años se ha recurrido al uso de fitofármacos como tratamiento en padecimientos hepáticos diversos. Muchas especies del género *Cirsium* han sido utilizadas en varios países por sus efectos antiinflamatorios, antihemorrágicos, ansiolíticos, diuréticos y astringentes entre otros. La especie *C. vulgare* (Asteraceae), ha sido utilizada principalmente por sus efectos antiinflamatorios, ansiolíticos y antihemorrágicos; además, se han realizado investigaciones que demuestran un efecto anticancerígeno y antioxidante. En la investigación presente se evaluó el efecto hepatoprotector del extracto hexánico de la inflorescencia de *C. vulgare* en un modelo crónico preventivo de cirrosis inducida por tetracloruro de carbono (CCl₄) en rata. Se analizaron cuatro grupos de ratas Wistar macho: control de controles (VEX+VTC); control de extracto (EX+VTC); control de daño (VEX+TC) y grupo reto (EX+TC). Fueron administrados de acuerdo a un tratamiento ya establecido de CCl₄ con una dosis de 400 mg/kg i.p., 3 veces/semana y de extracto 300 mg/kg p.o., diariamente. El tratamiento duró 8 semanas para cada grupo y al finalizar se llevó a cabo la determinación de marcadores de daño hepático; utilizando muestras de plasma se cuantificó la actividad enzimática de fosfatasa alcalina, gamma glutamil-transpeptidasa y alanina-aminotransferasa, además del nivel de bilirrubinas totales. En el tejido hepático se midió el grado de peroxidación lipídica, el nivel de glucógeno, la cantidad de colágena y la actividad enzimática de catalasa, además de un análisis histológico. Los resultados fueron evaluados estadísticamente, mostrando

significativamente la inhibición del daño hepático causado por el CCl_4 donde el extracto mostró efectos anticolestáticos, antinecróticos y antifibrogénicos; asimismo, mostró actividad antioxidante. Los efectos observados en este estudio pueden ser atribuidos a la presencia de diferentes compuestos como flavonoides, agliconas y terpenoides con capacidad atrapadora de radicales libres en la planta.

1. INTRODUCCIÓN.

El hígado es en general, el órgano más importante del organismo debido a las funciones bioquímicas tan numerosas que lleva a cabo, por ello es vital mantener la integridad morfológica y funcional de este órgano. Sin embargo, factores diversos (por ejemplo químicos, el uso constante de algunos fármacos o biológicos como los virus causantes de hepatitis) causan tipos diversos de daño y enfermedades que afectan la anatomía y en consecuencia la funcionalidad del órgano (Kuntz y Kuntz, 2006). Así entonces, resulta importante conocer su anatomía y morfología para comprender los sitios del daño y características patofisiológicas que condicionan sus mecanismos o modifican la arquitectura hepática causando disfunción. Además, se requiere tal información para el entendimiento de los mecanismos hepatoprotectores de fármacos útiles en su tratamiento terapéutico.

1.1 Hígado humano.

El hígado es el órgano más voluminoso del cuerpo y representa el 2% del peso corporal total (Guyton y Hall, 2009), pesa en promedio 1.5 kg en un individuo adulto. Está situado 3/4 partes en la parte superior derecha de la cavidad abdominal y 1/4 parte en la parte superior izquierda, en contacto con el diafragma (Figura 1). Su cara ventral se oculta fundamentalmente por el tórax. Más del 50% de la superficie hepática está revestida por peritoneo abdominal (Lippert, 1999).

Lo conforman diferentes tipos celulares, el 70-80% de las células del hígado son “hepatocitos” que son células parenquimatosas poliédricas grandes. La mayoría de hepatocitos presentan más de un núcleo, de tamaño variable debido a la aparición de poliploidia, también está conformado por células de Kupffer y células estelares (de Ito) además de células Natural Killers (NK) o células de Pit (Geneser, 2008).

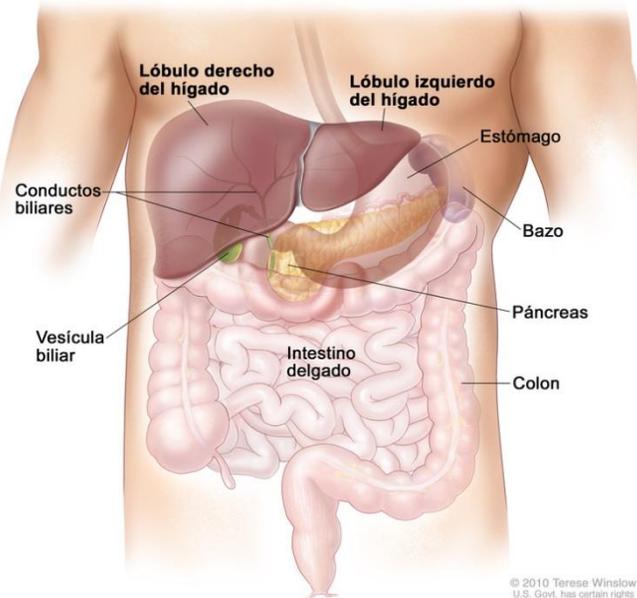


Figura 1. Localización anatómica del hígado humano.

1.2 Morfología externa del hígado.

La forma del hígado depende fundamentalmente de los órganos vecinos, en él se distinguen dos caras principales, separadas por delante por un borde en ángulo (borde inferior); atrás se continúan entre sí sin límite alguno (Lippert, 1999).

Cara diafragmática: Convexa que se adapta a la concavidad de la cúpula derecha del diafragma.

Cara visceral: Plana, en relación con estómago e intestino. Se descompone en cuatro lóbulos (Figura 2). El hígado está dividido por la vesícula biliar y la vena cava inferior en: lóbulo hepático derecho que es un lóbulo único y grande y el lóbulo hepático izquierdo que es pequeño e incluye los lóbulos cuadrado (visible en la parte superior de la cara visceral) y caudado (visible en la parte inferior de la cara visceral) (Drake *et al.*, 2007).

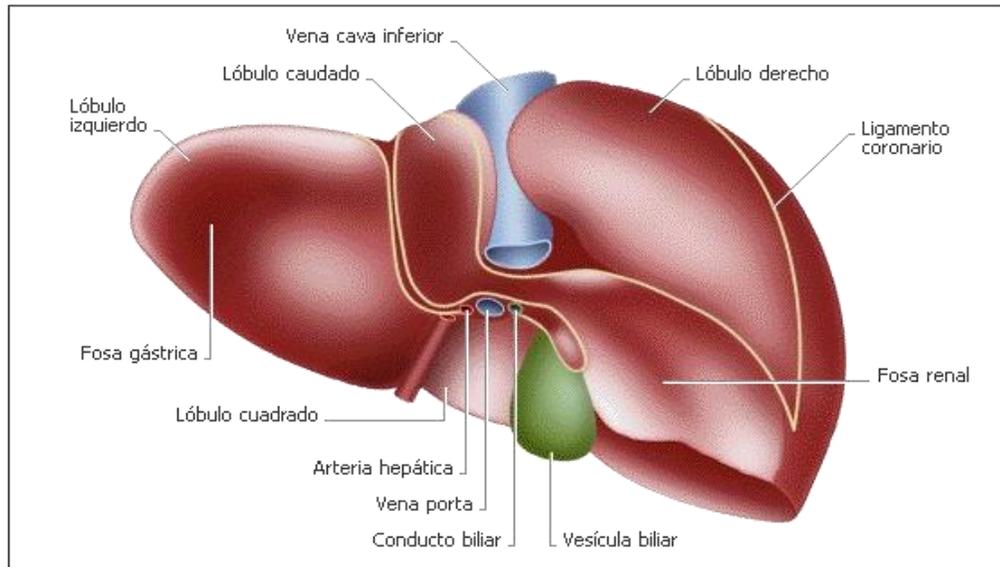


Figura 2. Lóbulos hepáticos: mayor o derecho, menor o izquierdo, caudado y cuadrado.

1.3 Morfología interna del hígado.

Vasos sanguíneos.

Vasos sanguíneos intrahepáticos: Dos sistemas vasculares atraviesan el hígado, el sistema de vasos aferentes o la doble arborización de la vena porta y la arteria hepática (Figura 4). Ambas se dividen en rama derecha y rama izquierda que se dividen a su vez en vasos segmentarios para terminar como venas y arterias interlobulillares (Figura 3). Se acompañan de las vías biliares intrahepáticas, formando en conjunto el trío hepático o triada portal (Figura 4). Atraviesa también el sistema de vasos eferentes o árbol de las venas suprahepáticas, éstas se dividen en: derechas, izquierdas y medias, los tres grupos desembocan en la vena cava (Lippert, 1999).

Sinusoides hepáticos: Los capilares hepáticos se distinguen del resto de los capilares sanguíneos debido a que circula sangre de una vena a otra, falta la membrana basal y el calibre llega hasta 15 μ m y así se les denomina "sinusoide" (Figura 4) (Lippert, 1999).

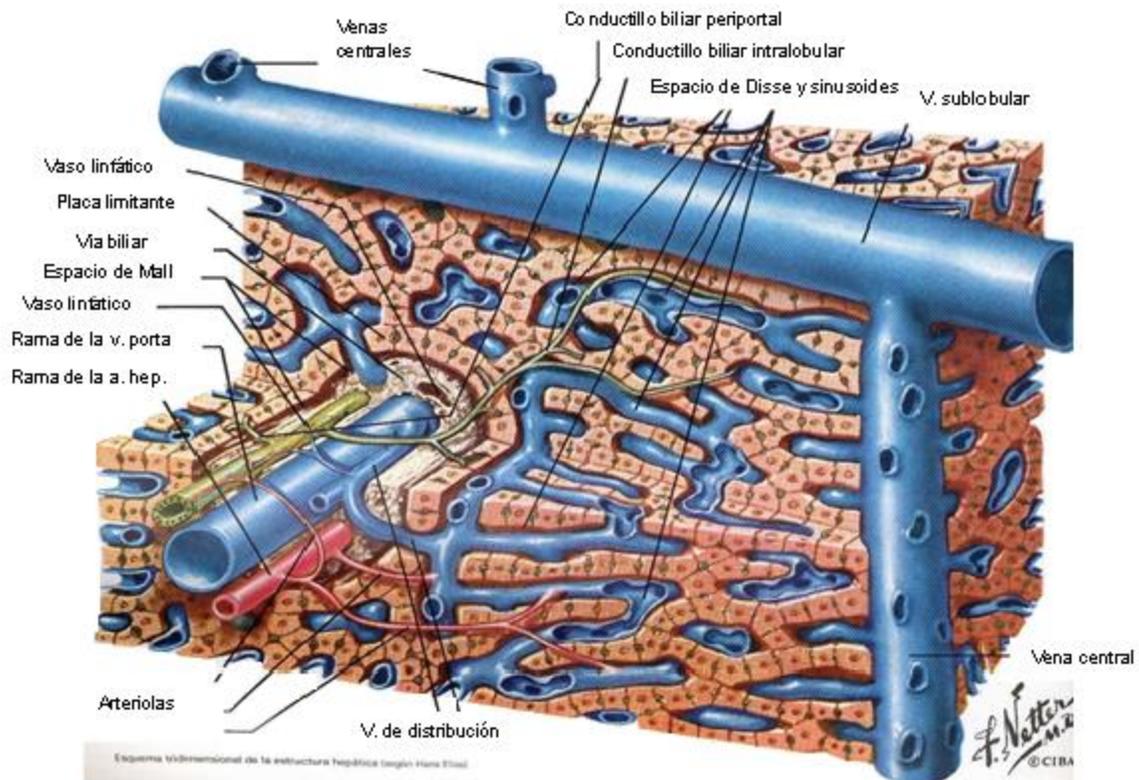


Figura 3. Anatomía interna del hígado.

Lobulillos hepáticos.

Representan la unidad funcional más pequeña, tienen un diámetro de 1-1.5 mm y una altura de 1.5-2 mm, aproximadamente. Con un volumen total del hígado de 1.5 L y un volumen lobulillar de 2-3 mm³ (μL) puede calcularse un total de medio millón de lobulillos hepáticos en un hígado. Podemos distinguir dos tipos: el primero es lobulillo hepático con vena centrolobulillar (clásico) (Figura 4), en el cual, el vaso sanguíneo eferente se sitúa en el centro. Los vasos sanguíneos aferentes, así como los conductillos biliares, rodean la periferia del lobulillo (interlobulillares). Los ángulos del lobulillo (forma hexagonal), son marcados por la vena y la arteria interlobulillar y el conducto bilífero interlobulillar (Lippert, 1999).

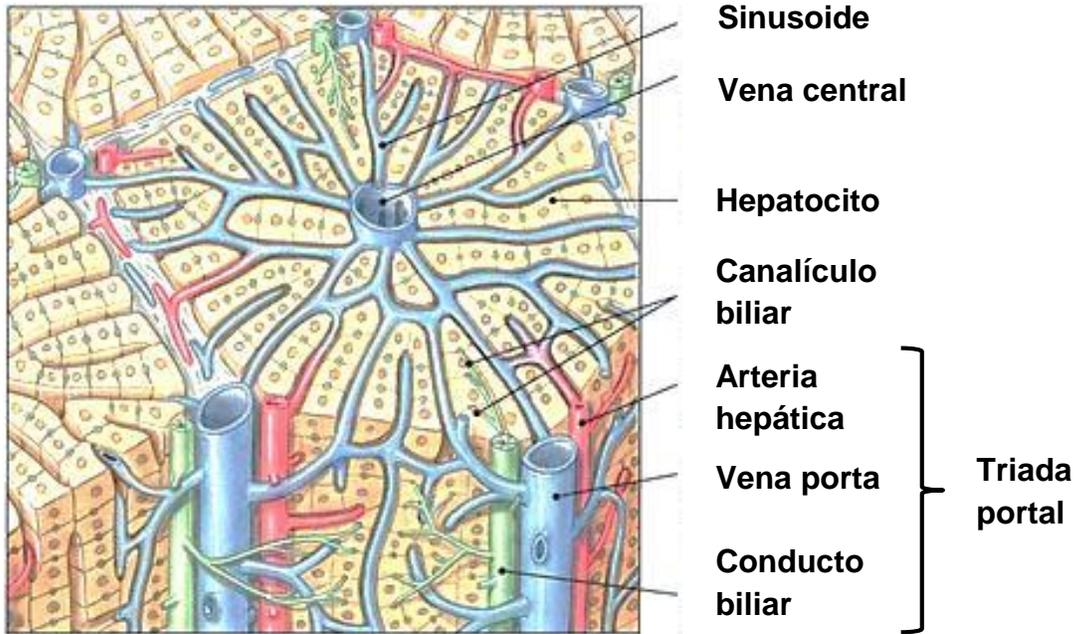


Figura 4. Lobulillo hepático clásico; elementos de una triada portal o triángulo de Glisson.

El segundo tipo es el lobulillo hepático de “Rappaport” que se divide en tres zonas; se encuentra una zona 1 (externa) entre dos venas portales. A cada lado siguen una zona 2 (intermedia) y una zona 3 (interna). Los ángulos de este lobulillo romboidal son dos canales portales y dos venas centrales. En la Figura 5 se observan los dos tipos de lobulillo (Lippert, 1999).

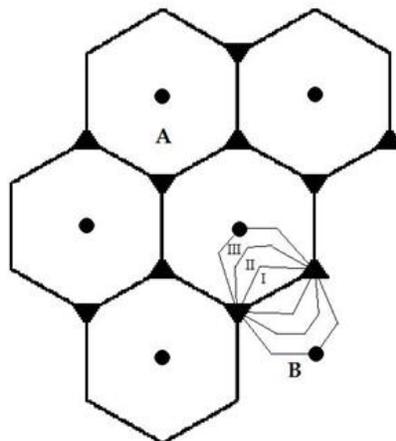


Figura 5. A. Lobulillo hepático clásico. B. Lobulillo hepático de Rappaport.

Los elementos estructurales del lobulillo hepático son:

Hepatocitos: Miden 20-30 μm de diámetro, son ricos en mitocondrias, retículo endoplásmico granuloso y liso, aparato de Golgi y lisosomas; el tamaño de los núcleos es variable, más de la mitad es poliploide y la cuarta parte de las células tiene dos núcleos. Éstas se agrupan en forma de trabéculas y láminas monoestratificadas rodeadas por los sinusoides. De esta manera, cada hepatocito contacta por dos lados directamente con la corriente sanguínea. Los capilares biliares, se encuentran dentro de la trabécula en el límite de dos células. Las paredes celulares están unidas por complejos de unión para evitar el paso de bilis a las hendiduras que quedan entre las membranas celulares (Lippert, 1999; Geneser, 2008). La Figura 6 representa un hepatocito y todas sus estructuras.

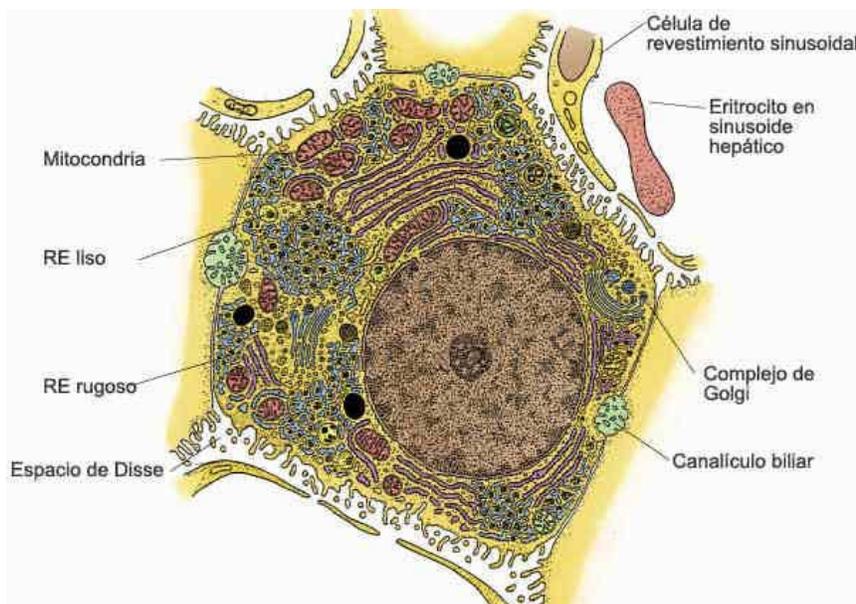


Figura 6. Esquema de hepatocito.

Endotelio: Las paredes de los sinusoides están revestidas por células endoteliales fenestradas (pobres en orgánulos) y por células Kupffer (fagocitarias) (Figura 7), su citoplasma líquido puede envolver partículas sólidas y canalizarlas hacia el interior de la célula; proceden de la médula ósea y pertenecen al sistema de macrófagos que se encarga de liberar la sangre de partículas extrañas (Lippert, 1999).

Espacio perisinusoidal (Espacio de Disse). Las células endoteliales están separadas de los hepatocitos por una hendidura de 0.5-2 μm de ancho. Las células endoteliales son alargadas y aplanadas (Figura 7). En la pared de los espacios Disse, se encuentran las células de Ito o células estelares (HSC) (Figura 7), que almacenan vitamina A. En el curso de hepatopatías crónicas sufren una activación celular caracterizada por la adquisición de funciones típicas de miofibroblastos, como la secreción de citocinas proinflamatorias y de matriz extracelular, que tiene un papel importante en el proceso de cicatrización (fibrosis) (Lippert, 1999; Méndez-Sánchez y Uribe, 2003).

Los linfocitos NK (Figura 7), intervienen en la destrucción de células tumorales y de hepatocitos infectados por virus. Se localizan en el espacio de Disse (Méndez-Sánchez y Uribe, 2003).

Tejido conjuntivo: Un retículo de mallas finas que sirve de sostén a las láminas de hepatocitos y los sinusoides. Ancla en el tejido conjuntivo de los conductos portales, que es escaso en el humano. Está relacionado con la densa cápsula fibrosa del hígado (cápsula de Glisson) (Lippert, 1999).

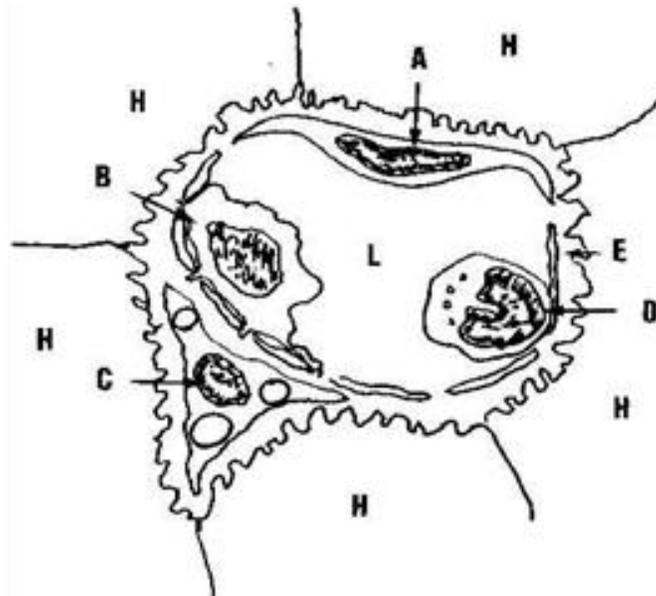


Figura 7. Células del sinusoides hepático. A. Célula endotelial; B. Célula Kupffer; C. Célula de Ito o estelar; D. Natural Killer; H. Hepatocito; E. Espacio Disse; L. Luz del sinusoides.

1.4 Funciones hepáticas.

El hígado es el laboratorio central del cuerpo. Sus funciones, principalmente son: Metabolismo de las proteínas (esto hace referencia a la síntesis de las proteínas plasmáticas, con excepción de las gammaglobulinas, que se sintetizan por las células plasmáticas, y de enzimas derivadas de los aminoácidos), catabolismo de proteínas con formación de urea; producción de albúmina, proteínas plasmáticas de transporte y de factores de coagulación. Metabolismo de carbohidratos como síntesis, depósito y catabolismo de glucógeno, neosíntesis de glucosa a partir de ácido láctico y de productos procedentes del catabolismo proteico. Metabolismo de lípidos, síntesis y catabolismo de ácidos grasos, fosfolípidos, colesterol y excreción de colesterol en la bilis (Fox, 2008; Guyton y Hall, 2009). Inactivación y desintoxicación de hormonas y sustancias extrañas por hidroxilación, oxidación, reducción, conjugación, etc. y lleva a cabo la síntesis de sales biliares y conjugación de pigmentos biliares (bilirrubina) (Lippert, 1999; Fox, 2008).

1.5 Vesícula biliar y bilis.

La vesícula biliar es un saco con forma de pera situado en la cara visceral del lóbulo hepático derecho en una fosa entre el lóbulo derecho y el cuadrado, recibe la bilis del hígado, la concentra y almacena, la capacidad máxima de la vesícula es de 40-100 mL (Drake *et al.*, 2007). La bilis formada en el hígado, fluye hacia el duodeno a través del conducto hepático y del colédoco. (Lippert, 1999).

Los pigmentos biliares (principalmente la bilirrubina), que son productos procedentes del catabolismo de las hemoglobinas son responsables del color parduzco de las heces; en caso de la oclusión de las vías biliares las heces toman un color blanquecino barroso (Lippert, 1999). La bilirrubina libre no es muy hidrosoluble y, por lo tanto, en su mayor parte circula por la sangre unida a la albúmina, este tipo de bilirrubina no puede filtrarse por los riñones a la orina ni el hígado la puede excretar directamente a la bilis; el hígado puede captar esta bilirrubina y conjugarla con ácido glucurónico, esta bilirrubina conjugada es hidrosoluble y puede segregarse a la bilis y una vez conjugada, la bilis,

penetra en el intestino donde, por acción bacteriana es convertida en urobilinógeno y los derivados de éste confieren el color marrón a las heces (Fox, 2008).

1.6 Enfermedades hepáticas.

El hígado se ve afectado por varios factores químicos y biológicos, los cuales causan dos tipos de daño principales, éstos pueden ser: a) colestasis, que consiste en el estancamiento y regurgitación de bilis, esto dificulta su desecho del organismo, y b) la necrosis, que es la muerte celular a causa, por ejemplo, de estrés oxidativo celular. Los diferentes tipos de daño pueden conducir a enfermedades hepáticas como pueden ser, hepatitis, fibrosis o cirrosis. En la cirrosis el daño es gradual y persistente; por lo tanto, el hígado que sufre de hepatitis crónica desarrollará fibrosis y como última etapa llega a la cirrosis, lo que conlleva un estrés oxidativo (Kuntz y Kuntz, 2006).

Colestasis e ictericia.

La colestasis se define como la retención sistémica no solo de bilirrubina sino también de otros solutos que se eliminan en la bilis (sales biliares y colesterol). Los componentes de la bilis entran a sangre (Robbins *et al.*, 1995). También se define como una disminución en la secreción de bilis, así como la reducción en la proporción de agua juntas, incluyendo el respectivo efecto en las sustancias disueltas en ella (Kuntz y Kuntz, 2006).

El alcohol es la causa más frecuente de colestasis, sin embargo, también algunos fármacos pueden ser causantes aunque es difícil identificar con precisión dichos fármacos. Algunos remedios homeopáticos como es el caso de *Chelidonium majus* también pueden desencadenar colestasis, así como el consumo simultáneo de otros irritantes hepatocelulares. Algunos fármacos causan colestasis *per se* o al combinarse con otros y esta enfermedad puede reaparecer gradualmente después de dejar de consumir el fármaco que la provoca. Existen tipos diferentes de colestasis, tales como, colestasis extrahepática obstructiva, en ella, el flujo de bilis se interrumpe en su paso de la vena porta al duodeno como resultado de la obstrucción intraluminal, la destrucción de las paredes de los conductos biliares o la compresión de los conductos biliares

extrahepáticos eferentes. Esta forma de colestasis puede ser de aparición repentina o de progreso lento, puede ser transitoria o persistente; otro tipo es la colestasis intrahepática obstructiva que se deriva de una obstrucción temporal o permanente de los conductos biliares intrahepáticos; finalmente la colestasis intrahepática que no es obstructiva, la causa principal es la perturbación del metabolismo y transporte de ácidos biliares (Kuntz y Kuntz, 2006).

El síntoma principal de la colestasis es el aumento de ácidos biliares en suero, además de un incremento de enzimas indicadoras de colestasis (Kuntz y Kuntz, 2006). Histológicamente podría incluso observarse bilirrubina en hepatocitos y en los canalículos la zona centrolobulillar. No se observa necrosis o ésta es muy leve, en casos de colestasis de corta evolución; sin embargo, en la obstrucción prolongada de las vías biliares, el estancamiento de bilis, se presenta en todo el lobulillo y la necrosis es mayor, lo que ocasiona una reacción inflamatoria y fagocitosis de bilis y restos celulares por las células Kupffer, en las fases más avanzadas aparecen los cuerpos de Mallory y cobre en los hepatocitos periportales. Finalmente se desarrolla fibrosis y cirrosis (Pérez-Tamayo y López-Corella, 2007).

Cuando la retención de bilis eleva la concentración sérica de bilirrubinas por arriba de 2.0 mg/100 mL se presenta ictericia, la concentración normal en el adulto es menor de 1.2 mg/ 100 mL (Robbins *et al.*, 1995). La ictericia, es la pigmentación amarillenta de la piel y los tejidos profundos provocada por la acumulación anormal de bilirrubina en sangre. Las cuatro causas principales de la ictericia son excesiva destrucción de glóbulos rojos, alteración de la receptación de bilirrubina en células hepáticas, disminución de la conjugación de bilirrubina y obstrucción del flujo biliar en los canalículos de los lobulillos hepáticos, o en los conductos biliares intrahepáticos o extrahepáticos (Porth, 2007).

En la ictericia obstructiva, el proceso de formación de bilirrubina es normal pero la que se forma no puede pasar desde la sangre al intestino. No obstante, la bilirrubina libre suele alcanzar las células hepáticas donde se conjuga normalmente y regresa a la sangre probablemente debido a la ruptura de canalículos biliares congestionados y la

bilis se vierte directamente a la linfa que sale del hígado. Por lo tanto, en este caso la mayor cantidad de bilirrubina en plasma es conjugada (Guyton y Hall, 2009).

Hepatitis.

Algunos virus afectan particularmente al hígado y se designan como virus hepatotropos. El término hepatitis viral se emplea para las infecciones ocasionadas por dichos virus que pueden ser de diferentes tipos:

Hepatitis por virus tipo A: Se adquiere por contaminación fecal del agua y los alimentos; el virus se replica en los hepatocitos, se libera en bilis y se elimina por las heces. Virus tipo B: La transmisión se lleva a cabo por medio de transfusiones de sangre o sus derivados así como agujas o instrumentos contaminados, por contacto sexual y en forma vertical (de madres a hijos durante el periodo perinatal); el virus se replica en los hepatocitos y se encuentra en la sangre, saliva, lágrimas, semen, líquido de ascitis y secreción vaginal. Virus tipo C: Es transmitida por transfusión sanguínea o agujas contaminadas; es la causa más común de hepatitis crónica. La cirrosis hepática se puede presentar 25 años después de la infección y el carcinoma hepatocelular cinco o diez años más tarde. Virus tipo D: La presencia de este virus se asocia a lesión hepática, la infección solo ocurre en presencia del virus B y ocasiona hepatitis fulminante, aguda o crónica que rápidamente evoluciona a la cirrosis. Los factores de riesgo son semejantes en la hepatitis B y D; y el virus tipo E, es semejante al tipo A (Pérez-Tamayo y López-Corella, 2007).

La hepatitis se clasifica también clínicamente en aguda, fulminante y crónica. La hepatitis aguda se manifiesta por insuficiencia hepática leve o moderada de menos de seis meses. Histológicamente se observa la arquitectura hepática conservada, con lesión uniforme en cada uno de los lobulillos; las alteraciones constantes son la degeneración y la necrosis hepatocelular focal (degeneración balonzante o vacuolar). La hepatitis fulminante se caracteriza por insuficiencia hepática aguda, habitualmente en personas con hígado previamente normal, a la que se le agrega encefalopatía. La hepatitis crónica es un padecimiento secundario a varias causas, caracterizado por insuficiencia hepática, con necrosis, fibrosis e inflamación (Pérez-Tamayo y López-Corella, 2007).

Fibrosis.

La consecuencia de numerosas enfermedades hepáticas es la aparición de un infiltrado inflamatorio en el parénquima hepático. Cuando dicha inflamación se torna crónica, se relaciona con el depósito de colágena y otras proteínas de la matriz extracelular, un proceso que se denomina fibrosis hepática. Con el tiempo, la fibrosis altera de manera progresiva la arquitectura hepática normal y da lugar a la cirrosis hepática. Así la fibrosis es un paso previo y necesario para el establecimiento de la cirrosis. En este proceso complejo de reparación tisular intervienen de manera activa distintos tipos celulares y citocinas profibrogénicas; durante un daño persistente la capacidad de regeneración hepática disminuye mientras que aumenta considerablemente la producción de matriz extracelular, que se deposita de manera desorganizada en el lobulillo hepático (Méndez-Sánchez y Uribe, 2003). Al aparecer la fibrosis alrededor del hígado se ve afectada la actividad vascular (Muriel, 1998; Pérez-Tamayo y López-Corella, 2007).

La distribución del material fibroso depende del tipo de hepatopatía; en hepatitis viral, la fibrosis se localiza en zona periportal, mientras que por ejemplo, en hepatopatía alcohólica aparece en zona pericentral; en fases avanzadas, las bandas de colágena son muy evidentes y unen varios espacios porta que se denominan puentes de fibrosis. Esta alteración precede a la formación de nódulos de regeneración y, por tanto, al desarrollo de fibrosis. Las HSC migran y proliferan en los focos de necrosis donde depositan matriz extracelular. Los mecanismos moleculares que se encargan de la activación de las HSC incluyen proteínas de membrana y vías de señalización intracelular diversas, así como el estrés oxidativo debido a la formación de radicales libres (Méndez-Sánchez y Uribe, 2003).

Cirrosis.

La cirrosis, se define como una lesión difusa caracterizada por fibrosis, necrosis y pérdida de la arquitectura y funcionalidad del órgano. Corresponde a la fase final de numerosas hepatopatías y representa un ejemplo de cicatrización y regeneración anormales (Pérez-Tamayo y López-Corella, 2007).

La cirrosis representa el estadio final de una hepatopatía crónica en la cual gran parte del tejido hepático funcional ha sido reemplazado por tejido fibroso. Se caracteriza por una fibrosis difusa y por la conversión de la arquitectura hepática normal en nódulos de estructura anormal. El tejido fibroso reemplaza al tejido normal del hígado y forma bandas constrictoras que interrumpen el flujo en los canales vasculares y las vías biliares hepáticas. La interrupción de los canales vasculares predispone a la hipertensión portal y sus complicaciones, a la obstrucción de los canales biliares y la exposición a los efectos destructivos de la estasis biliar y a una pérdida de células hepáticas que lleva a la insuficiencia hepática. Habitualmente, la cirrosis se asocia con el alcoholismo, sin embargo puede desarrollarse también en el curso de otros trastornos, como hepatitis viral, reacciones tóxicas a sustancias químicas, obstrucción biliar y cardiopatías. Además la cirrosis acompaña a otras enfermedades metabólicas que producen el depósito de minerales en el hígado por ejemplo, hemocromatosis (depósito de hierro) y la enfermedad de Wilson (depósito de cobre) (Porth, 2007).

Se sabe que algunos fármacos tienen efectos tóxicos sobre el hígado en función de su estructura química y de la forma en que son metabolizados en ese órgano. El daño hepático directo suele depender de la edad y de la dosis. Debido a la gran actividad de las enzimas metabolizadoras de fármacos en las zonas centrales del hígado, estos fármacos provocan una necrosis centrolobulillar típica (Porth, 2007).

Entre los fármacos que causan hepatotoxicidad directa se encuentran el paracetamol, la isoniazida y la fenitoína, así como algunas otras sustancias entre ellos el tetracloruro de carbono. Hay dos tipos de reacciones principales que participan en la detoxificación y en el metabolismo de los fármacos y otras sustancias químicas: las reacciones de fase 1, que implican una modificación química o la inactivación de una sustancia y las reacciones de la fase 2 que implican la conversión de sustancias liposolubles en

derivados solubles en agua. A menudo estos dos tipos de reacciones están vinculadas. Muchos reactantes de fase 1 no son solubles en agua y por ende deben pasar por una reacción de fase 2 para poder ser eliminados (Porth, 2007).

Enfermedad hepática por alcohol (EHA).

Es una de las principales causas de mortalidad en México. El alcohol está relacionado con más del 50% de las muertes por hepatopatía crónica. La EHA es la causa principal de hígado graso, sin embargo es reversible con la abstinencia. Las complicaciones más graves son hepatitis alcohólica, caracterizada por inflamación con necrosis y cirrosis, que implica la presencia de fibrosis (Méndez-Sánchez y Uribe, 2003). El 80-90 % del alcohol que consume una persona se metaboliza en el hígado, el resto se excreta mediante los riñones, pulmones y la piel. El metabolismo del alcohol se produce por tres vías simultáneas: el sistema de alcohol deshidrogenasa (ADH) ubicado en el citoplasma de los hepatocitos, el sistema de oxidación del etanol microsómico (MEOS), ubicado en el retículo endoplásmico, y la catalasa ubicada en los peroxisomas. Las vías de la ADH y la MEOS producen trastornos metabólicos y tóxicos específicos y las tres vías generan acetaldehído. La vía del MEOS, ubicada en el retículo endoplásmico liso, produce acetaldehído (C_2H_4O) y radicales libres. La ingestión prolongada y excesiva de alcohol produce inducción enzimática y aumento de la actividad del MEOS. Una de las enzimas más importantes del MEOS, miembro del sistema CYP P450 (CYP2E1), también produce oxidación de otros componentes, entre ellos diversos fármacos (paracetamol), toxinas (CCl_4), vitaminas A y D y sustancias carcinógenas. El aumento de la actividad de este sistema aumenta la susceptibilidad de las personas que consumen grandes cantidades de alcohol a los efectos hepatotóxicos de las toxinas industriales, de los anestésicos, de los carcinógenos químicos, de las vitaminas y del paracetamol (Porth, 2007).

1.7 Modelos experimentales de daño hepático.

Para realizar pruebas de diferentes tratamientos (extractos acuosos u orgánicos obtenidos de plantas con propiedades medicinales atribuidas por información etnofarmacológica) (ver Tabla 1), existen modelos experimentales como el de daño hepático inducido con etanol, paracetamol (también llamado acetaminofén), D-galactosamina, tetracloruro de carbono y por ligadura del ducto biliar.

El etanol es utilizado para inducir daño hepático debido a su alta capacidad de provocar peroxidación lipídica e incrementar la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS), por lo cual causa estrés oxidativo (Muriel, 2009). Los productos finales del metabolismo del alcohol (acetaldehído y radicales libres) causan una variedad de trastornos metabólicos que producen daño hepático. El acetaldehído tiene efectos tóxicos múltiples sobre las células y la funcionalidad hepática (Porth, 2007). Los antioxidantes son utilizados como defensa contra los radicales libres (Muriel, 2009).

El paracetamol es un analgésico y antipirético efectivo cuando es utilizado en dosis terapéuticas, pero una sobredosis de este fármaco puede provocar diferentes daños hepáticos. Los estudios realizados sobre el mecanismo de acción del paracetamol, sugieren que hay reducción o agotamiento de glutatión y producción de N-acetil-p-benzoquinoneimina que es la causa principal de necrosis. Esto provoca la formación de ROS y RNS (especies reactivas de nitrógeno), tal como el peroxinitrito. Un antídoto efectivo utilizado contra la intoxicación por paracetamol es N-acetilcisteína (Muriel, 2009).

La D-galactosamina es utilizada para inducir daños hepáticos ya que en dosis altas, causa necrosis en el hígado, esto se debe al agotamiento de trifosfato de uracilo (UTP) y la inhibición de la síntesis de proteínas. En el proceso de necrosis inducido por D-galactosamina, los radicales libres tienen un papel importante basado en el incremento de TBARS (especies reactivas al ácido tiobarbitúrico), las cuales son indicadoras de peroxidación lipídica (Sun *et al.*, 2003).

La ligadura del ducto biliar es un modelo de daño comúnmente utilizado para inducir colestasis mediante la ligadura del colédoco y generar incluso cirrosis biliar secundaria. La retención de ácidos biliares induce apoptosis y necrosis en los hepatocitos, además de promover la formación de radicales libres (Galicia-Moreno *et al.*, 2011).

1.8 Daño hepático inducido por tetracloruro de carbono (CCl₄).

El efecto hepatotóxico del tetracloruro de carbono (CCl₄, TC) está mediado por la formación de radicales libres (Selema de la Morena y Martínez-Pérez, 1999). Al ser un agente hepatotóxico, se utiliza comúnmente para inducir daño hepático en animales de laboratorio. La cirrosis inducida por TC comparte varias características con la cirrosis causada por diferentes agentes en humano por ejemplo, la cirrosis causada por consumo excesivo y prolongado del alcohol (también metabolizado en la subfamilia CYP2E1) conlleva estrés oxidativo debido a la generación de radicales libres, además, esta similitud mantenida durante un daño crónico genera el desarrollo de fibrosis, substancial como antesala de la cirrosis; también, la intoxicación sostenida con tetracloruro promueve peroxidación lipídica, vacuolización, esteatosis, así como necrosis y nódulos fibrosos de regeneración hepática, tal como sucede en la cirrosis humana por alcoholismo (Muriel, 1996; Muriel, 1998).

La administración de TC, se relaciona con un incremento en la liberación de enzimas hepáticas, peroxidación lipídica, y necrosis en hepatocitos (Lee *et al.*, 2008). El TC es metabolizado por el sistema del citocromo P-450. El sistema del citocromo P-450 lleva a cabo la detoxificación de sustancias extrañas, por lo tanto metaboliza algunos fármacos mediante oxidación (Recknagel *et al.*, 1989; Stryer *et al.*, 2004). El TC se acumula en las células hepáticas y sufre una reacción de deshalogenación catalizada por el citocromo P-450 dependiente de mono-oxigenasas; reacciona con el sitio activo del citocromo P-450, donde se reduce para rendir un radical triclorometil ($\cdot\text{CCl}_3$), este radical reacciona rápidamente con oxígeno para formar un radical triclorometil peroxilo ($\text{CCl}_3\text{-O-O}\cdot$), el cual es el punto de partida de la peroxidación lipídica. Estos radicales tienen un rango de acción limitado, relativo a su sitio de origen (retículo endoplásmico), sin embargo todas las partes del hepatocito, particularmente la membrana plasmática,

resultan afectadas ya que los productos de la peroxidación lipídica podrían difundirse desde el retículo endoplásmico a otras partes de la célula (Recknagel *et al.*, 1989).

1.9 Marcadores de daño hepático.

Existe una amplia variedad de pruebas de laboratorio capaces de medir el daño o la discapacidad funcional del hígado. Cuando se presenta algún tipo de lesión en el hígado, es posible detectarla midiendo o cuantificando la actividad de algunas enzimas en plasma, esto es debido a que desde etapas tempranas de daños en el tejido, las enzimas citosólicas comienzan a fugarse de células cuya membrana ha incrementado su permeabilidad por diferentes factores que alteran la función celular. Si el proceso de daño continúa avanzando y se extiende a toda la célula, las enzimas mitocondriales y microsomales serán liberadas y su nivel en plasma incrementará (Woodman, 1988).

Algunos de estos indicadores son:

Fosfatasa alcalina (FA): Es una ectoenzima de la membrana plasmática de los hepatocitos que cataliza la hidrólisis de ésteres de fosfatos orgánicos con un pH alcalino óptimo; un incremento en suero de la actividad de FA, está relacionado con un daño en la membrana, es un marcador de colestasis ya que se libera en presencia de enfermedades que afectan el conducto biliar (Kaplan, 1993; Muriel, 1998; Porth, 2007).

Gamma glutamil-transpeptidasa (GGTP): Es una enzima membranal que cataliza la transferencia del grupo γ -glutamil de péptidos a otros péptidos y a aminoácidos; la liberación de esta enzima a suero, indica daño celular y en consecuencia lesión hepática, específicamente permite medir la función excretora, por lo tanto es un marcador de colestasis (Kaplan, 1993; Muriel, 1998; Porth, 2007).

Alanina-aminotransferasa (ALT): Es una enzima citosólica, específica del hígado que cataliza la transferencia de un grupo α -amino de alanina al grupo α -cetoácido del ácido alfaoxoglutarico; un incremento de esta enzima en suero, refleja un incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática o destrucción celular, lo cual implica necrosis (Kaplan, 1993; Muriel, 1998; Porth, 2007).

Catalasa (CAT): Es una enzima citosólica que cataliza la degradación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En un daño hepático, la actividad enzimática de la catalasa disminuye, por lo tanto hay una acumulación de H_2O_2 , lo que provoca estrés oxidativo. Esta actividad enzimática puede cuantificarse utilizando permanganato de potasio ($KMnO_4$), ya que reacciona con el H_2O_2 (Cohen *et al.*, 1969; Galicia-Moreno *et al.*, 2011).

También se puede evaluar el daño hepático mediante la medición de los niveles de:

Bilirrubinas totales (BT): La bilirrubina es el pigmento biliar primario, utilizado para medir la funcionalidad hepática. La cantidad de BT (bilirrubina libre y conjugada) en suero, aumenta considerablemente cuando existe alguna obstrucción biliar, en consecuencia, este aumento en la concentración de bilirrubinas es un indicador preciso de colestasis, al estar en plasma en niveles significativamente excesivos de $340 \mu\text{mol/L}$; sin embargo se observa una pigmentación amarilla en el plasma con concentraciones de aproximadamente $34 \mu\text{mol/L}$ (Woodman, 1988; Robbins *et al.*, 1995; Muriel, 1998).

Peroxidación lipídica o lipoperoxidación (LP): La peroxidación lipídica se debe a la formación de especies reactivas que dañan a los lípidos componentes de la membrana celular, por lo tanto, este marcador indica el daño en la membrana de los hepatocitos. El grado de peroxidación lipídica se puede determinar cuantificando especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), por ejemplo el malondialdehído (Recknagel *et al.*, 1989; Muriel, 1998).

Glucógeno: Es la fuente principal de energía en el hígado. Al disminuir, el hígado no es capaz de llevar a cabo diferentes funciones relacionadas con obtención de energía. El daño crónico inducido por CCl_4 , provoca alteraciones en la membrana de los hepatocitos por el incremento del contenido de colesterol y de AMPc. El incremento en los niveles de AMPc, produce una disminución en el contenido de glucógeno (Muriel, 1998).

Colágena: La alta concentración de colágena indica la aparición de fibrosis, debido a que es el componente principal del tejido fibrótico. Ésta puede determinarse midiendo la cantidad de hidroxiprolina, por la digestión del hígado con ácido (Muriel, 1998).

1.10 Herbolaria y fitofármacos.

La herbolaria es el uso de plantas para tratar padecimientos diversos y ha sido utilizada desde tiempos ancestrales por diferentes culturas como la egipcia, china, azteca, maya, etc. El uso de plantas medicinales para curar algunos malestares de la salud es una práctica muy común en muchos países (Muñeton, 2009). Una planta medicinal es una especie a la que se le atribuyen propiedades curativas ya que sus principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (Farnsworth y Soejarto, 1991).

México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas con 4500 plantas, después de China que tiene registradas 5000, en tercer lugar está Colombia con 2600 plantas (Muñeton, 2009).

Desde hace cerca de 2000 años, se han utilizado diferentes extractos de plantas como tratamiento para enfermedades hepáticas. Existe registro de aproximadamente 170 sustancias derivadas de plantas, divididas en 55 diferentes familias, con efectos hepatoprotectores (Kuntz y Kuntz, 2006).

En diferentes países se utilizan algunas plantas para tratar padecimientos hepáticos, un ejemplo de éstas es el efecto hepatoprotector del extracto metanólico de *Trichosanthes cucumerina* contra el daño inducido con TC. La actividad antioxidante de la planta tiene un efecto similar al efecto de la silimarina (Kumar *et al.*, 2009).

En el estado de Hidalgo existe una variedad amplia de plantas con propiedades hepatoprotectoras, éstas se preparan generalmente como té o infusión y se toman como tratamiento para diferentes padecimientos en el hígado (ver Tabla 1).

Tabla 1. Listado de plantas utilizadas en el tratamiento de diferentes hepatopatías.

Especie/Nombre común	Forma de uso	Padecimiento hepático para el que se utiliza
<i>Conyza filaginoides</i> Simonillo	Se toma la infusión hecha con toda la planta.	Problemas de hígado y vesícula biliar.
<i>Taraxacum officinale</i> Diente de león	Se toma la infusión preparada con la planta.	Inflamación de hígado.
<i>Cyathea mexicana</i> Pesma, tepezincoyole	Preparación de té con el tronco.	Problemas de hígado, ictericia.
<i>Erythrina lanata</i> Zacapemucho	Preparación de té con la corteza.	Problemas de hígado.
<i>Artemisia ludoviciana</i> Estafiate	Preparación de té con las ramas.	Problemas de hígado y vesícula biliar.
<i>Brickellia veronicifolia</i> Peishto, pexto	Se toma la infusión hecha con las ramas	Derramamiento de bilis.
<i>Eupatorium petiolare</i> Yolochichi, yolochiche	Preparación de té con las ramas.	Problemas de hígado y vesícula biliar.
<i>Helianthemum glomerulatum</i> Santa Martha, nana Juana, sanalotodo	Preparación de té con las ramas.	Problemas de hígado y derramamiento de bilis.
<i>Aregemone platyceras</i> Chicalote	Preparación de té con las hojas.	Dolor de hígado.
<i>Anoda cristata</i> Violeta, amapolita	Preparación de té con las ramas.	Derramamiento de bilis.
<i>Leucaena leucocephala</i> Huashe, huajes	Preparación de té con las ramas.	Problemas de hígado.
<i>Passiflora coriacea</i> Ala de murciélago	Preparación de té con la planta.	Elimina cálculos biliares.
<i>Decatropis bicolor</i> Palo de muerto	Se toma la infusión de hojas.	Problemas de hígado.
<i>Castilleja tenuiflora</i> Hierba del conejo, castilleja	Preparación de té con las ramas.	Padecimientos de hígado y derramamiento de bilis.

Datos tomados de: Villavicencio-Nieto y Pérez-Escandón, 1995; Villavicencio-Nieto *et al.*, 2002; Villavicencio-Nieto y Pérez-Escandón, 2005; Villavicencio-Nieto y Pérez-Escandón, 2006.

Por otro lado, los fitofármacos, se definen como sustancias derivadas o componentes de plantas o partes de plantas, procesadas o no y utilizadas con fines médicos. Éstos se utilizan como preparación primaria o como fracción de una concentración de varias sustancias activas y como sustancias puras (Kuntz y Kuntz, 2006).

Los monoextractos son mezclas de sustancias químicas, contienen agentes activos primarios, secundarios y otras sustancias acompañantes inertes. Los agentes activos principales o primarios, determinan las propiedades terapéuticas de los fitofarmacéuticos. Los agentes secundarios pueden atenuar, potencializar o modificar los efectos del agente activo principal. Las sustancias acompañantes, incluyen celulosa, lignina y almidón, así como diferentes formas de azúcar, proteínas y grasas. Los constituyentes activos de plantas dependen esencialmente del clima, localización y otros factores exógenos (Kuntz y Kuntz, 2006).

Fosfolípidos esenciales. Son aislados de la semilla de soya. Se conocen aproximadamente 800 especies de soya. Dependiendo de la especie, la localización y el método de extracción, las semillas contienen 35-40% proteínas, 20-30% carbohidratos, 5-10% sustancias acompañantes (vitaminas, aminoácidos, glicopéptidos, flavonoides, xantinas, etc.) y 12-18% grasas. Los fosfolípidos esenciales, tienen efectos protectores, curativos y/o regenerativos en las membranas de los hepatocitos, además muestran buenos resultados como agentes antifibrogénicos e inhibidores de peroxidación lipídica, muestran también un efecto regenerativo. El mecanismo de acción de los fosfolípidos esenciales sugiere entonces, efectos curativos, protectores y regenerativos para daños hepáticos e hígado graso, hepatitis viral, intoxicación aguda, insuficiencia hepática, hepatitis viral crónica y cirrosis (Kuntz y Kuntz, 2006).

Los flavonoides constituyen un grupo extenso de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos y comunes en todo el reino vegetal, particularmente en las partes aéreas; éstos abarcan cinco subclases, antocianinas, flavonoles, flavonas, catequinas y flavononas. Los flavonoides son ampliamente utilizados como remedios debido a sus propiedades espasmolíticas, antiinflamatorias, diuréticas y antioxidantes. Se ha propuesto que estas propiedades se deben a la capacidad de absorción de radicales libres de dichos compuestos (Selema de la Morena y Martínez-Pérez, 1999; Liu *et al.*,

2007; Nazaruk, 2008). Por ejemplo, la silimarina, es una mezcla de tres flavonoides, se obtiene de la especie *Silybum marianum* (cardo lechoso o cardo mariano), incluye, silibinina, silidianina y silicristina; siendo la silibinina ($C_{25}H_{22}O_{10}$) el principal agente activo. Otro ejemplo es la colchicina, un alcaloide que se obtiene de la especie *Colchicum autumnale* (narciso de otoño) (Kuntz y Kuntz, 2006).

Particularmente el uso de fosfolípidos esenciales combinados con silimarina y la colchicina, sirven como terapia de apoyo en el caso de cirrosis ya que se reportan, en diversos estudios, efectos antioxidantes (interacción con radicales libres, reducción de peroxidación lipídica, disminución de malonaldehído y disminución del consumo de glutatión), antifibrogénicos, incremento en síntesis proteica e inhibición de la síntesis de colesterol. (Kuntz y Kuntz, 2006).

2. ANTECEDENTES.

2.1 Género *Cirsium* y sus efectos biológicos.

Las plantas del género *Cirsium* son llamadas comúnmente cardos, son plantas herbáceas perennes o anuales, por lo general espinosas, con cabezuelas solitarias paniculadas, con brácteas comúnmente graduadas, que terminan en una espina, no tienen flores liguladas, con flores hermafroditas y corolas tubulares, de color blanco, amarillo, rosadas o moradas. El género incluye aproximadamente 200 especies y es un grupo bastante diversificado en el Valle de México (Calderón de Rzedowski y Rzedowski, 2001; www.conabio.gob.mx, 2009). En el estado de Hidalgo se pueden encontrar 6 especies del género *Cirsium*, estas son *C. jorullense*, *C. raphilepis*, *C. subuliforme*, *C. duranguense*, *C. ehrenbergii* y *C. vulgare* (Calderón de Rzedowski y Rzedowski, 2001).

El género *Cirsium* ha sido utilizado ampliamente para la investigación farmacológica, principalmente en países Asiáticos, diversas especies del género han sido evaluadas y utilizadas como solución para diferentes padecimientos. Por ejemplo, en la medicina tradicional china, *C. japonicum* es utilizado como antihemorrágico, diurético y como tratamiento en casos de cáncer hepático, uterino, de próstata y leucemia (Ganzera *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007); *C. setosum* es usado por sus propiedades antiinflamatorias; *C. pascuarense* se utiliza para el tratamiento de diabetes (Ganzera *et al.*, 2005) y *C. rivulare* tiene propiedades ansiolíticas y efectos sedantes ligeros (Nazaruk y Jakoniuk, 2005).

En Europa, específicamente en la medicina tradicional polaca, *C. arvense* y *C. oleraceum* tienen diferentes usos, entre ellos diurético, astringente, antiinflamatorio y presentan actividad antimicrobiana. Además *C. oleraceum* tiene efectos ansiolíticos (Nazaruk, 2008).

En el estado de Hidalgo, la infusión de hojas e inflorescencias de *C. ehrenbergii* se utiliza como tratamiento para hemorragia y flujo vaginal (para el flujo se hacen lavados vaginales y se bebe), tos y dolor de corazón (tomado en ambos casos); *C. raphilepis* y *C. subuliforme* se utilizan como remedio para la tos y para lavado vaginal

respectivamente (Villavicencio-Nieto y Pérez-Escandón, 1995; Pérez-Escandón *et al.*, 2003).

Existen otros reportes de estudios realizados con especies del género *Cirsium*, por ejemplo, la actividad anticancerígena de *C. japonicum* en ratones Kunming fue analizada por Liu *et al.* (2007), además de un análisis cuantitativo de los flavonoides presentes en la planta y mencionan la presencia de pectolarina y 5,7-dihidroxi-6,4 dimetoxiflavona. Se reporta que al administrar los extractos metanólico, etanólico y acuoso de *C. japonicum* (50 mg/kg) se observa un efecto favorable contra el crecimiento de tumores al inhibir el crecimiento de las células cancerígenas.

Lee *et al.* (2002) realizaron la extracción de *C. setidens* con cloruro de metileno; los componentes fueron aislados y probados contra cinco líneas de células cancerígenas. Entre los componentes aislados se encuentran dos hidroperóxidos de triterpeno (cicloartano), que mostraron citotoxicidad moderada contra 3 tipos celulares y citotoxicidad significativa contra los restantes. Un terpenoide (sesquiterpenlactona) mostró baja citotoxicidad y finalmente un monogalactosildiacil glicerol, que mostró citotoxicidad selectiva contra el melanoma.

Fueron extraídos los componentes de los extractos metanólicos de *C. japonicum* y *C. setosum* por Ganzera *et al.* (2005), reportando la presencia de pectolarina y linarina como componentes principales respectivamente. Se hallaron propiedades antihemorrágicas para diferentes tipos de sangrado y propiedades antiinflamatorias.

El efecto hipoglucemiante de los extractos con hexano, cloroformo y metanol de las hojas de *C. pascuarense* fue evaluado por Pérez-Gutiérrez *et al.* (2001) en un modelo de diabetes en rata Wistar y ratón CDI; se reporta un efecto hipoglucemiante del extracto hexánico en ratones hiperglucémicos e incluso en ratones con niveles normales de glucosa en sangre, además modifica la tolerancia a la glucosa en ratas diabéticas; el efecto resulta comparable con el efecto causado por tolbutamida (fármaco utilizado como tratamiento para diabetes).

En un estudio realizado por Soon-Ho *et al.* (2003) se reporta la presencia de flavonoides como 1-8 cineol, escopoletina, acacetina, pectolarina y cirsimarina, entre

otros, obtenidos de los extractos con hexano, cloroformo y butanol de *C. rhinoceros*. Se menciona que 1-8 cineol, escopoletina, acacetina y cirsimarina fueron aislados por vez primera de esta planta. Se atribuyen a estos flavonoides algunos efectos antiinflamatorios, antibacteriales y reguladores de la presión arterial.

Nazaruk y Jakoniuk (2005) realizaron extractos acuosos, metanólicos y etanólicos de flores y hojas de *C. rivulare* reportando en todos los casos un importante efecto antibacteriano, resultando el extracto acuoso de hojas el más efectivo contra bacterias Gram +.

Se realizó un estudio fitoquímico y biológico de *C. ehrenbergii* con extractos metanólico y hexánico, en ambos casos resultó positiva la presencia de alcaloides con relación a los efectos relajantes en el útero de rata Wistar, el extracto metanólico inhibió las contracciones pero en menor porcentaje que el extracto hexánico (Fernández- Martínez *et al.*, 2007).

2.2 Propiedades hepatoprotectoras del género *Cirsium*.

Muchas especies del género, también son utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de padecimientos hepáticos, este efecto hepatoprotector ha sido evaluado ampliamente.

Nazaruk (2008) realizó una evaluación del efecto antioxidante de cinco especies de *Cirsium*, utilizando el extracto metanólico de la inflorescencia de *C. arvense*, *C. oleraceum*, *C. palustre*, *C. rivulare* y *C. vulgare*; se concluye que todas las especies evaluadas tienen actividad antioxidante. También se aislaron los componentes de *C. palustre* reportando que la mayoría de los flavonoides aislados, se encuentran en otras especies, principalmente en *C. rivulare*, *C. arvense* y *C. oleraceum*, sin embargo reporta que por vez primera se encontró 7-O-glucosido en alguna especie de *Cirsium* (Nazaruk, 2009).

Park *et al.* (2004) analizaron los efectos de extracto metanólico de *Cirsium japonicum* durante el daño inducido por alcohol en rata Sprague Dawley; se reportó que el extracto

protege del daño por peroxidación inducida con etanol e incrementa sus enzimas metabolizantes y aumenta el glutatión reducido.

El extracto acuoso de *C. arisanense* ha mostrado hepatoprotección *in vitro* en la línea celular de hepatoma Hep 3B e *in vivo* en ratón C57BL/6, ambos dañados con tacrina, y fue reportado un aumento de viabilidad celular y glutatión así como la disminución de necrosis y ON (Ku *et al.*, 2008).

El extracto de *Cirsium setidens* ha sido evaluado en el daño hepático inducido por D-galactosamina en rata Sprague Dawley (Yoo *et al.*, 2008); se concluyó que existe inducción de enzimas antioxidantes y elevación de glutatión reducido.

En un estudio realizado por Lee *et al.* (2008) sobre la actividad hepatoprotectora y antioxidante del extracto etanólico de *C. setidens* en un modelo de daño hepático inducido por TC en rata Wistar, se reportó que las hojas poseen actividad antioxidante, el efecto protector de la planta fue confirmada en la observación histológica.

Alvarado-Baca (2012), llevó a cabo una evaluación del efecto hepatoprotector de *C. ehrenbergii* induciendo daño hepático con TC a ratas Wistar. Se reportó que el extracto hexánico de la inflorescencia de la planta mostró actividad antioxidante y una evidente protección hepática.

2.3 *Cirsium vulgare* y sus propiedades biológicas.

2.3.1 Características de la planta.

Particularmente la especie *Cirsium vulgare* L. (Figura 8), es un cardo que pertenece al Phylum Magnoliophyta, Clase Magnoliopsida, Orden Asterales y a la Familia Asteraceae (Compositae) (Calderón de Rzedowski y Rzedowski, 2001; www.conabio.gob.mx, 2009). Es una planta herbácea bienal, erecta, hasta de 1.5 m de alto; tallo por lo general ramificado en la parte superior, aracnoideo-lanoso, conspicuamente alado, alas dentado-espinosas; hojas sin peciolo bien definido, las basales formando una roseta, las caulinas amplexicaules y largamente decurrentes sobre el tallo, profundamente pinnatirpartidas a bipinnatirpartidas con los segmentos

triangulares, terminando en una espina hasta de 1 cm de largo de color pajizo, margen irregularmente espinuloso, aracnoideo-pubescentes y además con frecuencia provistas de numerosas cerdas rígidas y pungentes en el haz, tomentosas, casi glabras en el envés; cabezuelas solitarias o agrupadas por pocas en los extremos de las ramas; involucreo campanulado a ovoide, sus brácteas ca. 160, dispuestas en varias series, linear-subuladas, las más largas hasta de 4 cm de largo, atenuadas en el ápice hacia una espina amarillenta de 2 a 2.5 mm de largo, aracnoideo-tomentosas y con frecuencia más o menos reflejas; receptáculo plano; flores de 150 a 250, sus corolas de 2.5 a 3.5 cm de largo; de color lila, los segmentos del limbo de 5 a 8 mm de largo, un poco más cortos a dos veces más largos que la garganta; anteras de 8 a 11 mm de largo; aquenio oblongo a elíptico, algo comprimido, de 3 a 5 mm de largo, amarillento con líneas verticales oscuras, glabro, vilano de ca. 60 cerdas blanquecinas, desiguales, las más largas de 2 cm de longitud. Maleza ocasional, nativa de Eurasia, introducida en norte y Sudamérica. Alt. 2250m. Es polinizado por abejas y abejorros y crece en lugares de clima árido (Halevy, 1989; Calderón de Rzedowski y Rzedowski, 2001).



Figura 8. A. *Cirsium vulgare*. B. Inflorescencias de la planta.

2.3.2 Propiedades biológicas de la planta.

Las propiedades biológicas de las plantas se atribuyen a la presencia de diferentes metabolitos secundarios, se han aislado de *C. vulgare* algunos con alta polaridad y otros con baja polaridad y se han identificado diferentes clases, entre ellas:

Flavonoides: kaempferol-3-O-glucósido, quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-galactósido, apigenina-7-O-diglucósido y genkuanina-4-O-glucósido.

Ac. Fenólicos: p-cumárico, caféico, ferúlico, gálico, clorogénico, rosmarínico, vanílico, ferúlico y p-hidroxibenzoico.

Esteroles: Δ -5-avenasterol, brasicasterol, campesterol, β -sitosterol y estigmasterol.

Aceites esenciales: benzaldehído, 2,3-octanodiol, 2-pentil-furano, n-octanal, β -linalool, n-nonanal, n-decanal, n-alcano, β -ciclocitral, 2-metoxi-4-vinilfenol, eugenol, geranil-acetona, heptadecanal y fitol (Nazaruk, 2008; Kozyra *et al.*, 2009; Kozyra y Glowniak, 2013).

La especie *C. vulgare* ha sido utilizada en la medicina tradicional polaca como ansiolítico, antihemorrágico, diurético, astringente, antiinflamatorio, en el tratamiento de articulaciones reumáticas y es aplicado como cataplasma para dolor de mandíbulas. Además el extracto metanólico de las inflorescencias tiene actividad antioxidante (Nazaruk, 2008; Kozyra *et al.*, 2009; Kozyra y Glowniak, 2013).

También existe un estudio realizado por Csupor-Löffler *et al.* (2009) en el que se evaluó la actividad antiproliferativa de células cancerígenas de 26 especies de la familia Asteraceae, entre ellas *C. vulgare*, utilizando extractos hexánico, clorofórmico, metanólico y acuoso de inflorescencias y hojas, donde reportan que los extractos, clorofórmico, hexánico y metanólico de esta especie tiene mejores resultados contra el cáncer cervicouterino, mientras que el extracto acuoso muestra mejor actividad contra el cáncer de pecho.

La actividad antimicrobiana de *C. vulgare* fue analizada por Borawska *et al.* (2010) y se reporta que el extracto metanólico de hojas e inflorescencias tiene un efecto antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomona aeruginosa*.

Un antecedente más directo es el estudio de Jiménez-Santana (2010), donde se realizó un análisis de los extractos hexánicos de las inflorescencias de *C. ehrenbergii* y *C. vulgare* utilizando dos dosis de 250 mg/kg y 500 mg/kg, en un daño hepático agudo con TC en rata Wistar. Ambos extractos mostraron un efecto hepatoprotector contra el daño causado por el TC, con ambas dosis.

3. JUSTIFICACIÓN.

Es importante realizar investigación acerca de fármacos con funciones hepatoprotectoras, debido a que las enfermedades hepáticas son un problema de salud pública. Según el Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS), son la cuarta causa de muerte en nuestro país y el estado de Hidalgo tiene el décimo lugar con mayor número de muertes a causa de estos padecimientos (694 muertes en un año, tasa de 78.2) (www.sinais.salud.gob.mx, 2008). También son una de las causas principales de muerte a nivel mundial, en África y Asia son especialmente provocadas por virus y en Europa y América por consumo de alcohol (Muriel, 1998). Además, existen muy pocos tratamientos realmente efectivos para controlar el daño hepático, aunado a que el tratamiento puede ser muy costoso a largo plazo, e inclusive un trasplante de hígado es difícil de costear y conseguir. Particularmente la cirrosis hepática es uno de los padecimientos más frecuentes en México, ocurre principalmente en individuos de 30 a 60 años de edad y en la mayoría de los casos es causada por la ingestión prolongada e intensa de alcohol; ésta es la causa de muerte de un 12-15 % de los pacientes en los hospitales (Pérez-Tamayo y López-Corella, 2007).

Además, es importante buscar alternativas nuevas, más eficientes y seguras contra padecimientos diversos ya que, de acuerdo con cifras de la Secretaría de Salud, al menos el 90% de la población usa las plantas medicinales; de ese 90%, la mitad usa exclusivamente a las plantas medicinales para atender sus problemas de salud; el otro 50%, además de éstas, usa la medicina alópata (Muñeton, 2009). Siendo *C. vulgare* una especie poco estudiada por sus propiedades terapéuticas y teniendo en cuenta los antecedentes hepatoprotectores de su género así como un estudio hepatoprotector en un modelo de daño agudo, es importante evaluar esta misma en un modelo de daño crónico como el de TC.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Tendrá el extracto hexánico de las inflorescencias de *C. vulgare* un efecto hepatoprotector en un modelo de cirrosis por TC en rata?

5. HIPÓTESIS.

El extracto hexánico de la inflorescencia de *C. vulgare* tiene propiedades hepatoprotectoras contra el daño crónico provocado por el TC en rata, inhibiendo así, el desarrollo de cirrosis.

6. OBJETIVOS.

6.1 Objetivo general.

Evaluar las propiedades farmacológicas del extracto hexánico de la inflorescencia de *Cirsium vulgare* en ratas cirróticas por tetracloruro de carbono (CCl₄, TC) para comprobar su efecto hepatoprotector.

6.2 Objetivos particulares.

- Obtener extracto hexánico de *C. vulgare* (EX) en calidad y cantidad suficiente mediante Soxhlet para su evaluación farmacológica como agente hepatoprotector.
- Determinar el efecto antinecrótico, antioleostático y antifibrótico del EX en ratas cirróticas para evidenciar sus efectos hepatoprotectores en el modelo de daño hepático crónico por TC.
- Evaluar el efecto antioxidante del EX mediante marcadores de estrés oxidativo para proponer su mecanismo de acción hepatoprotectora.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 Obtención del extracto hexánico de *C. vulgare*.

Se llevó a cabo la colecta de las inflorescencias de la planta en el municipio de Mineral de la Reforma, estado de Hidalgo; ubicado 20°8'8" latitud N y 98°40'19" longitud O; el municipio se encuentra a 2400 m de altitud. La especie fue previamente identificada en el Herbario del Centro Médico Siglo XXI del IMSS, con número de voucher 15598IMSSM. Posteriormente, ésta se dejó secar a temperatura ambiente y antes de que las inflorescencias se presentaran como cuerpos fructíferos con semillas, fue molida a mano para rellenar los cartuchos de celulosa que fueron extraídos con hexano por medio de Soxhlet, durante 9 horas. El extracto fue concentrado en un rotavapor para obtener así el extracto puro a masa constante.

7.2 Evaluación farmacológica.

Las ratas utilizadas para esta investigación recibieron un trato humanitario de acuerdo a los lineamientos establecidos por la NOM-062-ZOO-1999, concerniente a la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio, así como los lineamientos previstos en: Care and Use of Laboratory Animals (National Institute of Health, 1985).

Se trabajó con cuatro grupos de ratas Wistar macho con una masa inicial de 60-80 g. A cada grupo se le administró el tratamiento durante ocho semanas (Tabla 2): el grupo control de controles (VEX + VTC, vehículo del extracto, aceite de oliva, VEX y vehículo del TC, aceite mineral, VTC, n = 10), fue administrado vía intraperitoneal (i.p.) con VTC y oralmente (p.o.) VEX; el grupo control extracto (EX + VTC, n = 10), fue administrado vía i.p. con VTC y vía p.o. con extracto (300 mg/kg); el grupo control dañado (VEX + TC, n = 16), fue administrado vía i.p. con TC (0.4 g/kg) y vía p.o. VEX, y el grupo reto (EX + TC, n = 16) fue administrado vía i.p. con TC y vía p.o. con el extracto. El extracto fue administrado diariamente y el tetracloruro de carbono 3 veces por semana.

El TC es altamente volátil y liposoluble, por lo tanto requiere un vehículo como el aceite mineral, que es un agente inerte y se utiliza generalmente en este modelo de daño. El extracto hexánico requiere un vehículo como el aceite de oliva que generalmente se utiliza para disolver extractos no polares, es un agente inocuo y no evidencia efecto hepatoprotector *per se*.

La n de los dos grupos tratados con TC es mayor que los otros dos, debido a la mortalidad de los animales durante el tratamiento por la administración del TC.

El uso de cuatro grupos obedece a que el grupo control de controles aporta los valores bioquímicos normales en rata sana; el segundo grupo corresponde al control extracto para evidenciar que no exista una modificación de los valores normales en rata o un efecto deletéreo *per se* del extracto; el tercer grupo corresponde al control dañado donde se indujo la cirrosis y de él se obtienen los valores anormales de los marcadores bioquímicos propios de la enfermedad y, el cuarto grupo es el grupo reto que evidencia el efecto farmacológico del extracto sobre los marcadores bioquímicos de daño para ser analizado y determinar su efecto hepatoprotector para la prevención de la cirrosis.

La dosis utilizada de 300 mg/kg se escogió con base en diversas dosis de extractos vegetales utilizadas en las referencias, las más empleadas se hallan en el intervalo de 250 a 1000 mg/kg, así como se consideraron las reportadas en estudios similares para la evaluación hepatoprotectora de especies del género *Cirsium* (Park *et al.*, 2004; Ku *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008); así, tomando en consideración eso y los estudios previos realizados en el laboratorio sobre el efecto hepatoprotector, donde se utilizaron las dosis de 250 y 500 mg/kg que resultaron equiefectivas (Jiménez-Santana, 2010), se escogió la dosis intermedia de 300 mg/kg, misma utilizada para el estudio de *C. ehrenbergii* en el mismo modelo aquí empleado en rata (Alvarado-Baca, 2012).

Tabla 2. Tratamiento administrado a cada grupo.

Grupo	Tratamiento
VEX+VTC (Control de controles) n = 10	Aceite de oliva (p.o.)* + Aceite mineral (i.p.)**
EX+VTC (Control de extracto) n = 10	Extracto (p.o.)* + Aceite mineral (i.p.)**
VEX+TC (Control de daño) n = 16	Aceite de oliva (p.o.)* + TC (i.p.)**
EX+TC (Grupo reto) n = 16	Extracto (p.o.)* + TC (i.p.)**

*Administración diaria, ** administración 3 veces por semana.
 Dosis de extracto: 300 mg/kg, dosis TC: 0.4 g/kg.
 Aceite de oliva: vehículo del extracto.
 Aceite mineral: vehículo del TC.

Al concluir las ocho semanas de tratamiento se sacrificó a los animales por exanguinación, previamente anestesiados con éter. Se obtuvieron las muestras de sangre mediante punción cardiaca, utilizando heparina sódica como anticoagulante (1000 U/mL); el plasma fue obtenido centrifugando las muestras a 3000 rpm durante 10 minutos. Se aisló el hígado rápidamente, recibió tres enjuagues en solución isotónica y fue colocado en hielo para su conservación durante su uso.

Posteriormente se realizó en plasma la determinación de los siguientes marcadores de daño hepático:

Actividad de fosfatasa alcalina (FA, indicador de colestasis). El método utilizado se basa en la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato por la FA, para producir fosfato inorgánico y p-nitrofenol, el que se leyó a 410nm (Berger y Rudolph, 1963; Bergmeyer *et al.*, 1983).

Actividad de gamma glutamil-transpeptidasa (GGTP, indicador de colestasis). En este método se utilizó como sustrato la glutamil-p-nitroanilida que en presencia de la enzima gamma glutamil-transpeptidasa y del receptor del grupo gamma-glutamilo, como lo es la glicil-glicina, produce la gamma glutamilglicina y p-nitroanilina que se cuantificó con un espectrofotómetro a 410 nm (Glossman y Neville, 1972).

Bilirrubinas totales (BT, marcador de colestasis y funcionalidad hepática). La técnica que se utilizó es la descrita por el fabricante del Kit para cuantificación de bilirrubinas, marca TECO Diagnostics (EUA).

Actividad de alanina-aminotransferasa (ALT, marcador de necrosis). La técnica permite la obtención de piruvato a partir de la reacción de transaminación entre la alanina y el ácido alfaoxoglutarico y se leyó a 515 nm (Reitman y Frnkl, 1978).

En hígado se analizó:

Grado de peroxidación lipídica (LP, indicador de daño oxidativo membranal). Esta técnica es colorimétrica y se basa en la cuantificación de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (como el malondialdehído, MDA) que se leyó a 532 nm (Buege y Austin, 1978). Los resultados se expresan como nmol de MDA/mg proteína. Las proteínas se cuantifican con el método de Bradford (Bradford, 1976).

Actividad de catalasa (CAT, indicador de estrés oxidativo y funcionalidad hepática). La técnica para cuantificación de catalasa se llevó a cabo homogenizando 0.5 g de hígado utilizando 5 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio (KH_2PO_4). Se agregaron alícuotas de hígado homogenado a agua oxigenada (H_2O_2) para iniciar la reacción; ésta se detuvo después de 3 minutos agregando ácido sulfúrico (H_2SO_4) 6N. Se agregó permanganato de potasio (KMnO_4), que hace reacción con H_2O_2 . El KMnO_4 residual se leyó a 480 nm. La actividad de catalasa fue calculada con el índice constante de reacción de la descomposición de H_2O_2 ($\text{K} \cdot 10^2/\text{min}$) (Cohen *et al.*, 1969; Galicia-Moreno *et al.*, 2011).

Nivel de glucógeno (indicador de funcionalidad hepática). La cuantificación de glucógeno se obtuvo con la técnica de la antrona en solución de H_2SO_4 (Seifter *et al.*, 1950).

Cuantificación de colágena (como hidroxiprolina, HP, marcador de fibrosis). La técnica utilizada se basa en la descrita por Rojkind y González (1974), donde por medio de la digestión ácida del tejido hepático se extrae la hidroxiprolina e indirectamente se cuantifica la colágena.

7.3 Tinciones histológicas.

Se analizaron las muestras de tejido hepático de los cuatro grupos tratados. Éstas fueron procesadas en el Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, perteneciente al CINVESTAV de la ciudad de México, con el apoyo de la Dra. Mineko Shibayama Salas.

La técnica utilizada para este análisis fue la tinción de rutina de Hematoxilina/Eosina (HE) para evidenciar el núcleo en color azul y el citoplasma de los hepatocitos en color rosa, respectivamente (Geneser, 2008). También permite observar el músculo en tonos rojizos y los glóbulos rojos de color naranja-rojizo, además de la fibrina en rosa intenso (Fortoul y Castell, 2010).

Las muestras fueron fijadas en formol al 10% en solución salina reguladora de fosfatos (PBS). El tiempo mínimo de fijación fue de 24 horas. Fueron enjuagadas con agua y deshidratadas utilizando alcoholes, para su posterior inclusión con parafina. Se obtuvieron cortes de aproximadamente 6-7 μm de espesor utilizando un microtomo.

Para la tinción, las muestras se desparafinaron en xilol (3 minutos), se rehidrataron en baños decrecientes de alcohol (alcohol absoluto y alcohol de 95°, dos baños durante 3 minutos cada uno); se colorearon las muestras con hematoxilina durante 15 minutos (el tiempo depende de la preparación y varía entre 3 y 20 minutos). Se enjuagó con dos baños de agua destilada de 2 minutos cada uno. Para la diferenciación se realizaron de 3 a 10 inmersiones en alcohol ácido y se enjuagaron con agua durante 2 minutos. Se sumergieron en agua amoniacal hasta conseguir un color azul brillante y se enjuagaron nuevamente con agua (10-20 minutos). Se colorearon esta vez con eosina (15-20 minutos) para volver a deshidratar, esta vez con baños crecientes de alcohol, dos baños de 1 minuto cada uno con alcohol de 95° y dos baños de 1 y 2 minutos con alcohol de 100°. Finalmente se aclararon con xilol (3 minutos) y se montaron en bálsamo.

7.4 Análisis estadístico.

La prueba estadística aplicada a los datos de cada grupo tratado fue un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, para la comparación de todos los grupos contra todos, es la llamada comparación múltiple pareada total del método de Student-Newman-Keuls; esta prueba proporciona la diferencia estadísticamente significativa con una $P < 0.05$. La prueba se corrió en un paquete de Sigma-Stat versión 10.0 (Systat Software, USA).

Se presentan las gráficas de barras en la sección de resultados que contemplan el valor promedio de cada determinación, con la n correspondiente a cada grupo, \pm el error estándar indicado en la parte superior.

Durante el procesamiento de datos los valores aberrantes se eliminaron quedando una n mínima de 8 para realizar la prueba estadística.

8. RESULTADOS.

8.1 Marcadores bioquímicos.

- **Actividad de fosfatasa alcalina.** Como lo muestra la Figura 9, la actividad enzimática de FA se incrementó visiblemente en el grupo dañado (VEX+TC) (aproximadamente un 50% más que el control de controles, VEX+VTC). La administración del EX no induce un cambio *per se* y se previene por completo el incremento de este marcador de colestasis como se observó en el grupo reto (EX+TC).

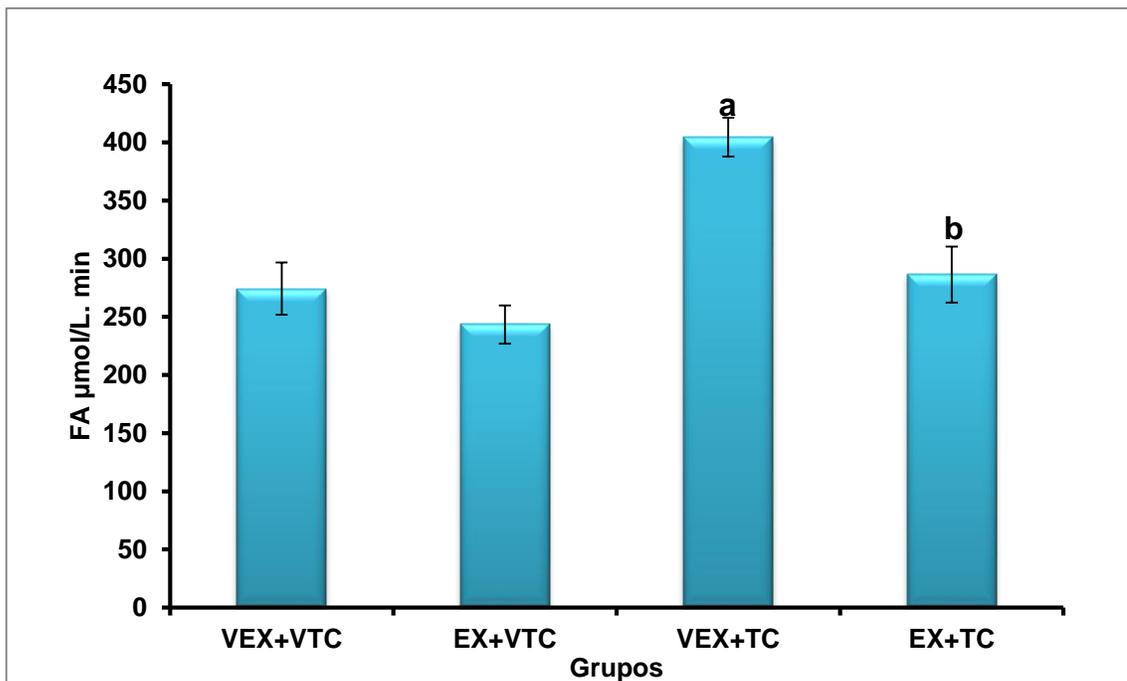


Figura 9. Fosfatasa alcalina (marcador plasmático de colestasis). Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos \pm EE. “a” indica la diferencia significativa con respecto al grupo VEX+VTC; “b” indica la diferencia significativa con respecto al grupo VEX+TC, con una $P < 0.05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls.

- Actividad de gamma glutamil-transpeptidasa.** En la Figura 10, se observa un incremento de aproximadamente un 40% en la actividad enzimática de GGTP en el grupo cirrótico (VEX+TC) comparado con el grupo control de controles (VEX+VTC); sin embargo, en el grupo reto (EX+TC) se observa una disminución significativa del marcador de colestasis en comparación con el grupo VEX+TC. Nuevamente el EX no induce algún cambio por sí mismo.

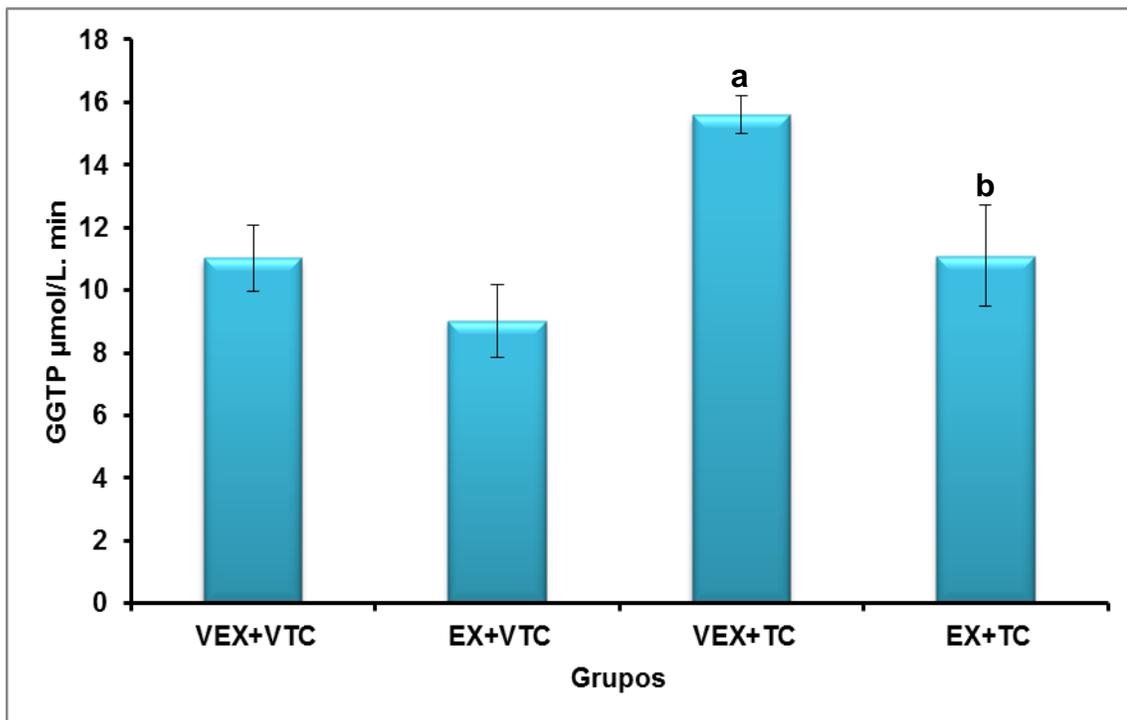


Figura 10. Gamma glutamil-transpeptidasa (marcador plasmático de colestasis). Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos \pm EE. “a” indica la diferencia significativa con respecto al grupo VEX+VTC; “b” indica la diferencia significativa con respecto al grupo VEX+TC, con una $P < 0.05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls.

- Bilirrubinas totales.** En el caso de BT, con respecto al grupo control (VEX+VTC) se observó que la concentración de bilirrubinas séricas en el grupo dañado (VEX+TC) se duplicó; el grupo control de extracto (EX+ VTC), mostró valores similares al grupo VEX+VTC. En el grupo reto (EX+TC) se observó una disminución significativa del 58% con respecto al grupo dañado, lo cual hace evidente la protección parcial contra el daño y esto confirma la actividad antioleostática del extracto, observada con FA y GGTP.

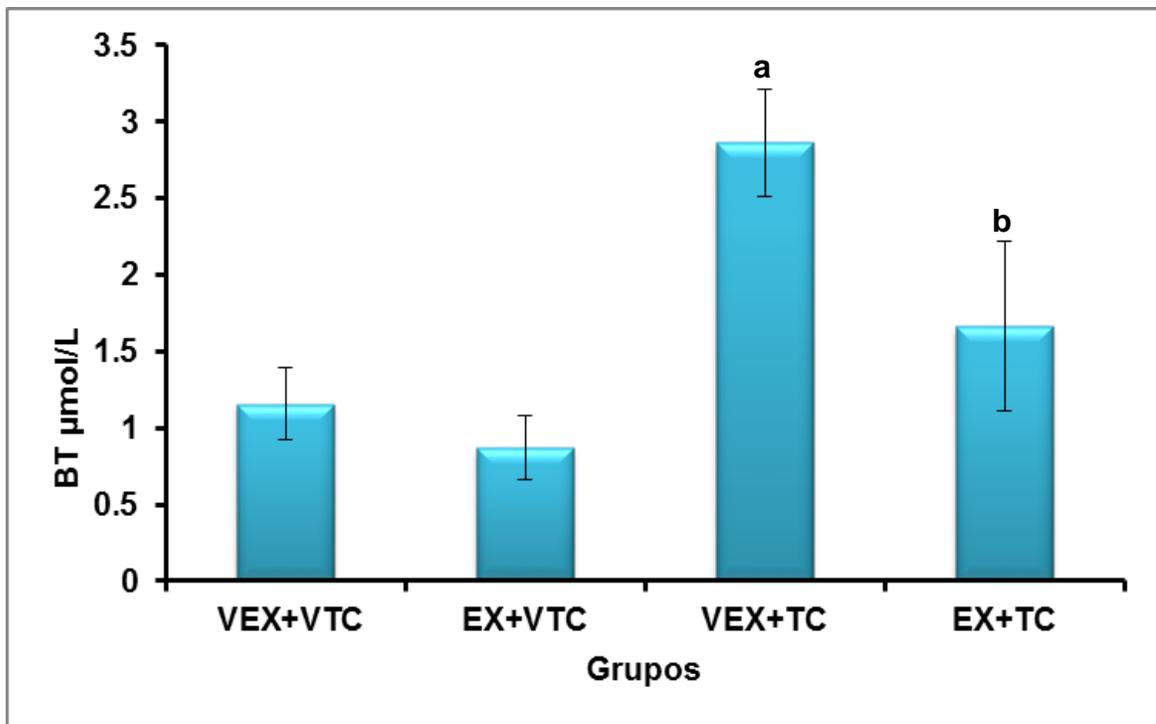


Figura 11. Bilirrubinas totales (marcador plasmático de colestasis y funcionalidad hepática). Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos \pm EE. “a” indica la diferencia significativa con respecto al grupo VEX+VTC; “b” indica la diferencia significativa con respecto al grupo VEX+TC, con una $P < 0.05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls.

- Actividad de alanina-aminotransferasa.** La actividad enzimática de ALT aumenta considerablemente en el grupo dañado (VEX+TC), es decir los valores se duplican con respecto al grupo control (VEX+VTC); en el grupo control de extracto (EX+VTC) no se produce necrosis y en el grupo reto (EX+TC) se observa el efecto antinecrótico del extracto, debido a que el EX previno por completo la elevación de este marcador.

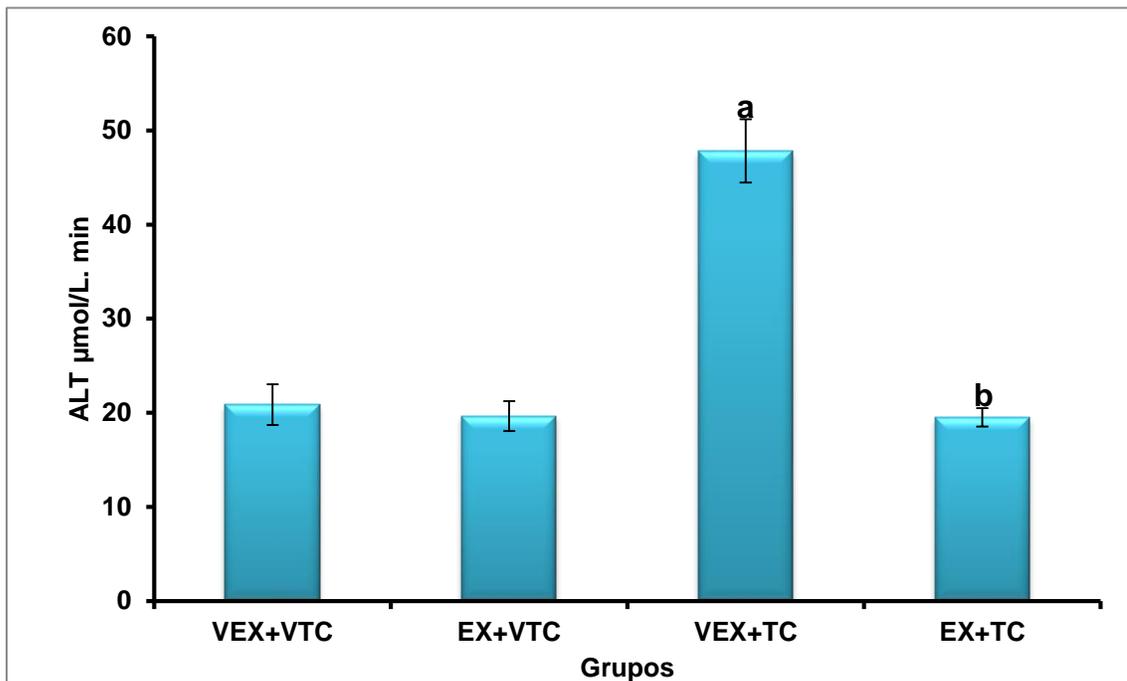


Figura 12. Alanina-aminotransferasa (marcador plasmático de necrosis). Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos \pm EE. “a” indica la diferencia significativa con respecto al grupo VEX+VTC; “b” indica la diferencia significativa con respecto al grupo VEX+TC, con una $P < 0.05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls.

- Grado de peroxidación lipídica.** Se observó un alto grado de lipoperoxidación en el grupo dañado (VEX+TC) que con respecto al grupo testigo (VEX+VTC) éste se cuadruplicó. En comparación con el grupo VEX+VTC, el grupo EX+VTC presentó una elevación del estrés oxidativo; el efecto hepatoprotector se hace evidente al mostrar una reducción del casi 60% en el grado de lipoperoxidación del grupo reto (EX+TC), con respecto al grupo VEX+TC, sin embargo no se observó un efecto sinérgico en el grupo EX+TC.

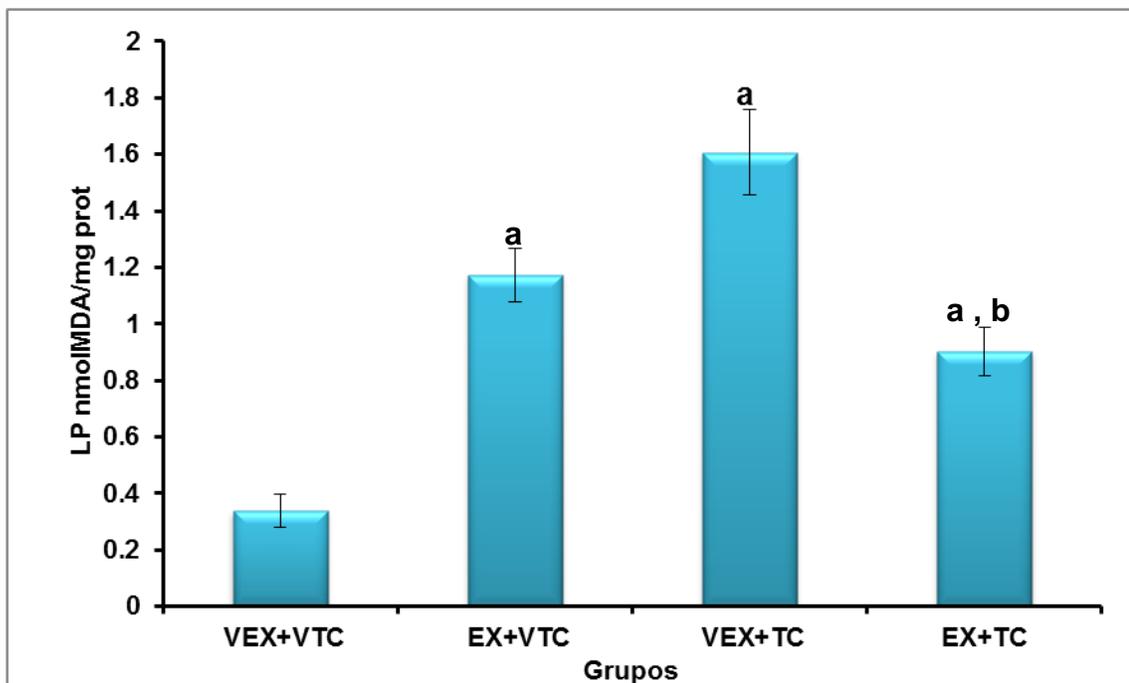


Figura 13. Lipoperoxidación (marcador de daño oxidativo membranal). Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos \pm EE. “a” indica la diferencia significativa con respecto al grupo VEX+VTC; “b” indica la diferencia significativa con respecto al grupo VEX+TC, con una $P < 0.05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls.

- Actividad de catalasa.** La actividad enzimática de catalasa disminuyó notablemente en los grupos EX+VTC y EX+TC, aproximadamente un 80% con respecto al grupo control; en referencia al mismo, la actividad enzimática de catalasa incrementó en un 40% aproximadamente en el grupo dañado (VEX+TC). Contrario al resultado esperado, los grupos tratados con extracto muestran una posible inhibición de esta enzima.

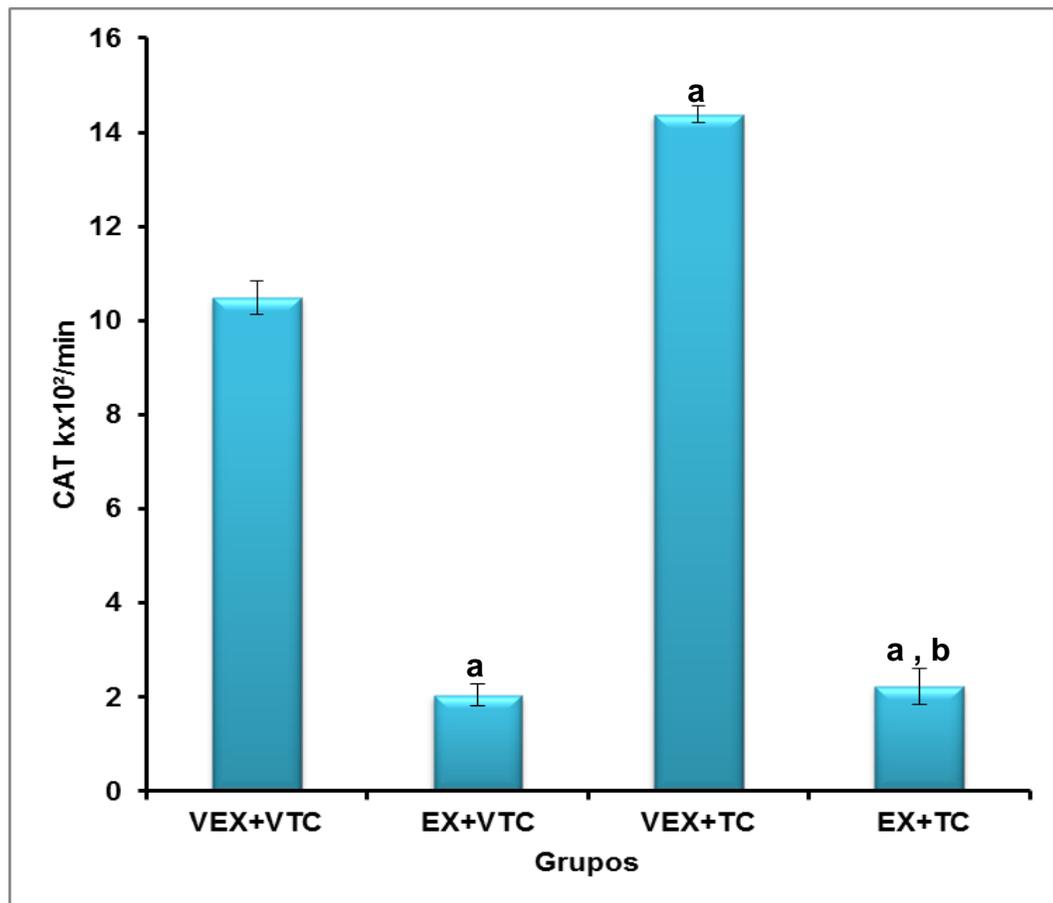


Figura 14. Catalasa (indicador de funcionalidad hepática y estrés oxidativo). Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos \pm EE. “a” indica la diferencia significativa con respecto al grupo VEX+VTC; “b” indica la diferencia significativa con respecto al grupo VEX+TC, con una $P < 0.05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls.

- Nivel de glucógeno.** Se observó una baja ostensible en la cantidad de glucógeno en el grupo cirrótico (VEX+TC), pero el efecto del agente hepatotóxico fue abolido por la administración del extracto (EX+TC) ya que el nivel de glucógeno de este grupo se mantiene sin diferencia significativa con respecto al grupo testigo (VEX+VTC).

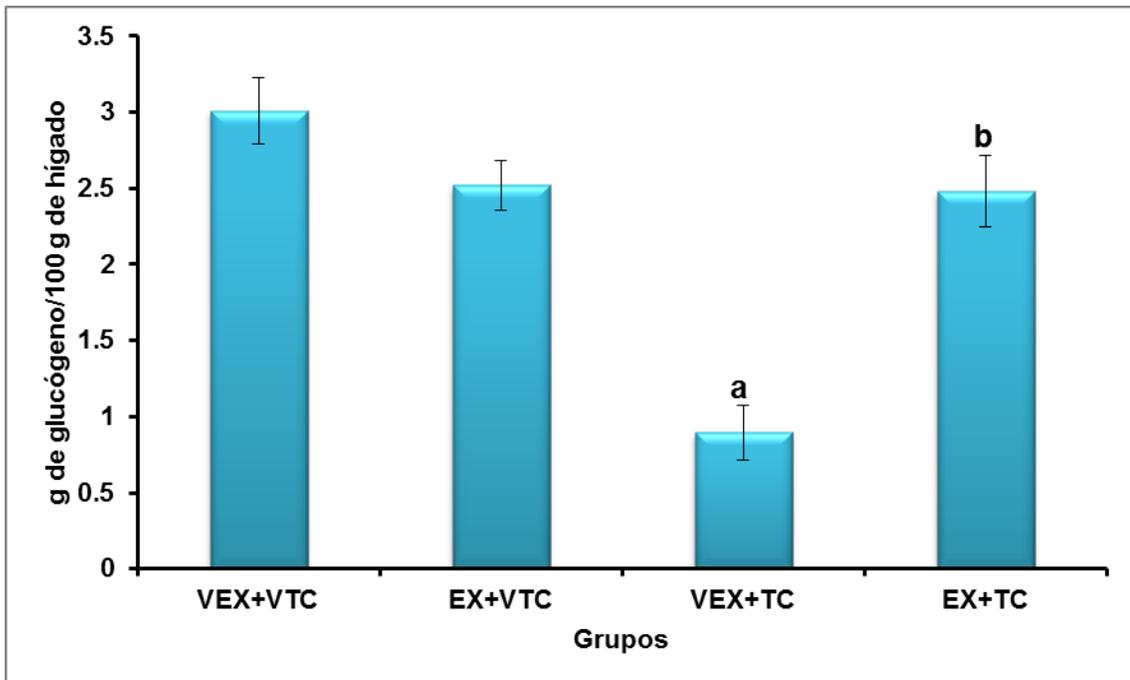


Figura 15. Niveles de glucógeno (indicador de funcionalidad hepática). Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos \pm EE. “a” indica la diferencia significativa con respecto al grupo VEX+VTC; “b” indica la diferencia significativa con respecto al grupo VEX+TC, con una $P < 0.05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls.

- Cuantificación de colágena.** En este caso, es evidente que hay un aumento de colágena en el grupo cirrótico (VEX+TC), ya que ésta se eleva al cuádruple del valor del grupo control (VEX+VTC). Asimismo, se observa que la administración simultánea del TC con el EX, previene totalmente la aparición de fibrosis, ya que el nivel de colágena del grupo VEX+VTC es muy similar al cuantificado en el grupo reto (EX+TC) así como al nivel del grupo control de extracto (EX+VTC), es decir, ambos tienen valores casi idénticos al grupo VEX+VTC; estos resultados sugieren que además de actividad anticoléstatía, el EX tiene también un efecto antifibrótico y antioxidante.

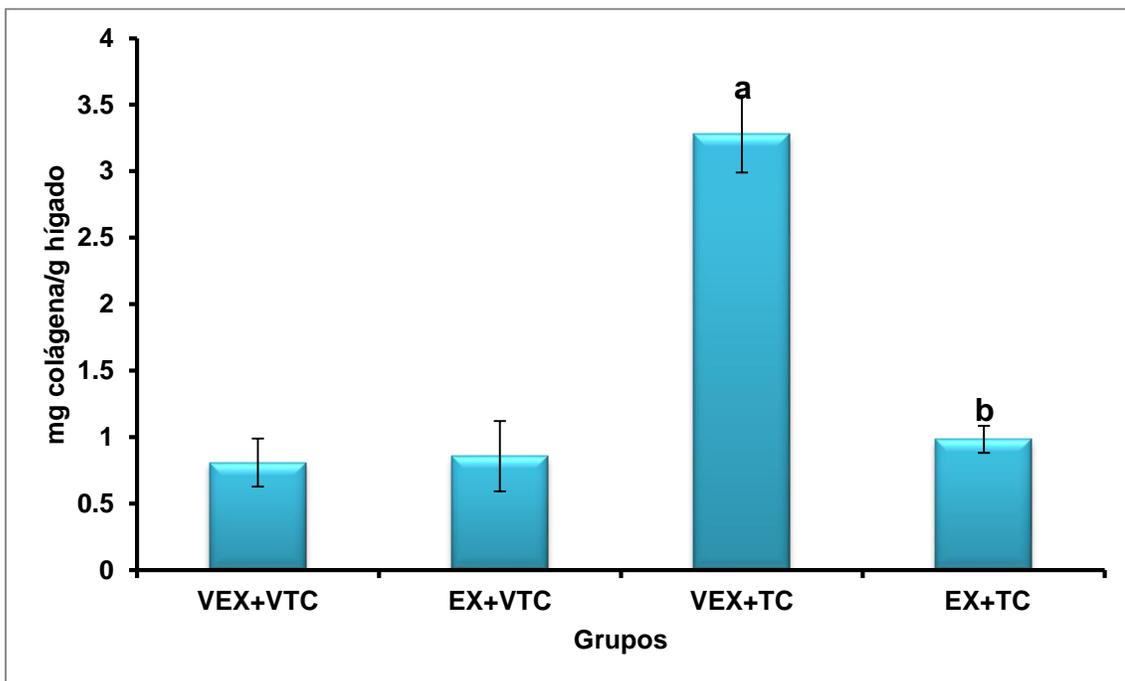


Figura 16. Colágena (indicador de fibrosis). Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos \pm EE. “a” indica la diferencia significativa con respecto al grupo VEX+VTC; “b” indica la diferencia significativa con respecto al grupo VEX+TC, con una $P < 0.05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls.

Los resultados resumidos de los marcadores bioquímicos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Promedio de la actividad enzimática y de los niveles de glucógeno, bilirrubinas totales, colágena y lipoperoxidación de cada grupo tratado.

Marcador	VEX+VTC	EX+VTC	VEX+TC	EX+TC
FA ($\mu\text{mol/L.min}$)	274.27 \pm 22.39	243.49 \pm 16.42	404.61 \pm 16.73 ^a	286.38 \pm 23.97 ^b
GGTP ($\mu\text{mol/L.min}$)	11.02 \pm 1.04	9.02 \pm 1.15	15.59 \pm 0.60 ^a	11.09 \pm 1.62 ^b
BT ($\mu\text{mol/L}$)	1.15 \pm 0.23	0.87 \pm 0.20	2.86 \pm 0.35 ^a	1.66 \pm 0.55 ^b
ALT ($\mu\text{mol/L.min}$)	20.86 \pm 2.16	19.64 \pm 1.57	47.82 \pm 3.36 ^a	19.51 \pm 0.98 ^b
LP (nmol MDA/g prot.)	0.33 \pm 0.05	1.17 \pm 0.09 ^a	1.60 \pm 0.15 ^a	0.90 \pm 0.08 ^{a,b}
CAT ($\text{K}\times 10^2/\text{min}$)	10.48 \pm 0.34	2.04 \pm 0.23 ^a	14.37 \pm 0.18 ^a	2.22 \pm 0.38 ^{a,b}
Glucógeno (g/100 g hígado)	3.01 \pm 0.21	2.52 \pm 0.16	0.89 \pm 0.17 ^a	2.47 \pm 0.23 ^b
Colágena (mg/g hígado)	0.80 \pm 0.18	0.85 \pm 0.26	3.28 \pm 0.29 ^a	0.98 \pm 0.10 ^b

Promedio de cada grupo \pm EE. “a” indica diferencia significativa con respecto al grupo VEX+VTC; “b” indica diferencia significativa con respecto al grupo VEX+TC, con una $P < 0.05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls.

8.2 Análisis histológico.

En este análisis se observó la diferencia en el tejido de cada grupo tratado. El grupo control de controles (VEX+VTC), (Figura 17-A) muestra el tejido hepático sano, se observa la vena central (eritrocitos dentro del vaso), los hepatocitos están bien definidos, se distingue claramente el núcleo y se aprecian los sinusoides hepáticos; el tejido hepático se encuentra íntegro y por lo tanto se observa homogéneo.

El grupo control de extracto (EX+VTC), (Figura 17-B) muestra un daño ligero donde alrededor de la vena central, se observa microvacuolización, necrosis balonizante ligera, el comienzo de migración celular y una congestión vascular leve. Cabe mencionar que este daño es únicamente en la zona pericentrilobulillar, ya que en diferentes zonas el tejido hepático no muestra ninguna alteración, lo que podría correlacionarse con el incremento de la LP en el grupo.

En el grupo dañado (VEX+TC), (Figura 17-C) se observó el tejido deteriorado, el daño incluye inflamación, megavacuolización, necrosis balonizante, vaciamiento citosólico, migración celular, picnosis y congestión vascular. El daño se extiende por el tejido, no está limitado a zonas pericentrilobulillares. Estos resultados muestran la destrucción del tejido hepático que evidencia el estrés oxidativo provocado por la administración constante y crónica del TC.

En el grupo reto (EX+TC) (Figura 17-D), se observó muerte balonizante, microvacuolización, algunas células con vaciamiento citosólico y algunas células en migración alrededor de la vena central; sin embargo, es evidente que el extracto protegió parcialmente el tejido hepático, ya que no se observó fibrosis importante, ni inflamación, ni un daño extendido y marcado como el grupo tratado únicamente con TC. El daño en este grupo, igual que el grupo control de extracto, se limita a zonas pericentrilobulillares. Se puede observar que el tejido de zonas alejadas a la vena central, se conserva sin daños.

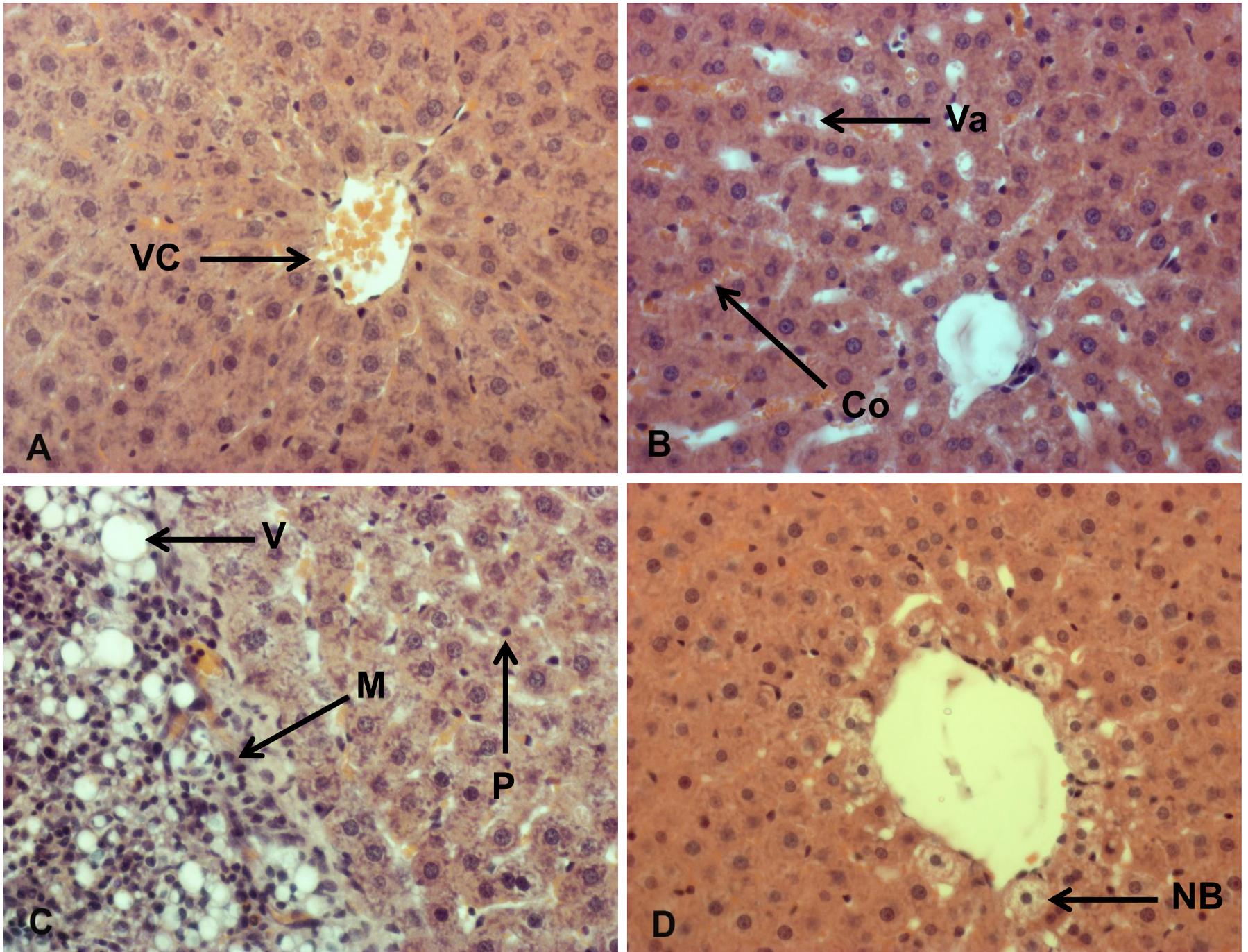


Figura 17. Panel de resultados histológicos con tinción de Hematoxilina/Eosina. Grupos: A) VEX+VTC B) EX+VTC C) VEX+TC D) EX+TC. Vena Central (VC), vacuolización (V), picnosis (P), vaciamiento citosólico (Va), necrosis balonzante (NB), congestión vascular (Co), migración celular (M).

9. DISCUSIÓN.

El efecto hepatoprotector mostrado por *C. vulgare*, según los autores mencionados anteriormente, podría atribuirse a la presencia de flavonoides atrapadores de radicales libres que se hallan en diferentes especies del género *Cirsium* que evitan el estrés oxidativo. Esta propuesta es reforzada con base en un estudio donde se demuestra la actividad antioxidante de *C. vulgare* en un extracto metanólico (Nazaruk, 2008).

El papel de los flavonoides está relacionado con su estructura química y la variación química presente en la estructura básica, el grado de polimerización y el tipo de conjugación (Liu *et al.*, 2007). A pesar de que la mayoría de los componentes identificados de *C. vulgare*, son polares o poco polares (Nazaruk, 2008; Kozyra *et al.*, 2009; Kozyra y Glowniak, 2013), las investigaciones realizadas utilizando disolventes no polares para la extracción, como en el caso de los extractos hexánicos de *C. ehrenbergii* y *C. vulgare* (Fernández-Martínez *et al.*, 2007; Jiménez-Santana, 2010; Alvarado-Baca, 2012), el extracto hexánico de *C. pascuarensis* (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2001) y la investigación presente, muestran que los componentes de polaridad baja o nula de *C. vulgare* y otras especies del género, también tienen efectos benéficos; se sugiere que podrían haber sido extraídos algunos componentes polares o poco polares debido a diferentes causas durante la extracción, por ejemplo; el tiempo de extracción, la temperatura del reflujo y el hecho de que la materia orgánica se encuentre molida, lo cual, amplía el área superficial de la extracción.

En esta investigación, los marcadores bioquímicos mostraron que el extracto tiene una actividad hepatoprotectora contra la cirrosis generada por el tetracloruro de carbono. Así con respecto a los marcadores de colestasis tales como la actividad enzimática de fosfatasa alcalina y gamma-glutamil transpeptidasa, el incremento de estas enzimas membranales en los grupos cirróticos se debe a que, al presentar colestasis, estas enzimas son liberadas a suero (Kaplan, 1993; Muriel, 1998), los incrementos leves pueden verse en cirrosis y hepatitis (Méndez-Sánchez y Uribe, 2003); la elevación de FA sin GGTP es característica de la colestasis intrahepática recurrente y la enfermedad de Byler (Méndez-Sánchez y Uribe, 2003); asimismo, el síntoma más evidente de colestasis, es el incremento en el nivel de ácidos biliares séricos (Kuntz y Kuntz, 2006).

Otro marcador de colestasis es la bilirrubina que es el producto de degradación de los glóbulos rojos. Los valores elevados de bilirrubina sérica se relacionan con anomalías en la función hepática e indican presencia de un daño y es un factor pronóstico en padecimientos crónicos (Méndez-Sánchez y Uribe, 2003); por lo anterior, también se cuantificó el nivel de bilirrubinas totales como marcador de colestasis. En esta investigación se observó que la administración del extracto hexánico de *C. vulgare* en el grupo cirrótico disminuyó significativamente el nivel de estos tres marcadores, lo que coincide con los resultados observados con *C. vulgare* (250 y 500 mg/kg) pero en un modelo de daño agudo con TC y el extracto hexánico de *C. ehrenbergii* (300 mg/kg) en un modelo de daño crónico con el mismo hepatotóxico que tienen el mismo efecto anticoléstatco (Jiménez-Santana, 2010; Alvarado-Baca, 2012). Los resultados obtenidos en los tres marcadores de colestasis, sugieren que el extracto no polar, posee propiedades anticoléstatcas, de forma similar a los resultados de la evaluación de los extractos polares de varias plantas del mismo género, como se ha comentado anteriormente. Más aún, metabolitos polares como gliconas de flavonoides extraídos con metanol de *Trichosanthes cucumerina* también muestran un efecto anticoléstatco (Kumar *et al.*, 2009), por la posible actividad como colagogos de estos compuestos, esto sugiere que compuestos similares en el género *Cirsium* podrían tener ese efecto; de hecho los tipos de metabolitos secundarios de *C. vulgare* y del género se comentaron en la fracción de antecedentes (ver pág. 30).

Las enzimas ALT y AST son los indicadores de necrosis más utilizados, los niveles enzimáticos elevados reflejan la extensión de la necrosis; hay una elevación discreta en cirrosis, colestasis y neoplasias hepáticas (Méndez-Sánchez y Uribe, 2003). Como indicador de necrosis, se midió la actividad enzimática de ALT, la aparición de esta enzima citosólica en plasma se asocia con daño celular que implica un aumento en la permeabilidad de la membrana o destrucción celular, lo que permite la liberación de la enzima (Muriel, 1998). El extracto hexánico de *C. vulgare* disminuyó significativamente la actividad enzimática de ALT en suero, esto sugiere actividad antinecrótica del extracto; nuevamente, éste pero con dosis de 250 y 500 mg/kg también muestra la prevención de necrosis en un daño agudo (Jiménez-Santana, 2010). El extracto

hexánico de otras especies del género como *C. ehrenbergii* (300 mg/kg) también previno la aparición de necrosis en un daño crónico por TC (Alvarado-Baca, 2012). El mismo efecto se muestra en los marcadores ALT y AST en la evaluación de extractos polares de otras especies, por ejemplo, en los estudios de extractos metanólicos de *C. setidens* y *Trichosanthes cucumerina*, daño por D-galactosamina y TC respectivamente (Yoo *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2009), y del extracto acuoso de *C. arisanense*, daño provocado por tacrina (Ku *et al.*, 2008). El efecto antinecrótico posiblemente se debe a la presencia de metabolitos atrapadores de radicales libres, que evitan el daño en las membranas de los hepatocitos y, en consecuencia, la muerte celular provocada por el estrés oxidativo generado por agentes hepatotóxicos.

Los lípidos componentes de las membranas son esenciales para el sistema de soporte de toda la célula, la destrucción de sus propiedades estructurales puede tener consecuencias fatales para las funciones celulares. La peroxidación de lípidos ha sido considerada como el efecto principal de los radicales libres (Muriel, 1996). La medición de lipoperoxidación mediante TBARS, indica el daño membranal en los hepatocitos. En este marcador se observó un incremento en el daño oxidativo con el extracto mismo; sin embargo, el extracto mostró una evidente protección contra el daño por TC, ya que no se observó un efecto sinérgico e incluso lo disminuye más. Este resultado es similar al observado al administrar el extracto hexánico de *C. ehrenbergii* en una dosis de 500 mg/kg que es mayor a la dosis utilizada en esta investigación (Jiménez-Santana, 2010). A diferencia de ello, al administrar el extracto hexánico de *C. ehrenbergii* en una dosis de 300 mg/kg de forma crónica no se muestra este incremento en la peroxidación lipídica (Alvarado-Baca, 2012); asimismo, en otros estudios con especies del género como el extracto metanólico de *C. japonicum* en dosis de 250 y 500 mg/kg y daño inducido con etanol tampoco se evidencia una elevación del daño membranal (Park *et al.*, 2004). Como ya se ha hecho hincapié, la protección contra la peroxidación lipídica puede atribuirse a la presencia de metabolitos antioxidantes en los extractos ya que éstos son compuestos que tienen la capacidad de evitar el estrés oxidativo atrapando radicales libres y, por lo tanto, evitan el daño a las membranas celulares, esto sugiere que la elevación ligera de la LP por el extracto, podría ser ocasionada por el mismo

contenido de antioxidantes que son moléculas reactivas y en dosis suficiente comienzan a reaccionar con los lípidos insaturados de las membranas, por el contrario, al administrar el extracto y el TC, los antioxidantes contenidos en el extracto reaccionan con los radicales triclorometil formados por el metabolismo del tetracloruro de carbono, así entonces hay un equilibrio que puede inhibir el daño de las membranas celulares (Recknagel *et al.*, 1989; Muriel, 1996).

La catalasa es una enzima que degrada el peróxido de hidrógeno y éste es un compuesto altamente oxidante, por lo que esta medición es un indicador de estrés oxidativo; ante la presencia del daño hepático crónico la actividad de catalasa disminuye por su síntesis a la baja en el hígado enfermo y, por ende, un incremento de ROS y radicales libres, lo cual se ve reflejado por la acumulación de peróxido de hidrógeno. La presencia de antioxidantes protege al hígado contra las ROS, y se ha reportado un incremento en la actividad de catalasa en ratas dañadas por ligadura del conducto biliar; sin embargo, al proporcionar un tratamiento con trolox (análogo de vitamina E) y en respuesta al daño, la actividad de catalasa aumenta considerablemente entonces disminuye el nivel de peróxido de hidrógeno (Galicia-Moreno *et al.*, 2011). Los resultados aquí obtenidos son similares a lo esperado, ya que aumentó la actividad de catalasa en respuesta al daño; aunque, el extracto por sí mismo y al ser administrado junto con el TC, disminuyó considerablemente el nivel en este marcador. Estos resultados podrían sugerir una inhibición probable de la enzima causada por algún componente de la planta presente en el extracto, es por ello que, en esta prueba no se obtuvo una respuesta clara sobre su actividad antioxidante debido al enmascaramiento probable del extracto *per se*. Sin embargo, con base en el resto de las pruebas realizadas, es posible proponer que el extracto sí posee un efecto hepatoprotector.

El hígado, lleva a cabo funciones de síntesis, depósito y catabolismo del glucógeno, que es su principal fuente de energía, por lo tanto la cantidad de éste es un buen indicador de funcionalidad hepática y estrés, al disminuir rápidamente durante el daño (Muriel, 1998; Guyton y Hall, 2009). Al administrar un hepatotóxico como el TC, el nivel del glucógeno disminuye significativamente e incluso llega a agotarse (Muriel, 1998); el

extracto de *C. vulgare* mantuvo los niveles de glucógeno durante el daño cónico por TC. La prevención del daño también se ha observado con la administración del mismo extracto pero en dosis de 250 y 500 mg/kg durante el daño agudo, así como el mismo extracto de otras especies como *C. ehrenbergii* durante la cirrosis, ambos inducidos por TC (Jiménez-Santana, 2010; Alvarado-Baca, 2012). La protección contra este daño, también puede estar relacionada con los metabolitos presentes en las plantas que evitan el estrés oxidativo y por lo tanto, el hígado está protegido contra la aparición de necrosis y fibrosis, es entonces como se logra mantener la estructura anatómica y la funcionalidad hepática.

La fibrosis, es el resultado de un daño crónico en el hígado; esta enfermedad se caracteriza por la activación de las HSC y la producción excesiva de matriz extracelular (principalmente de colágena I, III y IV) en respuesta a la destrucción de las células hepáticas (Muriel, 2009; Galicia-Moreno *et al.*, 2011). Este trastorno constituye una de las características distintivas de algunos padecimientos crónicos como la hepatitis crónica y la cirrosis y, por lo tanto, el término fibrosis es empleado para describir el aumento de la cantidad absoluta de colágena en el hígado (Méndez-Sánchez y Uribe, 2003). Como se comentó anteriormente, el extracto hexánico de *C. vulgare* evitó la acumulación de colágena en el hígado; similarmente, se observa este efecto con otros extractos y con diferentes dosis, como el extracto hexánico de *C. ehrenbergii*, en una dosis de 300 mg/kg, en el daño crónico por TC (Alvarado-Baca, 2012). Estos resultados exhiben que el extracto posee propiedades antifibróticas. La liberación de radicales libres y de citocinas profibrogénicas induce la activación de las HSC, la modulación farmacológica de estas citocinas y de sus vías intracelulares atenúa la progresión de la fibrosis en modelos experimentales diversos al evitar la acumulación de HSC activadas en el hígado (Méndez-Sánchez y Uribe, 2003), por lo tanto, las propiedades antifibróticas del extracto, se deben probablemente a la presencia de componentes que le confieren a la planta dicha propiedad moduladora ya que existen reportes de diferentes compuestos vegetales que exhiben propiedades inmunomoduladoras; algunos de ellos son flavonoides glucósidos, ácidos fenólicos, esteroides, alcaloides y

terpenoides (Patwardhan y Gautman, 2005). Además la manutención del efecto antioxidante disminuye las condiciones profibrogénicas.

En el análisis histológico, se reflejó el resultado obtenido por los marcadores bioquímicos, el deterioro del tejido es evidente en animales cirróticos y es notable, aunque en menor grado, en los grupos control de extracto y grupo reto en comparación con el tejido íntegro observado en animales sanos. El daño ligero observado en el grupo control de extracto concuerda con los resultados obtenidos en el marcador de lipoperoxidación que, como se mencionó anteriormente, puede ser debido a un exceso de antioxidantes reactivos que provocan estrés oxidativo en la dosis administrada crónicamente. Cabe mencionar que este deterioro incluye principalmente, daño en zona pericentrilobulillar, necrosis balonizante y vacuolización, aunque en diferentes proporciones según el grupo tratado. La necrosis en zona pericentrilobulillar, es considerada la causa principal de la inducción de un daño agudo con tetracloruro de carbono, pero también puede ser causada por fármacos y toxinas (Shi *et al.*, 1998). En este trabajo se observó daño en zona pericentrilobulillar, tanto en el grupo control de extracto como en el grupo reto, aunque el daño no se observó tan marcado y extendido como en el grupo cirrótico, sino limitado a esta zona. El daño pericentrilobulillar puede atribuirse a que algunos fármacos y sustancias, como el tetracloruro de carbono son metabolizados en la zona central del hígado (Porth, 2007). En el tejido hepático también se observó necrosis balonizante, ésta es uno de los primeros y más frecuentes cambios observados en un daño inducido por CCl₄; también se observa en algunas otras condiciones como infecciones virales, hepatitis causada por el consumo de alcohol y obstrucción de los conductos biliares (Shi *et al.*, 1998). En un daño persistente, donde el estancamiento de bilis es prolongado, la necrosis incrementa y esto produce inflamación hepática que ocasiona fagocitosis por las células Kupffer (Pérez-Tamayo y López-Corella, 2007), debido a esto en el grupo cirrótico se observa claramente la migración celular hacia las zonas con mayor destrucción celular. Es así como se confirma la protección parcial pero significativa del extracto contra el daño crónico inducido por TC en los marcadores bioquímicos de daño.

El daño observado en los diferentes marcadores y en las muestras de tejido hepático de ratas cirróticas, fue inducido por la administración crónica del TC; el fundamento de este modelo de daño es el estrés oxidativo que provoca, debido a que al ser metabolizado por el citocromo P-450 forma el radical libre triclorometil, que es altamente oxidante; puede obtener un átomo de hidrógeno de la membrana lipídica para producir cloroformo (CHCl_3) o reaccionar con oxígeno formando un radical triclorometil-peroxilo e iniciar la peroxidación lipídica (Recknagel *et al.*, 1989). Como se mencionó anteriormente este efecto es inhibido por antioxidantes, cuya actividad atrapadora de radicales libres, les confiere la capacidad de evitar el estrés oxidativo y, por lo tanto, el efecto protector sobre las membranas celulares y la cascada de eventos deletéreos (Muriel, 1996). Finalmente, el extracto hexánico de las inflorescencias de *C. vulgare* posee efecto hepatoprotector preventivo en la cirrosis inducida por TC en rata.

10. CONCLUSIONES.

- El extracto hexánico de la inflorescencia de *C. vulgare*, en una dosis de 300 mg/kg, tiene efectos antifibrótico, antinecrótico y anticolestático, además de mantener la funcionalidad hepática; por lo tanto se evidenció un efecto preventivo hepatoprotector que se corroboró en el análisis histológico. Incluso en la peroxidación lipídica, donde existe un alza *per se* por el extracto, cuando se administra éste junto con el TC, el estrés oxidativo disminuye.
- La administración del extracto disminuye los marcadores de funcionalidad hepática y estrés oxidativo durante el desarrollo de la cirrosis, a pesar de elevar la peroxidación lipídica por sí mismo, lo que sugiere un mecanismo de acción hepatoprotector.
- Con base en las investigaciones referidas en el cuerpo de esta tesis, es posible proponer que *C. vulgare* contiene diferentes metabolitos secundarios con actividad antioxidante, aun en el extracto hexánico; por lo tanto, esta planta posee un efecto preventivo hepatoprotector en este modelo de cirrosis experimental provocado por estrés oxidativo.

11. PERSPECTIVAS.

Debido a que el efecto observado en algunos marcadores aquí utilizados, se sugiere que para un trabajo posterior se determine nuevamente el grado de lipoperoxidación además de la determinación de otros marcadores de funcionalidad hepática y estrés oxidativo tales como óxido nítrico y la cuantificación de citocinas relacionadas al daño hepático. También resultaría conveniente realizar nuevamente la medición de la actividad enzimática de catalasa, debido a que los resultados obtenidos no son congruentes con reportes previos sobre el comportamiento de dicha enzima; o bien, se recomienda realizar la prueba del extracto puro sobre la enzima aislada. Además se sugiere realizar un estudio con el extracto estandarizado utilizando varias dosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Alvarado-Baca M. 2012. Evaluación del efecto hepatoprotector del extracto hexánico de la inflorescencia de *Cirsium ehrenbergii* (Asteraceae) en un modelo de cirrosis experimental en rata. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Mineral de la Reforma. 83.
- Berger L. Rudolph G. 1967. Alkaline phosphatase. Standard methods of clinical chemistry, Ed. Meites Academic Press; 5: 211-21.
- Bergmeyer H. *et al.* 1983. Enzymes, En: Methods of enzymatic analysis de Bergmeyer H y Grabl M., Ed. Verlag-chimie Weinheim, Alemania; 269-70.
- Borawska M. *et al.* 2010. Enhancement of antibacterial effects of extracts from *Cirsium* species using sodium picolinate and estimation of their toxicity. Natural Products Research; 24 (10): 554-61.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein dye binding, Analytical Biochemistry; 72: 248-54.
- Buege J. A. Austin S. D. 1978. Methods in Enzymology; 52: 302-10.
- Calderón de Rzedowski G. Rzedowski J. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. Segunda Edición. Instituto de Ecología, A.C. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO). México. 1406.
- Cohen G. *et al.* 1969. Measurement of Catalase Activity in Tissue Extracts. Analytical Biochemistry; 34: 30-8.
- Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO). Referencia en línea <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/cirsiumvulgare/fichas/ficha.htm> (2009, consultado en Mayo del 2011). Recuperado.

- Csupor-Löffler B. *et al.* 2009. Antiproliferative activity of Hungarian Asteraceae species against human cancer cell lines. Part II. *Phytoterapy*; 23: 1109-15.
- Drake R. *et al.* 2007. *Anatomía para estudiantes*. Primera Edición. Elsevier. España. 1058.
- Farnsworth N. R. Soejarto D. D. 1991. Global importance of medicinal plants en: Akereke O., Heywood V.H., Syngé H. (Eds). *The conservation of medicinal plants*. Cambridge University Press. US. 25-50.
- Fernández-Martínez E. *et al.* 2007. Preliminary Phytochemical and Biological Study of *Cirsium ehrenbergii*. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*; 50: 162-4.
- Fortoul T. Castell A. 2010. *Histología y biología celular*. Primera Edición. Mc Graw Hill/interamericana. México. 307.
- Fox S. 2008. *Fisiología Humana*. Décima Edición. Mc Graw Hill/interamericana. España. 775.
- Galicia-Moreno M. *et al.* 2013. Trolox mitigates fibrosis in a bile duct ligation model. *Fundamental and Clinical Pharmacology*; 27: 308-18.
- Ganzera M. *et al.* 2005. Differentiation of *Cirsium japonicum* and *C. setosum* by TLC and HPLC-MS. *Phytochemical Analysis*; 16: 205-9.
- Geneser F. 2008. *Histología. Sobre bases biomoleculares*. Tercera Edición. Médica Panamericana. Argentina. 813.
- Glossman M. Neville D. 1972. Glutamyl transferase in kidney brush border membranes. *Federation of European Biochemical Societies Letters*; 19: 340-4.
- Guyton A. C. Hall J. E. 2009. *Tratado de Fisiología Médica*. Octava Edición. University of Mississippi Medical Center. US. 1063.

- Halevy H. A. 1989. Handbook of flowering Vol. VI. Primera Edición. CRC Press. US. 776.
- Jiménez-Santana M. 2010. Evaluación de las propiedades hepatoprotectoras de los extractos hexánicos florales de *Cirsium vulgare* y *Cirsium ehrenbergii* en un modelo de daño hepático agudo inducido con CCl₄ en rata. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Mineral de la Reforma. 71.
- Kaplan M. 1993. Capítulo 4: Laboratory Tests en Diseases of the Liver. J.B Lippincott Company. US. 108-44.
- Kozyra M. *et al.* 2009. GC/MS analysis of the essential oil isolated from the herb of *Cirsium vulgare* (Savi.) Ten. and its antimicrobial activity. Annales Universitatis Marie Curie-Sklodowska Lublin; 22 (4): 149-54.
- Kozyra M. Glowniak K. 2013. Phenolic acids in extracts obtained from the flowering herbs of *Cirsium vulgare* (Savi) Ten. growing in Poland. Acta Societatis Botanicorum Poloniae; 82 (4): 325-9.
- Ku K. *et al.* 2008. Hepatoprotective Effect of *Cirsium arisanense* Kitamura in tacrine-treated hepatoma Hep 3B cells and C57BL mice. The American Journal of Chinese Medicine; 36 (2): 355-68.
- Kumar S. *et al.* 2009. Hepatoprotective effect of *Trichosantes cucumerina* Var *cucumerina* L. on carbon tetrachloride induced liver damage in rats. Journal of Ethnopharmacology; 123: 347-50.
- Kuntz E. Kuntz H. D. 2006. Hepatology: principles and practice. Second Edition. Springer Medizin Verlag Heidelberg. Germany. 906.
- Lee W. *et al.* 2002. Phytochemical constituents of *Cirsium setidens* Nakai and their cytotoxicity against human cancer cell lines. Archives of Pharmacal Research; 25 (5): 628-35.

- Lee S. *et al.* 2008. Antioxidant and Hepatoprotective Activities of *Cirsium setidens* NAKAI against CCl₄ – Induced Liver Damage. *The American Journal of Chinese Medicine*. 36:107-14.
- Lippert H. 1999. Anatomía. Primera Edición. Marbán libros. España. 822.
- Liu S. *et al.* 2007. Anticancer activity and quantitative analysis of flavone of *Cirsium japonicum* DC. *Natural Products*; 21 (10): 915-22.
- Méndez-Sánchez N. Uribe M. 2003. Conceptos Actuales en Hepatología. Primera Edición. Masson Doyma. México. 475.
- Muñeton P. 2009. Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. Entrevista con el Mtro. Erick Estrada Lugo. *Revista Digital Universitaria* (en línea). Universidad Nacional Autónoma de México; 10 (9).
- Muriel P. 1996. Capítulo 14: Peroxidation of lipids and liver damage en oxidants, antioxidants and free radicals en Baskin S.I., Salem H. Ed. Taylor and Francis, Pennsylvania. 237-57.
- Muriel P. 1998. Nitric oxide protection of rat liver from lipid peroxidation, collagen accumulation, and liver damage induced by carbon tetrachloride. *Biochemical Pharmacology*; 56: 773-9.
- Muriel P. 2009. Role of free radicals in liver diseases. *Hepatology International*; 3: 526-36.
- National Institute of Health. 1985. Care and Use of Laboratory Animals; 86-23.
- Nazaruk J. 2008. Antioxidant activity and total phenolic content in *Cirsium* five species from north-east region of Poland. *Fitoterapia*; 79: 194-6.
- Nazaruk J. 2009. Flavonoids compounds from *Cirsium palustre* (L.) Scop. flower heads. *Biochemical Systematics and Ecology*; 37: 525-7.

- Nazaruk J. Jakoniuk P. 2005. Flavonoid composition and antimicrobial activity of *Cirsium rivulare* (Jacq.) All. flowers. *Journal of Ethnopharmacology*; 102: 208-12.
- Park J. *et al.* 2004. Effects of Methanol Extract of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* and its Principle, Hispidulin-7-O-Neohesperidoside on Hepatic Alcohol-metabolizing Enzymes and Lipid Peroxidation in Ethanol-treated Rats. *Phytotherapy*; 18: 19-24.
- Patwardhan B. Gautam M. 2005. Botanical immunodrugs: scope and opportunities. *Drug Discovery Today*; 10 (7): 495-502.
- Pérez-Escandón B. E. *et al.* 2003. Lista de las Plantas útiles del estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 133.
- Pérez-Gutiérrez R. M. *et al.* 2001. Effect of *Cirsium pascuarensis* on Blood Glucose Levels of Normaglycaemic and Alloxan – diabetic Mice. *Phytotherapy Research* 15: 552-4.
- Pérez-Tamayo R. López-Corella E. 2007. Principios de Patología. Cuarta Edición. Médica Panamericana. México. 206-20.
- Porth C. M. 2007. Fisiopatología, salud-enfermedad: un enfoque conceptual. Séptima Edición. Médica Panamericana. Argentina. 917-46.
- Recknagel R. O. *et al.* 1989. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacology & Therapeutics*; 43:139-54.
- Reitman S. Frnkl S. A. 1978. A colorimetric for the determination of serum glutamic oxaloacetic pyruvic and glutamic pyruvic transminases. *American Journal of Clinical Pathology*; 28: 56-63.
- Robbins S. L. *et al.* 1995. Patología estructural y funcional. Quinta Edición. Interamericana, McGraw-Hill. España. 1486.
- Rojkind M. González E. 1974. An improved method for determining special radioactivities of proline and hydroxyproline. *Analytical Biochemistry*; 57: 1-7.

- Seifter S. *et al.* 1950. The estimation of glycogen with the reagent. Archives of Biochemistry; 25: 191.
- Selema de la Morena G. Martínez-Pérez J. 1999. Efecto hepatoprotector inducido por el flavonoide Astilbina frente a un modelo animal tratado con tetracloruro de carbono. Revista Cubana de Plantas Medicinales; 1 (4): 36-9.
- Shi J. *et al.* 1998. Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after administration of carbon tetrachloride. American Journal of Pathology; 153: 515-25.
- Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS). Referencia en línea, <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/index.htm> (2008, consultado el 24 de Septiembre del 2014). Recuperado.
- Soon-Ho Y. *et al.* 2003. A polyacetylene and flavonoids from *Cirsium rhinoceros*. Archives of Pharmacal Research; 26 (2): 128-31.
- Stryer L. *et al.* 2004. Bioquímica. Quinta Edición. Reverte. España. 974.
- Sun F. *et al.* 2003. Evaluation of oxidative stress during apoptosis and necrosis caused by D-galactosamine in rat liver. Biochemical Pharmacology; 65: 101-7.
- Villavicencio-Nieto M. A. Pérez-Escandón B. E. 1995. Plantas útiles del estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 125.
- Villavicencio-Nieto M. A. *et al.* 2002. Plantas útiles del estado de Hidalgo II. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 247.
- Villavicencio-Nieto M. A. Pérez-Escandón B. E. 2005. Guía de la flora útil de la Huasteca y la zona Otomí-Tepehua, Hidalgo I. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 171.
- Villavicencio-Nieto M. A. Pérez-Escandón B. E. 2006. Plantas útiles del estado de Hidalgo III. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 229.

Woodman D. 1988. Assessment of Hepatic Function and Damage in Animal Species. *Journal of Applied Toxicology*; 8 (4): 249-54.

Yoo Y. *et al.* 2008. Pectolinarin and pectolinarigenin of *Cirsium setidens* prevent hepatic injury in rats caused by D- galactosamine *via* an Antioxidant Mechanism. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*; 31 (4): 760-4.

ANEXO 1. GLOSARIO.

Alcaloides. Metabolitos secundarios que contienen nitrógeno, son alcalinos, están cargados positivamente y generalmente son solubles en agua. Se sintetizan normalmente a partir de algunos aminoácidos como lisina, tirosina y triptófano.

Apoptosis. La apoptosis o muerte celular programada es un proceso que requiere energía y está controlado genéticamente; se desencadena en determinadas circunstancias y conduce a la muerte celular. Este proceso tiene especial importancia en el desarrollo del aparato inmunitario. También, es resultado de este proceso la muerte celular regulada de las poblaciones celulares renovables.

Catequina. Sustancia activa de algunas plantas (por ejemplo *Uncaria gambir*). Este componente es fácilmente absorbido y rápidamente degradado por el hígado. Se ha demostrado que incrementa la concentración de ATP en el hígado e inhibe la peroxidación lipídica.

Colagogo. Sustancia que actúa sobre la vesícula biliar y mediante su contracción y relajación de vías biliares estimula la expulsión de bilis.

Cuerpos de Mallory. Acumulación de sustancias proteicas que se producen en los hepatocitos; se produce principalmente en la hepatitis alcohólica y cirrosis. Son masas hialinas, eosinófilas, en forma de grumos aislados o conglomerados.

Dosis. Cantidad de principio activo expresado en la unidad de toma por unidades de masa corporal que se administrará por cada vez, generalmente expresada en mg/kg.

Espacio Disse. Espacio estrecho que se encuentra entre las células endoteliales y las hepáticas. Conecta con vasos linfáticos en los tabiques interlobulillares. Contiene estelares (de Ito) y algunos fibroblastos.

Extracción por Soxhlet. Es un método de extracción de compuestos orgánicos; se lleva a cabo utilizando un solvente orgánico que refluye a través de un cartucho de celulosa, el cual contiene la materia orgánica.

Flavonoides. Son metabolitos secundarios de plantas, generalmente amarillos que se encuentran en los jugos celulares y en los pétalos de las flores de algunas plantas en forma de glucósidos de diversos azúcares (glucosa, galactosa o pentosas) y cuyos aglucones son derivados del núcleo fundamental de la fenilbenzoporina. Se han utilizado ampliamente ya que se les atribuyen diferentes efectos terapéuticos.

Hepatoprotectores. Sustancias que ayudan a proteger al hígado de daños y enfermedades.

Hidroxiprolina. Es un aminoácido presente en la colágena. Ciertos residuos de prolina de la colágena se transforman en hidroxiprolina por medio de la prolidoxilasa (una enzima que requiere para su actividad O_2 , Fe^{2+} y α -cetoglutarato, como agente reductor utiliza al ácido ascórbico) y un átomo de oxígeno se une al C-4 de la prolina.

Linfocito. Células que juegan un papel fundamental en reacciones inmunológicas. Se encuentran en la sangre y la linfa, además de aislados en el tejido conectivo y en los epitelios.

Lobulillo hepático. Es la unidad funcional básica del hígado, con forma hexagonal de unos 2 mm de longitud y un diámetro aproximado de 1 mm; está compuesto por varias láminas celulares hepáticas que irradian en forma centrífuga desde la vena central, de donde se vacía en las venas hepáticas y después en la vena cava inferior. Cada vena central tiene un espesor de una o dos células y entre las células adyacentes se encuentran pequeños conductillos biliares que se originan en los tabiques fibrosos que separan a los lobulillos hepáticos adyacentes.

Macrófagos. Desempeñan un papel muy importante en el sistema que prepara las defensas del organismo contra partículas extrañas invasoras, en especial microorganismos. Se originan a partir de los monocitos y en condiciones normales se encuentran fijos o libres y frente a una inflamación o reacción inmune se estimulan a macrófagos activados.

Malondialdehído (MDA). Producto final de la peroxidación lipídica; se forma cuando los radicales libres atacan a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y lipoproteínas transformándolos en ácidos grasos peroxidados, los cuales sufren un acortamiento de su cadena lateral liberando malondialdehído, de tal manera que la concentración sérica de MDA, es proporcional a los ácidos grasos poliinsaturados oxidados y por lo tanto un buen indicador de la peroxidación lipídica.

Monooxigenasas. La familia de monooxigenasas de función mixta, denominadas citocromo P-450, constituye el principal sistema enzimático de las reacciones de biotransformación de medicamentos. Este término engloba a un grupo de hemoproteínas que, al combinarse en su estado reducido (ferroso) con el monóxido de carbono, forma un complejo de color rosa con picos de absorbancia máxima de aproximadamente 450 nm (447-452 nm).

Necrosis. (gr. *nekros*, cadáver) designa la muerte celular de células aisladas o, más a menudo, de grupos celulares del organismo vivo. Se debe a una acción lesiva, que puede ser un simple traumatismo físico o químico o también por carencia de oxígeno o acción de toxinas bacterianas.

Necrosis balonizante. Es el estadio final de la degeneración balonizante, en la que las células se observan inflamadas, con citoplasma claro, vacuolizado o vacío y restos granulares perinucleares. La membrana celular no suele observarse y el núcleo aparece pálido.

Óxido nítrico. Es un compuesto que regula numerosos procesos fisiológicos, incluso la neurotransmisión, contracción del músculo liso, la reactividad plaquetaria, la actividad citotóxica en las células del sistema inmunitario y la respiración mitocondrial. Además, protege del daño hepático, sin embargo en cantidades altas puede provocar estrés oxidativo.

Picnosis. (gr. *pyknos*, densidad) se refiere a la retracción del núcleo celular hasta formar un grumo denso.

Radical libre. Molécula con un electrón desapareado en el orbital más externo. Este electrón desapareado le confiere al radical libre inestabilidad energética lo que los hace altamente reactivos.

Sinusoide hepático. Se llama sinusoides a los capilares hepáticos, en los que circula sangre de una vena a otra, falta la membrana basal y el calibre llega hasta 15 μ m. Están situados entre láminas, la sangre llega a los sinusoides desde las venas portales y de ellos pasa a la vena central. Tienen poros que facilitan el paso de proteínas hacia los espacios Disse. En general, son más grandes e irregulares que los otros capilares y poseen una pared celular muy delgada. En la pared sinusoidal se encuentran células endoteliales y macrófagos (células Kupffer).

Trato humanitario. La NOM-062-ZOO-1999, establece que los animales de laboratorio deben recibir un trato humanitario, es decir, un trato digno que contempla que el espacio, saneamiento, manejo, las condiciones ambientales y la nutrición (entre otros) deben ser adecuados con el fin de evitar el sufrimiento, tensión y/o estrés de los animales durante su manipulación.

Triada portal o de Glisson. Es una unidad compuesta por una ramificación de la arteria hepática, la vena porta y el sistema de las vías biliares; están rodeadas por tejido conectivo periportal.

Vacuolización. Formación de cavidades (vacuolas) en el citoplasma de las células.

Vitamina E. Tiene como función principal prevenir la oxidación de los lípidos poliinsaturados; en su ausencia se reduce la cantidad de grasas poliinsaturadas celulares, lo que ocasiona alteraciones de la estructura y función de organelos tales como las mitocondrias, los lisosomas e incluso la membrana celular.

ANEXO 2. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.

μL – Microlitros.

μm – Micrómetros.

μmol – Micromoles.

·CCl₃ – Triclorometil.

ALT – Alanina-aminotransferasa.

AMP_c – Adenosín Monofosfato cíclico.

AST – Aspartato - aminotransferasa.

BT – Bilirrubinas totales.

C₂H₄O – Acetaldehído.

CAT – Catalasa.

CCl₄ – Tetracloruro de carbono.

CHCl₃ – Cloroformo.

CYP P450 – Citocromo P-450.

CYP2E1 – Subfamilia del citocromo P-450.

EE – Error estándar.

EX – Extracto.

FA – Fosfatasa Alcalina.

g – Gramos.

GGTP – Gamma glutamil-transpeptidasa.

H₂O₂ – Peróxido de hidrógeno.

HE – Tinción Hematoxilina/Eosina.

HP – Hidroxiprolina.

HSC – Células estelares.

i.p. – Administración intraperitoneal.

kg – Kilogramo.

KMnO₄ – Permanganato de potasio.

L – Litro.

LP – Lipoperoxidación (peroxidación lipídica).

m – Metros.

MDA – Malondialdehído.

mg – Miligramos.

min – Minuto.

mL – Mililitros.

mm – Milímetros.

n – Tamaño del grupo.

NK – Natural Killers.

nm – Nanómetros.

p.o. – Administración oral.

RNS – Especies Reactivas de Nitrógeno.

ROS – Especies Reactivas de Oxígeno.

TBARS – Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico.

TC – Tetracloruro de carbono (CCl_4).

U – Unidades.

VEX – Vehículo del extracto.

VTC – Vehículo del tetracloruro.