



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA
SALUD

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE
LA INFLORESCENCIA DE *CIRSIIUM VULGARE* EN UN MODELO
DE REVERSIÓN DE LA CIRROSIS EN RATA”.**

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

Presenta:

BIOL. ALICIA RODRÍGUEZ PASTÉN

Director(a) de Tesis

DR. T. EDUARDO FERNÁNDEZ MARTÍNEZ

San Agustín Tlaxiaca, Hgo. 2018.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias de la Salud
School of Health Sciences
Área Académica de Medicina
Department of Medicine
Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

23/NOVIEMBRE/2017

AAM/MCBS/123/2017

Asunto: Asignación de Jurado de Examen

Alicia Rodríguez Pastén
Alumna de la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada "Evaluación del efecto del extracto hexánico de la inflorescencia de *Cirsium vulgare* en un modelo de reversión de la cirrosis en rata" con el cual obtendrá el **Grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

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

PRESIDENTE	DR. HECTOR ANTONIO PONCE MONTER
PRIMER VOCAL	DR. TOMÁS EDUARDO FERNÁNDEZ MARTÍNEZ
SECRETARIO	DR. LUIS ENRIQUE SORIA JASSO
SUPLENTE	DRA. RAQUEL CARIÑO CORTÉS
SUPLENTE	DR. MARIO ISIDORO ORTIZ RAMÍREZ

Luis Enrique Soria Jasso
Raquel Cariño Cortés
Mario Isidoro Ortiz Ramírez

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

Atentamente
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

M.C. ESP. ADRIÁN MOYA ESCALERA
DIRECTOR



DRA. LYDIA LÓPEZ PONTIGO
COORDINADORA DE POSGRADO ICSA

DR. MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ
COORDINADOR DEL PROGRAMA



Instituto de Ciencias de la Salud
Exhacienda la Concepción s/n Camino a Tlilcuautla,
San Agustín Tlaxiaca, Hgo. C.P. 42180
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4308
mtria_bio_sal@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

Dedicado a...

Mi madre, Beatríz Pastén. La vida me ha premiado con la mejor madre que ha podido existir, eres y siempre serás un ejemplo para mí, no tengo como pagarte todo lo que haces para verme feliz, no sé si merezco tanto pero espero corresponderte con todos los logros que gracias a ti he obtenido a lo largo de mi vida. Mamá, gracias a ti soy la persona que ves ahora y espero enorgullecerte aunque todos los días me esfuerzo por ser mejor. Gracias por tu amor, por tu apoyo incondicional, tu comprensión y por todo lo que me has enseñado pero sobre todo gracias por enseñarme a volar pero siempre seguir mi camino para darme una mano. Te amo con toda mi alma!

Mi padre, Pedro Rodríguez. Otro regalo invaluable de la vida. Te agradezco de corazón dedicar tu vida a apoyarme, a buscar complacerme en todo y hacer hasta lo imposible para lograrlo, sin tu apoyo tampoco sé que haría. Papá, gracias por todo lo que me has enseñado, por siempre estar pendiente de mí y siempre estar ahí para apoyarme en todos los aspectos, espero ser lo que imaginaste que sería desde pequeña, no sé cómo pagarte todo el amor que me das, pero quiero que todos los días recuerdes cuanto te amo y cuanto le agradezco a la vida tenerte siempre cerca.

No sé qué haría sin ustedes, gracias a los dos por nunca soltar mi mano. Los amo infinitamente y viviré eternamente agradecida por tenerlos.

Agradecimientos

Al señor Muffin, porque nunca te mueves de mi lado y me alegras todos los días con tu presencia, ojalá sepas lo amado que eres :3

A Romeo, gracias por tu apoyo en todos los aspectos, gracias porque estuviste presente desde el comienzo de esta etapa en mi vida, motivándome e impulsándome. Ahora que concluye, te agradezco siempre estar pendiente, gracias por tu amor, por tu tiempo, por tu paciencia, por seguir aquí de pie en todo momento, eres una gran parte de esa fuerza que me impulsa y me motiva a ser mejor cada día. Y bueno, lo sabes de sobra y sabes la canción pero quiero recordarte que “lo agrio es dulce, lo malo es bueno, lo bueno es insuperable, se siente el aire más liviano, más calientito y todo se hace fácil cuando estás aquí, todo lo que busco lo he encontrado aquí...” Gracias, amor por todo! Te amo.

A mi hermana y mi cuñado, gracias a los dos por todo su apoyo y su cariño, por nunca dejarme sola en momentos difíciles, por todo lo que hemos compartido, por enseñarme tantas cosas y por siempre ser un gran ejemplo para mí. Los quiero con todo mi corazón y sin su apoyo y los ánimos que me dieron para seguir, esto no habría sido posible, gracias! Hermana, te amo!

A toda mi familia, mi abuela, mis tíos y primos por todo el cariño y el apoyo que siempre me han dado incondicionalmente, son parte de mis ganas de mejorar y seguir todos los días. Alejandro y Camila son una alegría que me motiva a ser mejor cada vez para poder darles un gran ejemplo. A los que ya no están, les agradezco porque se que continúan cuidándome y siguiendo mis pasos. A todos mil gracias, los amo!

A Toña, gracias por estar toda la vida pendiente de mí, por visitarme para darme ánimos siempre, gracias porque después de más de 20 años sigues aquí conmigo. Juan Pablo y tú son muy importantes para mí y les agradezco que siempre estén pendientes de mí. Los quiero con todo mi corazón.

A mis amigas hermosas de toda la vida. Araceli, gracias porque pese a la distancia sigues aquí conmigo, pendiente de todo y apoyándome en todo momento, siempre con una llamada o un vuelo, todo es mejor! Te amo wera. Karen, también estás lejos pero se que siempre contaré contigo y siempre tendré tu apoyo y tu cariño. Gaby, te agradezco tu compañía, tu amistad, desvelarte conmigo haciendo tareas, en fin, todo el apoyo que recibo, te aseguro que lo valoro muchísimo y quiero que las dos sigamos adelante y logremos muchas cosas. Las amo con todo mi corazón amigas lindas! Y César, amigower,

gracias por tu amistad, por estar aquí cada 28 de agosto, y gracias por siempre estar pendiente y apoyarme, te quiero mucho amigo!

A Laura y Yari. No hay nada que no sepan, creo que saben que esta fue una etapa muy bonita para mí, pero también de las más duras que me ha tocado vivir, y no tengo como pagarles que siempre han estado ahí, en las buenas, en las malas y en las peores, jamás me dejaron caer. Conocerlas y tener su preciosa amistad es una de las mejores cosas que me llevo de esta etapa, creo que soy muy afortunada y se los agradezco de corazón! Las amo niñas.

A Mariana, mi Marianiguis, no sé cómo podré pagarte toda la ayuda que me diste en el laboratorio siempre, en ambos proyectos, pero ten por seguro que tu amistad es una de los más grandes tesoros en mi vida y siempre será correspondida, también agradezco profundamente haber coincidido con una persona tan hermosa como tú. Te adoro Marianiguis preciosa, y sin ti nada de esto habría sido posible, GRACIAS! P.D. No hay que descuidar el negocio jajaja.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Ivet, Ale, Yudh e Isa, muchísimas gracias por todo su apoyo, no sé cómo pagarles toda su ayuda y su amistad. He sido muy afortunada porque en el laboratorio siempre me he encontrado con personas tan lindas y amables como ustedes, de verdad se los agradezco desde el fondo de mi corazón y quiero que sepan que siempre que pueda estaré ahí, trataré de corresponder a todo su apoyo. Los quiero mucho y tampoco descuiden el negocio por favor! Jajaja.

Agradecimientos académicos

Dr. Eduardo Fernández, ha sido un honor para mí trabajar con usted durante todos estos años, le agradezco infinitamente sus enseñanzas, su tiempo, su paciencia y todo su apoyo en la parte académica, pero más allá quiero agradecerle profundamente todo el apoyo que siempre me ha dado en la parte personal, todo su cariño y sus consejos. Quiero agradecerle que además de mi director de tesis, ha sido un gran amigo para mí pero siempre exigiéndome y mostrándome que puedo y soy capaz de más. Llevo 7 años aproximadamente en el laboratorio y creo que en todo ese tiempo, las personas terminan por convertirse en parte de tu vida y se vuelven como una segunda familia, será difícil lo que viene porque no estaré acompañada por la personas que tanto aprecio y que tan acostumbrada estoy a ver todos los días, quiero externarle todo mi cariño, respeto y admiración. Gracias, Doctor! Mil gracias por todo! (Aunque seguiré pendiente del negocio jajaja).

Agradezco a todo mi comité, Dra. Raquel Cariño, Dr. Luis Soria, Dr. Héctor Ponce y Dr. Mario Ortíz, por todo su apoyo para la elaboración de este trabajo pero también agradezco todo el apoyo durante tantos años, en los que siempre fueron tan amables conmigo, por recibirme en un ambiente tan noble para trabajar, porque eso siempre me mantuvo motivada y segura. Todo mi agradecimiento y cariño para ustedes.

Agradezco a la Doctora Nuri por recibirme tan amablemente en su laboratorio y apoyarme con una parte importante de este trabajo. Gracias por su tiempo y apoyo.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haber otorgado la beca de manutención con número 707908 durante el desarrollo de estos estudios.

ÍNDICE.

ABREVIATURAS

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Generalidades.....	2
2.1.1 Hígado.....	2
2.1.2 Funciones hepáticas.....	5
2.1.3 Enfermedades hepáticas.....	5
2.1.3.1 Colestasis e ictericia.....	5
2.1.3.2 Fibrosis.....	6
2.1.3.3 Cirrosis.....	6
2.1.4 Inducción de daño hepático por tetracloruro de carbono.....	7
2.1.5 Características de <i>Cirsium vulgare</i>.....	7
2.2 Antecedentes del problema.....	8
2.2.1 Uso de plantas con propiedades curativas y sus componentes.....	8
2.2.2 Efectos biológicos y hepatoprotectores del género <i>Cirsium</i>.....	11
2.2.3 <i>Cirsium vulgare</i> y sus propiedades biológicas.....	12
2.2.4 Modelos de reversión de la cirrosis.....	13
2.3 Marco teórico.....	14
III. JUSTIFICACIÓN.....	15
IV. HIPÓTESIS.....	16
V. OBJETIVOS.....	16
5.1 Objetivo general.....	16
5.2 Objetivos específicos.....	16
VI. METODOLOGÍA.....	17
6.1 Tipo de estudio.....	17
6.2 Recolección y obtención del extracto hexánico de <i>C. vulgare</i>.....	17
6.3 Análisis químico preliminar e <i>in vitro</i> del extracto.....	17
6.4 Evaluación farmacológica.....	19
6.5 Análisis histológico.....	22
6.6 Análisis estadístico.....	22

VII. DIAGRAMA DE FLUJO DE DISEÑO EXPERIMENTAL.....	23
VIII. RESULTADOS.....	24
8.1 Recolección y obtención del extracto hexánico de <i>C. vulgare</i>	24
8.2 Análisis químico preliminar e <i>in vitro</i> del extracto.....	24
8.3 Marcadores bioquímicos.....	27
8.4 Análisis histológico.....	35
IX. DISCUSIÓN.....	38
9.1 Efecto antioxidante y contenido fenólico del extracto. Acetato de lupenilo: componente mayoritario.....	38
9.2 Reversión de colestasis, necrosis, estrés y daño oxidativo y fibrosis inducidos por tetracloruro de carbono en ratas.....	40
9.3 Análisis histológico.....	45
X. CONCLUSIONES.....	47
XI. PERSPECTIVAS.....	48
REFERENCIAS.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación anatómica del hígado en el humano.....	2
Figura 2. Representación esquemática de un hepatocito y sus estructuras.....	3
Figura 3. Células del sinusoides hepático.....	3
Figura 4. Lobulillo hepático clásico y triada portal.....	4
Figura 5. A. Lobulillo hepático clásico. B. lobulillo hepático de Rappaport.....	4
Figura 6. A. <i>Cirsium vulgare</i> . B. Inflorescencias de la planta	8
Figura 7. A. Análisis Infrarrojo. B. Cromatografía de gases. C. Análisis de masas.....	25
Figura 8. Estructura química del acetato de lupenilo.....	26
Figura 9. Panel de fotografías de muestras histológicas.....	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plantas utilizadas en el tratamiento de hepatopatías.....	10
Tabla 2. Tratamiento administrado a cada uno de los grupos control y experimentales.....	19
Tabla 3. Promedio de la actividad enzimática y de los niveles de glucógeno, colágena y lipoperoxidación de cada grupo tratado.....	27

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Fosfatasa Alcalina.....	28
Gráfica 2. Gamma glutamil-transpeptidasa.....	29
Gráfica 3. Alanina-aminotransferasa.....	30
Gráfica 4. Lipoperoxidación.....	31
Gráfica 5. Catalasa.....	32
Gráfica 6. Glucógeno.....	33
Gráfica 7. Colágena.....	34

ABREVIATURAS

•**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.

COL – Colchicina.

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 por vía intraperitoneal.

kg – Kilogramo.

KMnO₄ – Permanganato de potasio.

L – Litro.

LP – Lipoperoxidación (peroxidación lipídica).

m – Metros.

MDA – Malondialdehído.

n – Tamaño del grupo.

NK – Natural Killers.

nm – Nanómetros.

p.o. – Administración por vía oral.

RNS – Especies Reactivas de Nitrógeno.

ROS – Especies Reactivas de Oxígeno.

TBARS – Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico.

TC – Tetracloruro de carbono (CCl_4).

t_{1/2} – Tiempo de vida media.

U – Unidades.

VEX – Vehículo del extracto.

VTC – Vehículo del tetracloruro.

RESUMEN

La cirrosis es el estadio final del daño hepático crónico, involucra necrosis, colestasis y fibrosis; es una de las causas principales de muerte en México y demanda buscar tratamientos efectivos. Durante varios años se ha recurrido al uso de plantas medicinales o fitofármacos; por ello, se han realizado investigaciones que demuestran un efecto hepatoprotector y antioxidante de la especie *Cirsium vulgare*. En este proyecto se evaluó el efecto del extracto hexánico de la inflorescencia de *C. vulgare* en un modelo de reversión de cirrosis inducida por tetracloruro de carbono (TC). Se utilizaron 6 grupos (n= 8-10) de ratas Wistar macho de 4-6 semanas de edad. Fueron administrados durante 8 semanas con vehículo o TC (400 mg/kg i.p.; vol. 0.3 mL) 3 veces/semana, y posteriormente 4 semanas diariamente con vehículo o extracto (300 mg/kg p.o.; vol. 0.5 mL) o colchicina (10 µg/rata p.o.; vol. 0.5 mL). Al finalizar se determinaron marcadores bioquímicos de daño hepático en plasma e hígado. También, se identificó preliminarmente el componente mayoritario del extracto por CG/EM e IR. Se determinó el contenido total de fenoles por método Folin-Ciocalteu y capacidad antirradical por DPPH*, ABTS*+ y FRAP del extracto. La administración del extracto mostró una evidente tendencia hacia la reversión del daño; sin embargo, estadísticamente (P<0.05) no se observó diferencia con respecto a la reversión natural de la hepatopatía. No se observó contenido fenólico importante y los valores de actividad antioxidante fueron mínimos. El análisis químico inicial sugiere como compuesto mayoritario al acetato de lupenilo. Por lo tanto, el efecto hepatoprotector y antioxidante en este modelo de reversión de la cirrosis en rata no se debe a compuestos polifenólicos, sino quizás a esteroides con actividad biológica reconocida en extractos de menor polaridad.

Palabras clave: Cirrosis, *C. vulgare*, tetracloruro de carbono, colchicina, reversión

ABSTRACT

Cirrhosis is the final stage of chronic liver damage, involves necrosis, cholestasis and fibrosis. Cirrhosis is one of the main causes of death in Mexico and worldwide. It is mandatory to find more effective treatments. For centuries, medicinal plants or phytodrugs have been used to treat liver diseases. Some previous reports pointed out an antioxidant and hepatoprotective effect of the specie *Cirsium vulgare*. In this study, the hepatoprotective effect of the hexane extract from the inflorescence of *C. vulgare* was evaluated in a reversion model of carbon tetrachloride (TC)-induced cirrhosis in rat. Six groups of male Wistar rats (with n= 8-10 and 4-6 weeks old) were administered for 8 weeks with vehicle or TC (400 mg/kg i.p.; vol. 0.3 mL) 3 times a week; then, they were daily treated with vehicle or the extract (300 mg/kg p.o.; vol. 0.5 mL) or colchicine (10 µg/rat p.o.; vol. 0.5 mL) for 4 more weeks. Finally, biochemical markers of hepatic damage were determined in plasma and liver. The major constituent of the extract was preliminarily identified using GC/MS and IR. Total phenol content by Folin-Ciocalteu method and the free radical scavenging capacity were quantified by DPPH[•], ABTS^{•+} and FRAP in the extract. Administration of the extract demonstrated a significant (P<0.05) reversion effect on all liver damage markers. The total phenol content and the antiradical activity were too slight. Preliminary chemical analysis suggests lupenyl acetate as the main constituent of the extract. Therefore, the hepatoprotective and antioxidant effects observed in this reversion model of cirrhosis are not due to polyphenolic compounds, but perhaps to sterols with recognized biological activity in nonpolar extracts.

Keywords: Cirrhosis, *C. vulgare*, carbon tetrachloride, colchicine, reversion.

I. INTRODUCCIÓN

El hígado es considerado uno de los órganos más importantes del organismo debido que lleva a cabo funciones bioquímicas diversas, por ello es vital mantener su integridad morfológica y funcional, ya que se ve afectado por varios factores químicos y biológicos, los cuales causan dos tipos de daño principales: colestasis, que consiste en el estancamiento y regurgitación de bilis, y necrosis, que es muerte celular causada, por ejemplo, por estrés oxidativo celular. Los diferentes tipos de daño pueden conducir a enfermedades hepáticas como, hepatitis, fibrosis o cirrosis. ^[1,2]

Uno de los factores químicos que afectan al hígado, es el tetracloruro de carbono, que ha sido utilizado para inducir daño hepático crónico y agudo en animales de laboratorio, debido a que genera el radical libre triclorometil al ser metabolizado en el citocromo P-450, lo que provoca estrés oxidativo; además, comparte varias características con la cirrosis causada por alcoholismo. ^[3,4]

Debido a la gravedad del problema es necesario buscar opciones diferentes para el tratamiento de padecimientos hepáticos; así, durante varios años se ha recurrido al uso de fitofármacos como tratamiento o apoyo en padecimientos hepáticos diversos. ^[5]

La familia Asteraceae, agrupa diferentes especies con propiedades medicinales, entre ellas, se encuentra el género *Cirsium* y sus especies han sido utilizadas en varios países por sus efectos antiinflamatorios, antihemorrágicos, ansiolíticos, diuréticos y astringentes, entre otros. La especie *C. vulgare*, ha sido utilizada principalmente por sus efectos antiinflamatorios, ansiolíticos y antihemorrágicos; además, se han realizado investigaciones que demuestran un efecto anticancerígeno y antioxidante. ^[6-10]

II. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades

2.1.1 Hígado.

El hígado humano (Figura 1), pesa en promedio 1.5 kg en un individuo adulto (representa aproximadamente el 2% del peso corporal). Está situado en la parte superior derecha de la cavidad abdominal (3/4 partes) y en la parte superior izquierda (1/4 parte).^[11]

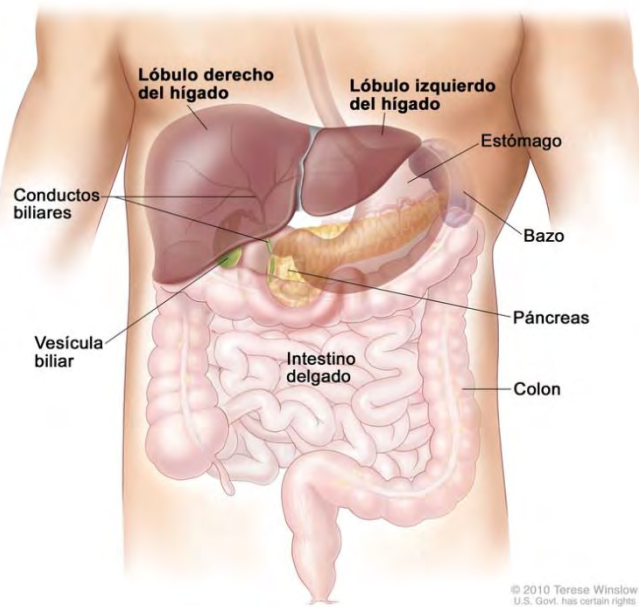


Figura 1. Ubicación anatómica del hígado en el humano.^[2]

Está conformado por distintos tipos celulares, el 70-80% son hepatocitos, que son ricos en mitocondrias, retículo endoplásmico liso y rugoso, complejo de Golgi, y el núcleo es de tamaño variable (Figura 2).^[12,13] También, células de Kupffer que pertenecen al sistema de macrófagos que se encarga de liberar la sangre de partículas extrañas^[11]; células estelares (HSC, de Ito) que almacenan vitamina A, además, en el curso de hepatopatías crónicas son activadas de modo que adquieren funciones características de miofibroblastos, como la secreción de citocinas proinflamatorias y componentes de matriz extracelular, que tiene un papel importante en el proceso de cicatrización durante la fibrosis^[12] y células Natural Killers (NK) o células de Pit,

éstas se localizan en el espacio Disse e intervienen en la destrucción de células tumorales y de hepatocitos infectados por virus; en la Figura 3, se observan todos los tipos celulares mencionados anteriormente. [12,14]

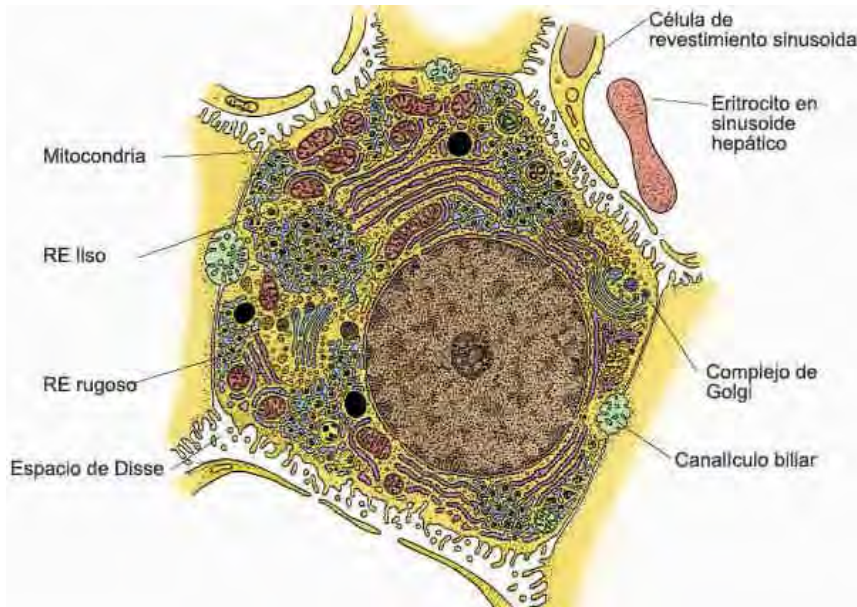


Figura 2. Representación esquemática de un hepatocito y sus estructuras. [15]

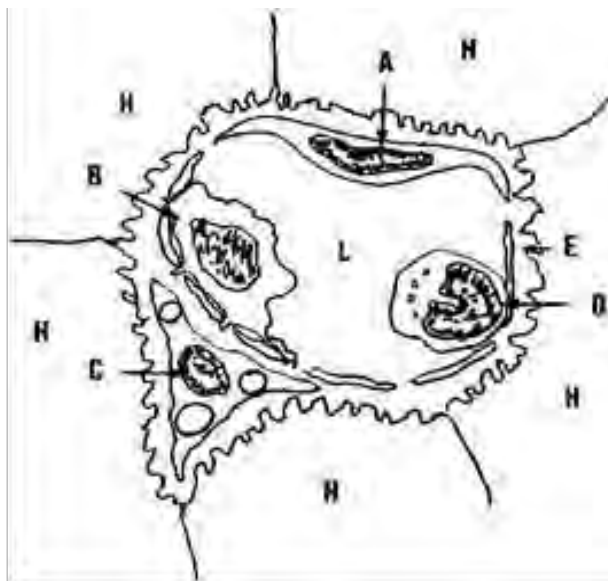


Figura 3. Células del senoide hepático. A. Célula endotelial; B. Célula Kupffer; C. Célula de Ito o estelar; D. Natural Killer; H. Hepatocito; E. Espacio Disse; L. Luz del senoide. [16]

La unidad funcional de este órgano, es el lobulillo hepático. Se pueden distinguir dos tipos; el primero es el lobulillo hepático clásico (Figura 4), los ángulos de este lobulillo con forma hexagonal, son marcados por la vena y la arteria interlobulillar y el conducto biliar interlobulillar (triada portal o triángulo de Glisson).^[13]

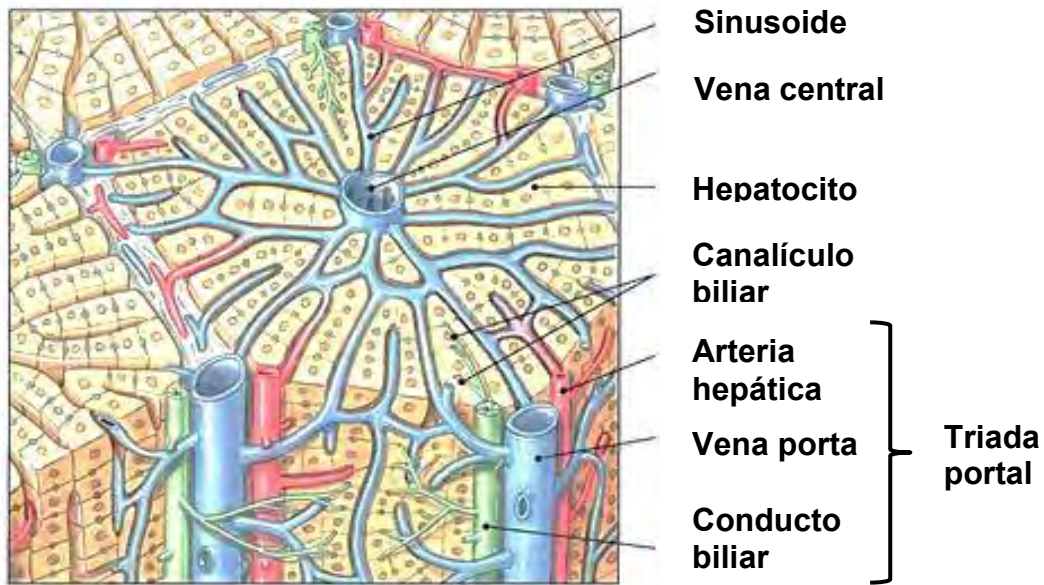


Figura 4. Lobulillo hepático clásico; elementos de una triada portal o triángulo de Glisson.^[15]

El segundo es el lobulillo hepático de Rappaport que consta de 3 zonas, una externa entre dos venas portales, una intermedia y una interna (Figura 5), los ángulos de este lobulillo son dos canales portales y dos venas centrales.^[13]

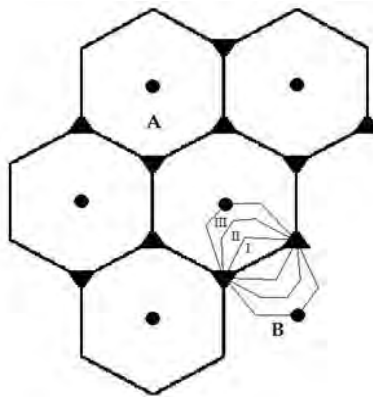


Figura 5. A. Lobulillo hepático clásico. B. Lobulillo hepático de Rappaport.^[17]

2.1.2 *Funciones hepáticas*

El hígado lleva a cabo funciones diversas, entre las principales, se encuentran: metabolismo de las proteínas, como la síntesis de las proteínas plasmáticas, producción de albúmina, proteínas plasmáticas de transporte y de factores de coagulación; metabolismo de carbohidratos, como síntesis, depósito y catabolismo de glucógeno y neosíntesis de glucosa a partir de ácido láctico y de productos procedentes del catabolismo proteico; metabolismo de lípidos (ácidos grasos, fosfolípidos, colesterol y excreción de colesterol en la bilis) y, entre sus funciones de mayor importancia, se encuentra la inactivación y desintoxicación de hormonas y sustancias extrañas, síntesis de sales biliares y conjugación de pigmentos biliares (bilirrubina).^[11,18]

2.1.3 *Enfermedades hepáticas*

La cirrosis hepática es uno de los padecimientos más frecuentes en México donde representa la quinta causa de muerte. En el Estado de Hidalgo hay una tasa de mortalidad de 78.2 por cada 100000 habitantes a causa de enfermedades hepáticas. Esto ocurre principalmente en individuos de 30 a 60 años de edad y en la mayoría de los casos es causada por la ingestión persistente y excesiva de alcohol, aunque también existen otras causas como el consumo prolongado de algunos fármacos.^[19,20]

De acuerdo con la Secretaría de Salud, dentro de los principales factores de riesgo están: Ingesta crónica de alcohol, infecciones crónicas por virus B y C de la hepatitis, obesidad y uso crónico de medicamentos hepatotóxicos; además, la dislipidemia y la hiperglucemia son padecimientos que producen una enfermedad hepática grasa no alcohólica que puede culminar en cirrosis. Los tratamientos farmacológicos son pocos, además son tratamientos a largo plazo y muy costosos o incluso los trasplantes de hígado resulta difícil de conseguir y costear.^[19,21]

2.1.3.1 *Colestasis e ictericia*

La colestasis es la retención sistémica de componentes biliares, tales como, bilirrubina, sales biliares y colesterol; es decir, hay una disminución en la secreción de bilis. Cuando esto ocurre, los componentes de la bilis entran a sangre y por lo tanto el síntoma principal de colestasis es el aumento de ácidos biliares en suero, además, incrementa el nivel de enzimas indicadoras de

colestasis. Cuando la concentración de bilirrubinas aumenta a causa de dicha obstrucción, se presenta ictericia, que es la pigmentación amarillenta de los tejidos. ^[1, 22]

2.1.3.2 Fibrosis

Se define como el depósito excesivo de proteínas componentes de la matriz extracelular, principalmente colágena, es decir puede llegar a una cicatrización anormal como respuesta a la aparición de necrosis causada por ejemplo por estrés oxidativo. Las células estelares (HSC), en el curso de hepatopatías crónicas sufren una activación en la que adquieren funciones similares a miofibroblastos, como la secreción de citocinas proinflamatorias, profibrogénicas. Esta enfermedad puede complicarse hasta desarrollar cirrosis que implica una pérdida de funcionalidad hepática. ^[1]

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. ^[14]

2.1.3.3 Cirrosis

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. ^[1,22]

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 a una pérdida de células hepáticas que lleva a la insuficiencia hepática. ^[22]

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). ^[22] Algunos fármacos, que se metabolizan

por vía hepática, tienen efectos tóxicos en este órgano; entre ellos se encuentran el paracetamol, la isoniazida y la fenitoína, así como algunas otras sustancias entre ellos el tetracloruro de carbono. ^[1,22]

2.1.4 Inducción de daño hepático por tetracloruro de carbono

El tetracloruro de carbono es utilizado como modelo experimental para inducir daño hepático. Su efecto hepatotóxico está mediado por la formación de radicales libres. ^[23]

Al ser un agente hepatotóxico, se utiliza comúnmente para inducir daño hepático en animales de laboratorio, ya que comparte varias características con la cirrosis causada por diferentes agentes en humano por ejemplo, por el consumo excesivo y prolongado de alcohol. Ambas sustancias son metabolizadas por el citocromo CYP450, específicamente la subfamilia CYP2E1; ambos conllevan estrés oxidativo debido a la generación de radicales libres. El TC genera el radical libre triclorometil al sufrir una deshalogenación durante su metabolismo, lo que da inicio al proceso de lipoperoxidación; así, el daño inducido por TC promueve peroxidación lipídica, vacuolización, esteatosis, así como necrosis y nódulos fibrosos de regeneración hepática, tal como sucede en la cirrosis humana por alcoholismo. ^[4,24]

2.1.5 Características de *Cirsium vulgare*

Las plantas del género *Cirsium*, llamadas comúnmente cardos, son plantas herbáceas, espinosas, con inflorescencias de tipo cabezuela, de color blanco, amarillo, rosadas o moradas. El género incluye aproximadamente 200 especies distribuidas mundialmente. ^[25]

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*. ^[25]

Particularmente la especie *Cirsium vulgare* L. (Figura 6-A), es un cardo que pertenece al Phylum Magnoliophyta, Clase Magnoliopsida, Orden Asterales y a la Familia Asteraceae (Compositae). Comúnmente conocido como cardo negro, cardo toro o cardo común y las cabezuelas tienen un característico color lila (Figura 6-B). Crecen como maleza ocasional, nativa de Eurasia, introducida en norte y Sudamérica en lugares de clima árido. Sus principales polinizadores son abejas y abejorros. ^[25-27]



Figura 6. A. *Cirsium vulgare*. B. Inflorescencias de la planta. ^[10]

2.2 Antecedentes del problema

2.2.1 Uso de plantas con propiedades curativas y sus componentes

El uso de plantas medicinales para curar algunos padecimientos o como apoyo en tratamientos diversos es una práctica muy común en muchos países. Una planta medicinal se define como una especie a la que se le atribuyen propiedades curativas debido a sus principios activos, mismos que pueden ser precursores para la síntesis de fármacos nuevos. ^[28,29]

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. ^[1] 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 de la silimarina. ^[30]

En el estado de Hidalgo se ha reportado la presencia de un gran número de plantas con propiedades hepatoprotectoras que generalmente son preparadas en té o infusiones y se toman como tratamiento para diferentes padecimientos en el hígado (Tabla 1). ^[31-34]

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. Los agentes activos principales de las plantas, son los que determinan sus propiedades terapéuticas, y la presencia de éstos, depende del clima, localización y otros factores exógenos. ^[1] Un ejemplo de componentes de plantas utilizados ampliamente por su efecto hepatoprotector son la silimarina y la colchicina. [1,23,35,36]

La silimarina, se obtiene de la especie *Silybum marianum* (cardo lechoso o cardo mariano), es una mezcla de tres flavonoides, silibinina, silidianina y silicristina; siendo la silibinina (C₂₅H₂₂O₁₀) el agente activo principal. Este compuesto es utilizado ampliamente en el tratamiento de hepatopatías ya que tiene efecto antioxidante, antifibrótico, inmunomodulador, además de un mecanismo de regeneración hepática; esto se ha comprobado en diferentes estudios de daño crónico inducido con TC, y ha mostrado inhibir la peroxidación lipídica, prevenir la fibrosis y la cirrosis. La colchicina, un alcaloide que se obtiene de la especie *Colchicum autumnale* (narciso de otoño). Este compuesto ha mostrado tener diferentes efectos benéficos, por ejemplo, actividad antitumoral, propiedades antiinflamatorias y hepatoprotección contra diferentes agentes tóxicos, entre ellos, TC y paracetamol; sin embargo, al ser un alcaloide debe ser utilizado en dosis muy bajas y administrada bajo supervisión, ya que los alcaloides, poseen efectos psicoactivos. ^[1,5]

Tabla 1. 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.

Esta lista se obtuvo de fuentes diversas.^[10,31-34]

2.2.2 Efectos biológicos y hepatoprotectores del género *Cirsium*

El género *Cirsium* ha sido investigado ampliamente por sus propiedades farmacológicas, principalmente en países Asiáticos, por ejemplo, en la medicina tradicional china, *C. japonicum* ha mostrado propiedades como antihemorrágico, diurético y se le ha dado uso como tratamiento contra el cáncer hepático, uterino, de próstata y leucemia; *C. setosum* es usado como antiinflamatorio; *C. pascuarensense* es utilizado en el tratamiento de diabetes y *C. rivulare* como ansiolítico ya que tiene efectos sedantes ligeros. [35,37,38]

En Europa, se ha observado que *C. arvense* y *C. oleraceum* tienen diferentes usos, entre ellos diurético, astringente, antiinflamatorio y presentan actividad antimicrobiana; además *C. oleraceum* tiene efectos ansiolíticos; estas especies son utilizadas específicamente en la medicina tradicional polaca. [36]

En el estado de Hidalgo, la infusión de hojas e inflorescencias de *C. ehrenbergii* se utiliza tradicionalmente como tratamiento para hemorragia y flujo vaginal (para flujo se hacen lavados vaginales y se bebe), tos y dolor de corazón (tomado en ambos casos) [31]; también se realizó un estudio del extracto hexánico de *C. ehrenbergii* en el que fueron reportados efectos relajantes en el útero de rata Wistar [39]; otras especies utilizadas en Hidalgo, son *C. raphilepis* como remedio para la tos y *C. subuliforme* para realizar lavado vaginal. [40]

El efecto hepatoprotector de muchas especies del género *Cirsium*, ha sido evaluado ampliamente. [36, 41-45]

Se 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*. [36]

Se 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. [42]

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 óxido nítrico (ON).^[43]

El extracto de *Cirsium setidens* ha sido evaluado en el daño hepático inducido por D-galactosamina en rata Sprague Dawley; se concluyó que existe inducción de enzimas antioxidantes y elevación de glutatión reducido.^[45]

En un estudio realizado 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.^[44]

Se llevó a cabo una evaluación del efecto hepatoprotector de *C. ehrenbergii* induciendo daño hepático crónico 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.^[41]

2.2.3 *Cirsium vulgare* y sus propiedades biológicas

Particularmente, 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.^[36, 6, 7]

También existe un estudio 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.^[8]

La actividad antimicrobiana de *C. vulgare* fue analizada y se reporta que el extracto metanólico de hojas e inflorescencias tiene un efecto antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomona aeruginosa*.^[9]

Fueron analizados los extractos hexánicos de las inflorescencias de *C. ehrenbergii* y *C. vulgare* utilizando dos dosis, 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. ^[46]

Un antecedente más directo es la evaluación del efecto hepatoprotector del extracto hexánico de *C. vulgare*, donde éste mostró un efecto benéfico con propiedades antifibróticas, antioleostáticas, antinecróticas y antioxidantes; esto fue evaluado en rata Wistar utilizando una dosis de 300 mg/kg y un modelo de cirrosis por TC. ^[10]

2.2.4 Modelos de reversión de la cirrosis

Realizar estudios en modelos de reversión es de gran importancia debido a que la mayoría de personas, no tiene una cultura de prevención de enfermedades y busca tratamientos una vez que la enfermedad (en este caso la cirrosis) ya está establecida, por lo tanto, es importante emular el proceso clínico de las enfermedades. Por ello, se han realizado estudios con diferentes sustancias para evaluar el efecto de reversión de cirrosis en modelos experimentales inducidos con TC en ratas Wistar; por ejemplo, el celecoxib, un medicamento utilizado como antiinflamatorio para alivio de dolores fuertes en casos como la osteoartritis, que ha mostrado prevenir y revertir diferentes tipos de daño hepático como, la necrosis, colestasis, la disminución de glucógeno hepático y la acumulación de colágena (antifibrótico y fibrolítico). ^[47]

Otro compuesto evaluado en un modelo de reversión de cirrosis en ratas Wistar, es el alopurinol, utilizado para controlar el exceso de ácido úrico en plasma, sin embargo, este compuesto mostró revertir los niveles de los marcadores enzimáticos y de estrés oxidativo en el daño hepático inducido por TC; además mostró disminuir la producción y el contenido de colágena. ^[48]

También existen estudios en modelos de reversión realizados con extractos polares de plantas por ejemplo el extracto metanólico de la especie *Rosmarinus officinalis*, en modelos de prevención y reversión de cirrosis inducida por TC en ratas Wistar, el extracto mostró protección y disminución del daño hepático según marcadores de estrés oxidativo como ON y lipoperoxidación (LP), necrosis (alanina-aminotransferasa (ALT) y revisión histológica), colestasis (gamma glutamil-transpeptidasa (GGTP) y bilirrubinas totales (BT)) y fibrosis (revisión histológica). ^[49]

Un antecedente más relacionado con el presente estudio, es la evaluación del efecto de reversión de fibrosis de la silimarina y la colchicina en un modelo de daño inducido por TC en ratas Wistar; el estudio mostró una disminución leve, pero significativa, al suspender la administración de TC, sin embargo, la coadministración con colchicina o silimarina no mostró un efecto fibrolítico significativo contra el daño producido por TC. [50]

2.3 Marco teórico

La cirrosis es la fase final de numerosas hepatopatías, que se define como una lesión difusa caracterizada por necrosis, colestasis, fibrosis y pérdida de la arquitectura y funcionalidad del órgano, es decir, representa un ejemplo de cicatrización y regeneración anormales.

Este padecimiento representa la quinta causa de muerte a nivel nacional y es de las principales causas en el Estado de Hidalgo (8° lugar). Los tratamientos farmacológicos son pocos, además son tratamientos a largo plazo y muy costosos, llegando a la necesidad de un trasplante de hígado, que resulta difícil de conseguir y costear. Una alternativa, es el uso de plantas con propiedades medicinales. Particularmente, diferentes especies del género *Cirsium*, han sido evaluadas ampliamente y han mostrado efectos hepatoprotectores.

La especie *C. vulgare*, se encuentra distribuida ampliamente en el Estado de Hidalgo, crece en lugares de clima árido como maleza ocasional, es de fácil propagación y es polinizada por abejas y abejorros principalmente. Sin embargo, al presentar cabezuelas sumamente espinosas e invadir algunos cultivos y pastizales de ganado, es considerada “hierba mala” y es depredada y desechada en grandes cantidades; por ello, resulta importante realizar nuevas evaluaciones sobre las propiedades protectoras y curativas esta especie, para protegerla y aprovecharla.

Además, *C. vulgare* ha sido utilizada en el tratamiento de diferentes padecimientos, por sus propiedades ansiolíticas, antiinflamatorias y diuréticas. Algunas evaluaciones sugieren efectos anticancerígeno, antimicrobiano y hepatoprotector en modelos de daño hepático agudo y crónico. Debido al evidente efecto hepatoprotector mostrado, es importante evaluar ahora un modelo de reversión de la cirrosis, ya que simula la historia natural de la enfermedad, sobre todo considerando la falta de cultura de prevención; es decir, generalmente se buscan tratamientos curativos (hasta que la enfermedad está presente) y pocas veces preventivos.

III. JUSTIFICACIÓN

Es importante realizar investigación acerca de fármacos con funciones hepatoprotectoras, debido a que las enfermedades hepáticas son un problema de salud pública. 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. ^[5] A nivel nacional, según reporta el Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS), son la quinta causa de muerte y el estado de Hidalgo tiene el octavo lugar con mayor número de muertes a causa de estos padecimientos (694 muertes en un año, tasa de 78.2 por cada 10000 habitantes). 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; por ello, es importante buscar alternativas nuevas, más eficientes y seguras contra padecimientos diversos. Específicamente, la cirrosis hepática es un padecimiento muy frecuente en México, principalmente se presenta entre los 30 a 60 años de edad y es causado por la ingestión prolongada e intensa de alcohol; por ello, es la causa de muerte de un porcentaje considerable (12-15 %) de las personas hospitalizadas. ^[19, 20]

C. vulgare es una especie poco estudiada sobre sus propiedades terapéuticas, y teniendo en cuenta los antecedentes hepatoprotectores preventivos de su género en modelos crónico y agudo, es importante evaluar esta misma especie ahora en un modelo de reversión de la cirrosis, el que emula al proceso clínico cuando un paciente es diagnosticado e inicia un tratamiento de reversión; asimismo, es importante conocer los componentes mayoritarios presentes en el extracto que le confieren dichas características. ^[5,10,41,46]

IV. HIPÓTESIS

El extracto hexánico de la inflorescencia de *C. vulgare* tiene un efecto de reversión de la cirrosis provocada por tetracloruro de carbono en rata.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto del extracto hexánico de las inflorescencias de *Cirsium vulgare* mediante su análisis *in vitro* e *in vivo* en un modelo de reversión de la cirrosis inducida con CCl₄ en rata.

5.2 Objetivos específicos

- Localizar, identificar, coleccionar y secar las inflorescencias de *C. vulgare* para su extracción posterior.
- Obtener el extracto hexánico de *C. vulgare* con Soxhlet y concentrarlo para su evaluación farmacológica.
- Identificar preliminarmente el componente mayoritario del extracto obtenido de la planta utilizando técnicas espectroscópicas para relacionarlo a su actividad biológica.
- Determinar la capacidad atrapadora de radicales libres del extracto mediante técnicas *in vitro* con el fin de evidenciar algún mecanismo de acción antioxidante.
- Establecer el modelo de daño hepático crónico de reversión en ratas y evaluarlo mediante parámetros bioquímicos e histológicos, para determinar los efectos hepatoprotectores de *C. vulgare*.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio experimental, prospectivo y transversal. Las fases del mismo se describen a continuación.

6.2 Recolección y obtención del extracto hexánico de *C. vulgare*

Se llevó a cabo la colecta de las inflorescencias de *C. vulgare*, en el municipio de Mineral de la Reforma, Estado de Hidalgo; se dejaron secar durante 48 horas, a temperatura ambiente, y fueron molidas a mano posteriormente. Se formaron los cartuchos que fueron extraídos vía Soxhlet durante 9 horas cada uno, utilizando un solvente no polar tal como el hexano. El extracto fue concentrado en un rotavaporizador y fue medido a masa constante para obtener así el extracto puro o seco.

6.3 Análisis químico preliminar e in vitro del extracto

El componente mayoritario del extracto fue determinado por espectroscopía infrarrojo (IR) y por cromatografía de gases acoplada a espectrometrías de masas (CG/EM)

La caracterización inicial de los grupos funcionales de los componentes no polares presentes en el extracto hexánico, fue realizada utilizando un espectrómetro de transformada de Fourier (FT-IR, Perkin-Elmer Spectrum, versión 10.4.00, Norwalk, CT, USA). La caracterización fue llevada a cabo registrando la transmitancia (%T) del extracto en el rango de frecuencia 4000 cm^{-1} - 400 cm^{-1} . La muestra fue colocada en una pastilla de KBr para la espectroscopía de infrarrojo (IR). La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) fue realizada utilizando AutoSystem XL-GC equipado con una columna EN5MS (espesor 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 μm) y acoplado a un detector TurboMass-MS con un sistema de ionización de 70eV (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). La muestra diluida fue manualmente inyectada (1.0 μL) y transferida. La tasa de flujo de helio fue de 1.0 mL/min en 8 psi. La temperatura inicial fue de 60°C y fue incrementando gradualmente hasta 330°C a una velocidad de 8°C/min y se mantuvo por 30 minutos. El espectro de masas fue escaneado desde 15 hasta 600 m/z. ^[51]

También se llevó a cabo la determinación de contenido total de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu, además de la actividad antioxidante *in vitro* por método DPPH[•], ABTS^{•+} y FRAP. [46,52,53]

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactante de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico que reaccionan con cualquier tipo de fenol formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce dichos complejos en óxidos, cromógenos de color azul intenso, siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula. [52]

El método DPPH[•] se basa en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrihidrazil la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en solución etanólica, centrada alrededor de 520 nm. Cuando una disolución de DPPH[•] entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical se produce la forma reducida DPPH-H o DPPH-R con la consecuente pérdida de color y por lo tanto la pérdida de la absorbancia. [52,53]

El método ABTS^{•+} (2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS^{•+} debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o electrones. El radical catiónico ABTS^{•+} es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS^{•+} con persulfato de potasio. [53]

El ensayo FRAP evalúa la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo con su capacidad para reducir el hierro férrico (Fe^{+3}) presente en un complejo con la 2,4,6-tri (2-piridil) – s triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa (Fe^{+2}). Tiene un máximo de absorbancia a una longitud de onda entre 590 – 595 nm. [53]

6.4 Evaluación farmacológica

Los animales utilizados en esta investigación recibieron un trato humanitario de acuerdo a los lineamientos establecidos por la NOM-062-ZOO-1999, concerniente a la producción, uso y cuidado de animales de laboratorio.

Se trabajó con 6 grupos de ratas Wistar macho de 4 semanas de edad y una masa de 100-115 g; cada grupo se formó incluyendo a los animales al azar. Los animales fueron mantenidos bajo un ciclo constante de 12 h luz/oscuridad a 21 ± 3 °C y se les proporcionó alimento estándar y agua *ad libitum* y se obtuvieron del Bioterio perteneciente al Instituto de Ciencias de la Salud (ICSa).

El tratamiento tuvo una duración total de 12 semanas. Ocho semanas se administró a los animales con vehículo o TC (400 mg/kg i.p.; vol. 0.3 mL), respectivamente, 3 veces/semana, y posteriormente 4 semanas diariamente con vehículo o extracto (300 mg/kg p.o.; vol. 0.5 mL) o colchicina como fármaco de comparación (10 µg/kg p.o.; vol. 0.5 mL), respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Tratamiento administrado a cada uno de los grupos control y experimentales.

Modelo de reversión de la cirrosis.	
Grupo	Tratamiento
VTC+VEX (Control de controles) n = 8	Aceite de oliva (p.o.)* + Aceite mineral (i.p.)**
VTC+COL (Control de colchicina) n = 8	Colchicina (p.o.)* + Aceite mineral (i.p.)**
VTC+EX (Control de extracto) n = 8	Extracto (p.o.)* + Aceite mineral (i.p.)**
TC+VEX (Control de daño) n = 20***	Aceite de oliva (p.o.)* + TC (i.p.)**
TC+EX (Grupo reto) n = 10	Extracto (p.o.)* + TC (i.p.)**
TC+COL (Control positivo) n = 10	Colchicina (p.o.)* + TC (i.p.)**

*Administración diaria, ** administración 3 veces por semana.

Dosis de extracto: 300 mg/kg; dosis colchicina: 10 µg/kg; dosis TC: 0.4 g/kg.

Aceite de oliva: vehículo del extracto. Aceite mineral: vehículo del TC. *** El grupo control de daño, fue dividido en dos (cada uno n=10), la mitad del grupo fue sacrificado a las 8 semanas de administración con TC, para obtener así, los valores de ratas cirróticas; la otra parte, fue administrada durante 8 semana con TC y 4 semana con VEX, para obtener así, los valores de la reversión natural de la cirrosis al suspender el agente hepatotóxico.

Posteriormente se llevaron a cabo las determinaciones bioquímicas.

En plasma se cuantificó:

- Actividad de fosfatasa alcalina (FA, indicador de colestasis). 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. ^[4, 22, 54] El método utilizado se basa en la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato por la FA, para producir fosfato inorgánico y p-nitrofenol. ^[55, 56]
- Actividad de gamma glutamil-transpeptidasa (GGTP, indicador de colestasis). 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. ^[4, 22, 54] En este método se utiliza 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 glutamiliglicina y p-nitroanilina. ^[57]
- Actividad de alanina-aminotransferasa (ALT, marcador de necrosis). 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. ^[4, 22, 54] La técnica permite la obtención de piruvato a partir de la reacción de transaminación entre la alanina y el ácido alfaoxoglutarico. ^[58]

En hígado se analizó:

- Grado de peroxidación lipídica por especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (LP, indicador de daño membranal celular). 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. ^[4, 59,60] Esta técnica es colorimétrica y se basa en la cuantificación de TBARS (como el malondialdehído, MDA). ^[61] Los resultados se expresan como nmol de MDA/mg proteína. Las proteínas se cuantificaron con el método de Bradford. ^[62]
- Actividad de catalasa (CAT, indicador de estrés oxidativo y funcionalidad hepática). 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 se cuantificó utilizando permanganato de potasio ($KMnO_4$), ya que reacciona con el H_2O_2 , por lo tanto se cuantificó el $KMnO_4$ residual. La actividad de catalasa fue calculada con el índice constante de reacción de la descomposición de H_2O_2 ($K \cdot 10^2/\text{min}$). ^[3, 60]
- Niveles de glucógeno (indicador de estrés oxidativo y funcionalidad hepática). 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. ^[4] La cuantificación de glucógeno se obtendrá con la técnica de la antrona en solución de H_2SO_4 . ^[63]
- Niveles de colágena (como hidroxiprolina, HP, indicador de fibrosis). La alta concentración de colágena indica la aparición de fibrosis, debido a que es el componente principal del tejido fibrótico. ^[4] La técnica utilizada se basa en la descrita por Rojkind y González, ^[64] donde por medio de la digestión ácida del tejido hepático se extrae la hidroxiprolina e indirectamente se cuantifica la colágena.

6.5 Análisis histológico

Las muestras hepáticas fueron fijadas en formaldehído al 10%. 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.

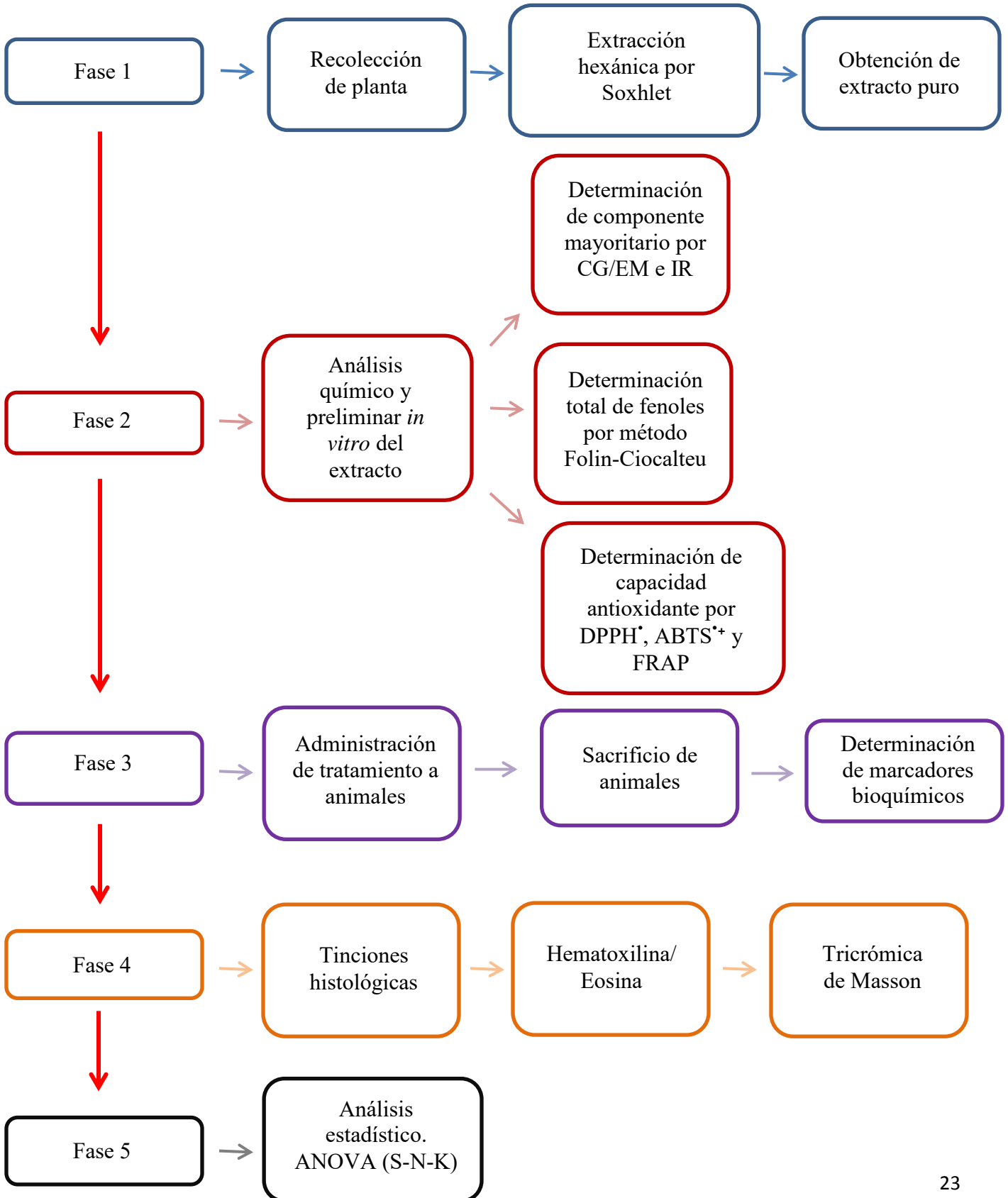
Posteriormente se utilizó la tinción de hematoxilina/eosina (HE) para evidenciar el núcleo en color azul y el citoplasma de los hepatocitos en color rosa. También, para evidenciar el músculo vascular en tonos rojizos y los glóbulos rojos de color naranja-rojizo, además de la fibrina en rosa intenso. [65]

También se realizó la tinción tricrómica de Masson que es una técnica para la coloración de fibras colágenas; en esta tinción el tejido conjuntivo se observó en color verde, el tejido muscular en un tono más pardo de verde, los eritrocitos en un tono rojizo, núcleos en azul oscuro y el citoplasma y fibras musculares de color rosa pardo. En general la técnica se usa para identificar incrementos en la colágena hepática en enfermedades como la cirrosis. [41,66]

6.6 Análisis estadístico

Todos los valores fueron reportados como la media \pm EE. El análisis estadístico se realizó con la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Cuando la prueba de ANOVA fue significativa, se aplicó la prueba *a posteriori* de Student-Newman-Keuls para determinar cuáles grupos difieren significativamente entre sí, considerando como nivel de significancia una $P < 0.05$, esto mediante un paquete computacional Sigma-Stat versión 10.0 (Systat Software, USA). [67]

VII. DIAGRAMA DE FLUJO DE DISEÑO EXPERIMENTAL



VIII. RESULTADOS

8.1 Recolección y obtención del extracto hexánico de *C. vulgare*

La recolección de las inflorescencias de la planta fueron se llevó a cabo en el municipio Mineral de la Reforma, Estado de Hidalgo (20°8'8" latitud N y 98°40'19" longitud O y 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. Se obtuvo un total de 23.8 kg de planta fresca y un total de 12.4 kg de planta seca y molida; así se obtuvo el extracto puro o seco, con un rendimiento de 11.6% (3.48 g/ 30 g).

8.2 Análisis químico preliminar e in vitro del extracto

El componente mayoritario del extracto fue determinado por espectroscopía infrarrojo (Figura 7-A) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) (Figura 7-B y 7-C). En la Figura 7-A, se observa el espectro del análisis por infrarrojo que muestra la presencia de un componente en gran abundancia (componente mayoritario). Las señales más intensas corresponden a distintos grupos funcionales, tales como, carbonos alifáticos (CH), carbonilo (C=O), carbono-oxígeno (C-O) de grupos éster y grupos metilo (CH₃); además, las $\nu_{\text{máx}}$ obtenidas coinciden con las reportadas en la literatura: IR (CHCl₃): $\nu_{\text{máx}}$ 2.942, 2.866, 1.735, 1.451, 1.379, 1.243, 1.027 cm⁻¹. Con base en lo anterior, se sugiere que se trata de una molécula similar al acetato de lupenilo (Figura 8).^[68] En la Figura 7-B, se observa la cromatografía de gases de *Cirsium vulgare* en comparación con la del extracto hexánico de otra especie del género, *C. ehrenbergii*. De acuerdo con el tiempo de retención, se sugiere que el componente mayoritario en ambos extractos es el mismo, aunque se encuentra en mayor cantidad en el extracto de *C. ehrenbergii*; por ello, se realizó un análisis de masas de dicha especie que se muestra en la Figura 7-C, donde se observa el patrón de fragmentación del compuesto, que fue comparado con el patrón de fragmentación del acetato de lupenilo reportado en la literatura^[68] y ambos coinciden nuevamente, lo cual refuerza la presencia posible del acetato de lupenilo como componente mayoritario del extracto hexánico de *C. vulgare*.

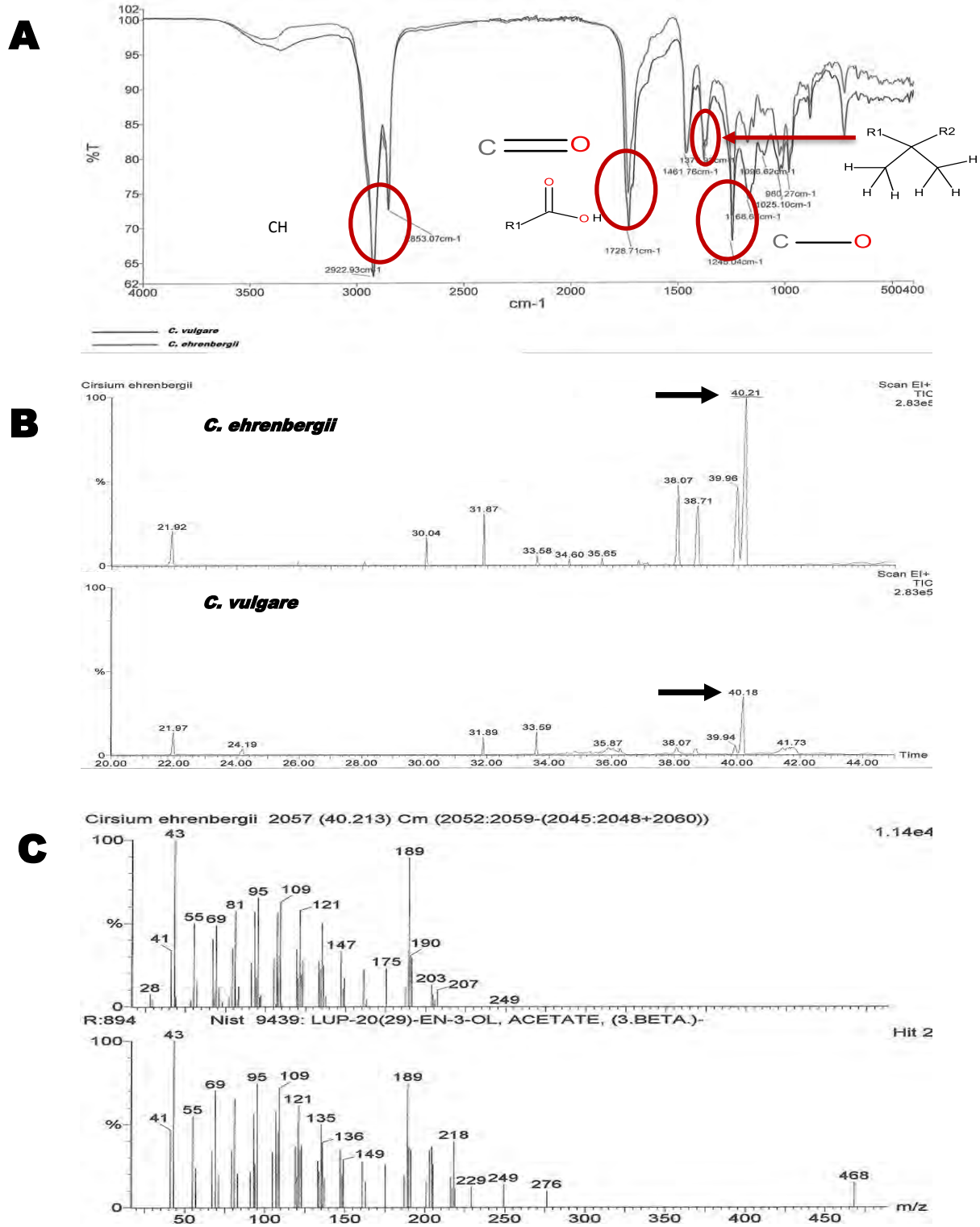


Figura 7. A. Empalme del análisis infrarrojo (IR) del extracto hexánico de *Cirsium vulgare* y *Cirsium ehrenbergii*; señalados grupos funcionales correspondientes a las señales de mayor intensidad. B. Cromatografía de gases de *Cirsium vulgare* y *Cirsium ehrenbergii*, señalado el pico padre de cada una de las especies. C. Patrón de fragmentación obtenido del análisis de masas de *Cirsium ehrenbergii* comparado con el reportado en la literatura del acetato de lupenilo. ^[68]

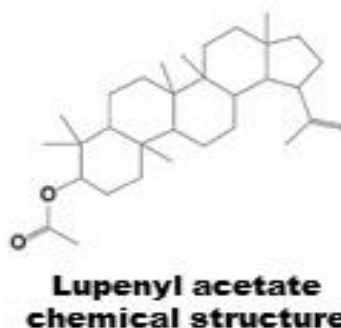


Figura 8. Estructura química del acetato de lupenilo. ^[68]

- Fenoles totales (Folin-Ciocalteu)

Se realizó la cuantificación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu. Para llevar a cabo esta prueba se utilizó ácido gálico como estándar; el resultado obtenido en este análisis fue una concentración de 5.775 mg EAG/100 g. La cantidad tan baja de fenoles encontrada en el extracto se atribuye a la polaridad del extracto, es decir, al tratarse de un extracto no polar, es más probable que los metabolitos presentes sean del grupo de los terpenos y esteroides.

- Actividad antioxidante

Se llevó a cabo la determinación de la actividad antioxidante del extracto mediante tres técnicas. La primera fue por método de DPPH[•], utilizando como estándar trolox (análogo hidrosoluble de vitamina E); se obtuvo una concentración de 25.093 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$. Esto indica la presencia de componentes con actividad antioxidante, similar a la del ácido ascórbico.

La segunda determinación fue con el método de ABTS^{•+}, utilizando como estándar ácido ascórbico; se obtuvo una concentración de 0.445 mg EAA/100 g. Esto indica la presencia de componentes con actividad antioxidante similar a la del trolox, aunque en menor cantidad en comparación con los componentes de actividad similar a la del ácido ascórbico.

Finalmente se llevó a cabo un ensayo FRAP, utilizando como estándar al trolox; se obtuvo una concentración de 9.42 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g}$. Este resultado confirma la baja actividad atrapadora de radicales libres del extracto, y reafirma la propuesta de un mecanismo de acción inmunomodulador y no necesariamente antioxidante.

8.3 Marcadores bioquímicos

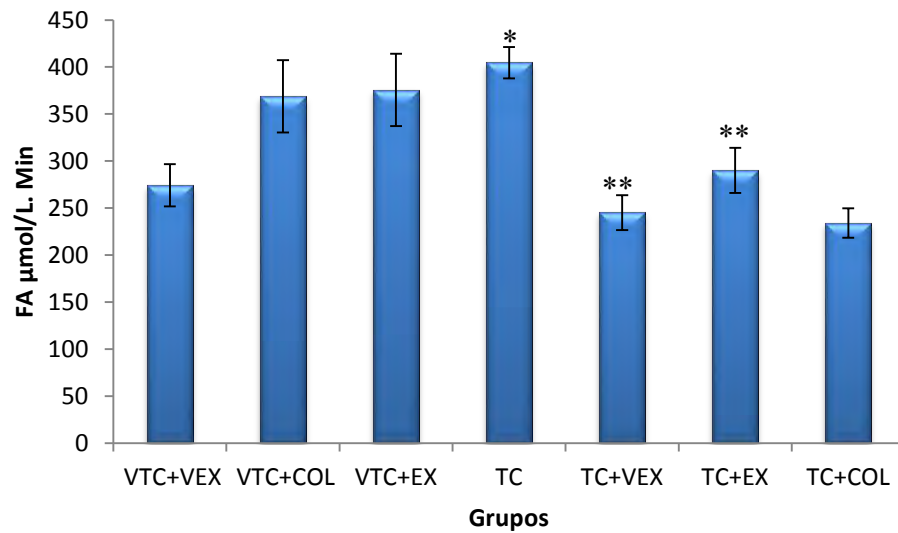
Los resultados de los marcadores bioquímicos se muestran resumidos en la Tabla 3. Para el análisis estadístico se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía; cuando la prueba de ANOVA fue significativa, se aplicó la prueba *a posteriori* de Student-Newman-Keuls para determinar cuáles grupos difieren significativamente entre sí, considerando como nivel de significancia una $P < 0.05$.

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

Marcador (Unidades)	VTC+VEX	VTC+COL	VTC+EX	TC	TC+VEX	TC+EX	TC+COL
FA ($\mu\text{mol}/\text{L}\cdot\text{min}$)	321.8 \pm 36.4	368.9 \pm 38.4	375.5 \pm 38.4	* 404.6 \pm 16.7	** 245.1 \pm 18.5	** 290.0 \pm 23.9	233.9 \pm 15.6
GGTP ($\mu\text{mol}/\text{L}\cdot\text{min}$)	7.5 \pm 0.8	11.2 \pm 0.6	11.1 \pm 0.9	* 15.5 \pm 0.6	** 6.9 \pm 0.8	** 7.2 \pm 0.6	8.1 \pm 0.7
ALT ($\mu\text{mol}/\text{L}\cdot\text{min}$)	19.5 \pm 3.5	2.1 \pm 0.6	25.4 \pm 2.2	* 47.8 \pm 3.3	** 30.4 \pm 2.8	** 28.1 \pm 0.7	35.7 \pm 1.4
LP (nmol MDA/g p.)	0.3 \pm 0.05	0.9 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1	* 1.6 \pm 0.1	** 0.8 \pm 0.1	** 0.7 \pm 0.1	1.4 \pm 0.5
CAT ($\text{K}\times 10^2/\text{min}$)	10.9 \pm 0.1	10.3 \pm 0.4	10.8 \pm 0.1	* 14.3 \pm 0.1	** 11.5 \pm 0.1	** 11.2 \pm 0.1	11.8 \pm 0.2
Glucógeno (g/100 g hígado)	2.7 \pm 0.4	1.9 \pm 0.5	2.7 \pm 0.2	* 0.8 \pm 0.1	** 3.9 \pm 0.5	** 2.2 \pm 0.6	3.9 \pm 0.7
Colágena (mg/g hígado)	0.2 \pm 0.06	0.1 \pm 0.04	0.8 \pm 0.2	* 3.2 \pm 0.2	** 0.1 \pm 0.04	** 0.2 \pm 0.06	0.3 \pm 0.09

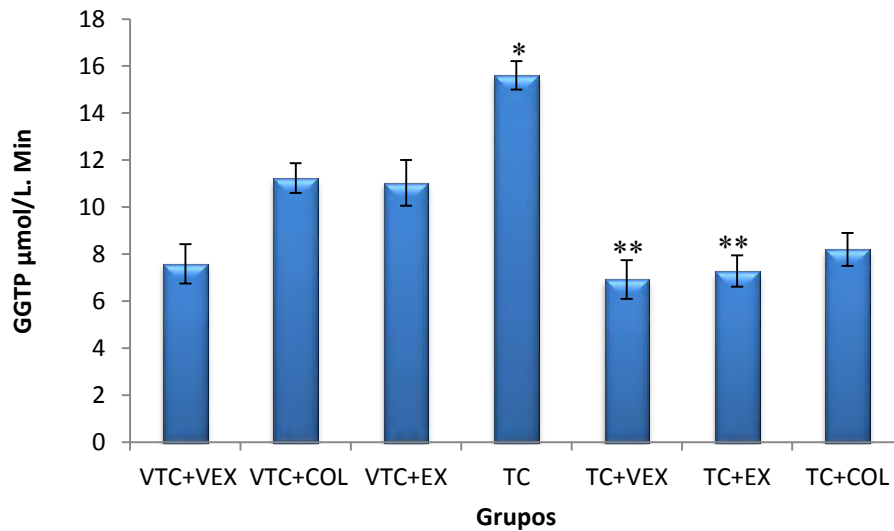
Promedio de cada grupo \pm EE. * indica diferencia significativa con respecto al grupo VTC+VEX; **indica diferencia significativa con respecto al grupo TC, con una $P < 0.05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls.

- Fosfatasa alcalina.** Como lo muestra la Gráfica 1, la actividad enzimática de FA se incrementó visiblemente en el grupo dañado (TC) ($p < 0.05$). La administración del EX no induce un cambio *per se* y disminuye el nivel de este marcador de colestasis como se observó en el grupo reto (TC+EX), mismo que se mantiene en un nivel sin diferencias significativas con respecto al control de controles (VTC+VEX). Incluso en los grupos de reversión natural (TC+VEX) y control positivo (TC+COL), los niveles de FA disminuyen de forma similar.



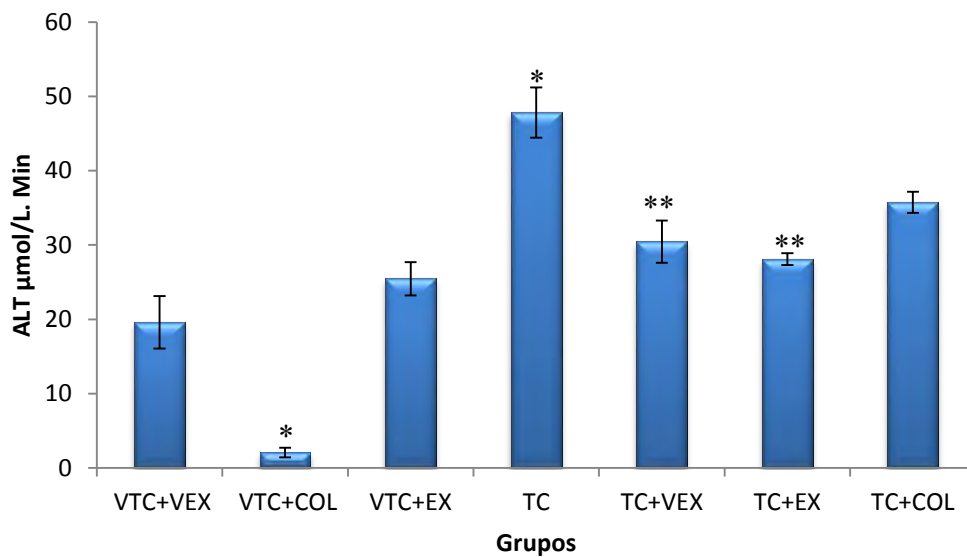
Gráfica 1. Fosfatasa alcalina (marcador plasmático de colestasis). Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos \pm EE. * indica la diferencia significativa con respecto al grupo VTC+VEX; ** indica la diferencia significativa con respecto al grupo TC, con una $P < 0.05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls.

- Gamma glutamil-transpeptidasa.** En la Gráfica 2, se observa un incremento de aproximadamente un 40% en la actividad enzimática de GGTP en el grupo cirrótico (TC) comparado con el grupo control de controles (VTC+VEX); sin embargo, en el grupo reto (TC+EX) se observa una disminución significativa del marcador de colestasis en comparación con el grupo TC, no así con respecto a los grupos de reversión natural ni administración con colchicina. Nuevamente el EX no induce algún cambio por sí mismo. De este modo, el grupo reto, el grupo de reversión natural (TC+VEX) y el control positivo, tampoco muestran diferencias significativas con el grupo VTC+VEX.



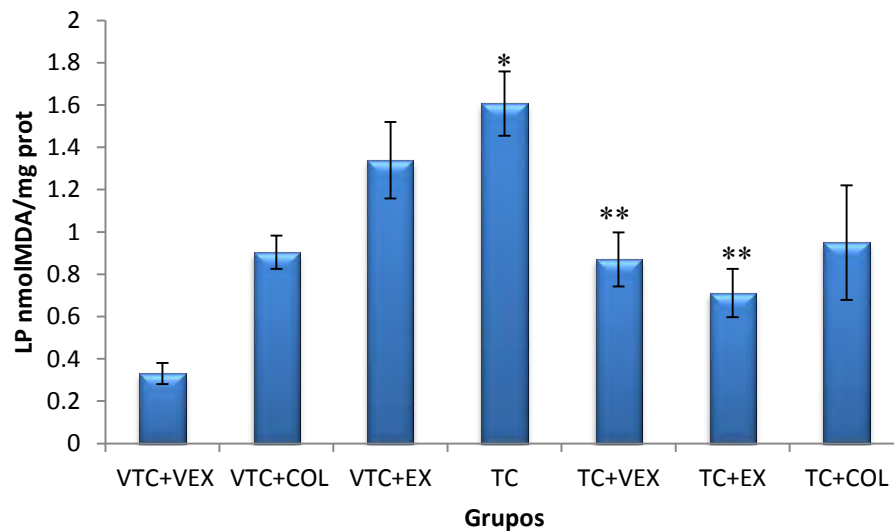
Gráfica 2. Gamma glutamil-transpeptidasa (marcador plasmático de colestasis). Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos \pm EE. * indica la diferencia significativa con respecto al grupo VTC+VEX; ** indica la diferencia significativa con respecto al grupo TC, con una $P < 0.05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls.

- Alanina-aminotransferasa.** La Gráfica 3, muestra la actividad enzimática de ALT que aumenta al doble en el grupo dañado (TC) con respecto al grupo control (VTC+VEX); en el grupo control de extracto (VTC+EX) no se produce necrosis *per se*, pero si la reduce durante la cirrosis (TC+EX). En el grupo TC+VEX (reversión natural) ALT no disminuyó completamente hasta alcanzar los niveles de VTC+VEX, sin embargo, la diferencia con respecto al grupo cirrótico (TC), es significativa. El grupo tratado con colchicina sin daño (VTC+COL), muestra un disminución de aproximadamente un 90% con respecto a VTC+VEX, estos valores vuelven a niveles normales al administrar la colchicina después de haber inducido el daño, tal como se observa en el control positivo (TC+COL). Nuevamente el grupo reto no alcanza diferencia significativa con respecto al grupo de reversión natural.



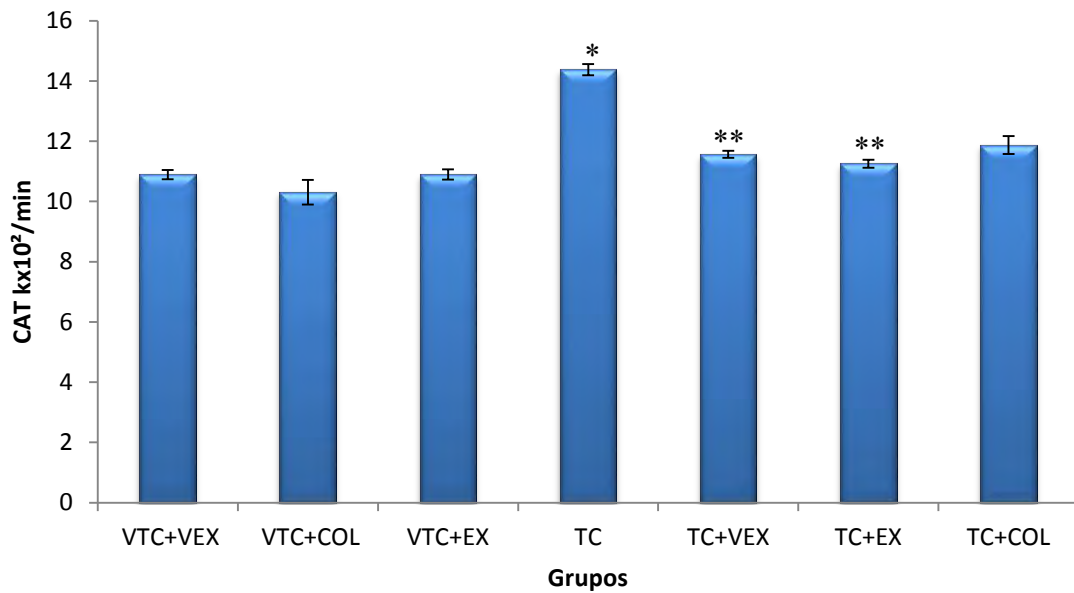
Gráfica 3. Alanina-aminotransferasa (marcador plasmático de necrosis). Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos \pm EE. * indica la diferencia significativa con respecto al grupo VTC+VEX; ** indica la diferencia significativa con respecto al grupo TC, con una $P < 0.05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls.

- Lipoperoxidación.** Se observó un grado marcado de lipoperoxidación (Gráfica 4) en el grupo dañado (TC) con respecto al grupo testigo (VTC+VEX), y en comparación con este mismo, el grupo VTC+EX se mantiene en el mismo nivel; sin embargo, el extracto muestra una tendencia a revertir el daño pues reduce significativamente el grado de lipoperoxidación del grupo reto (TC+EX), con respecto al grupo TC. El grado de lipoperoxidación disminuye a valores normales en los grupos de reversión natural (TC+VEX) y control colchicina (VTC+COL), pese a ello, al administrar la colchicina con el daño (TC+COL), la reversión del daño no es tan marcada como en el caso del TC+EX. Aun así, el grupo TC+EX no alcanza una diferencia significativa con respecto los grupos de reversión natural y control positivo.



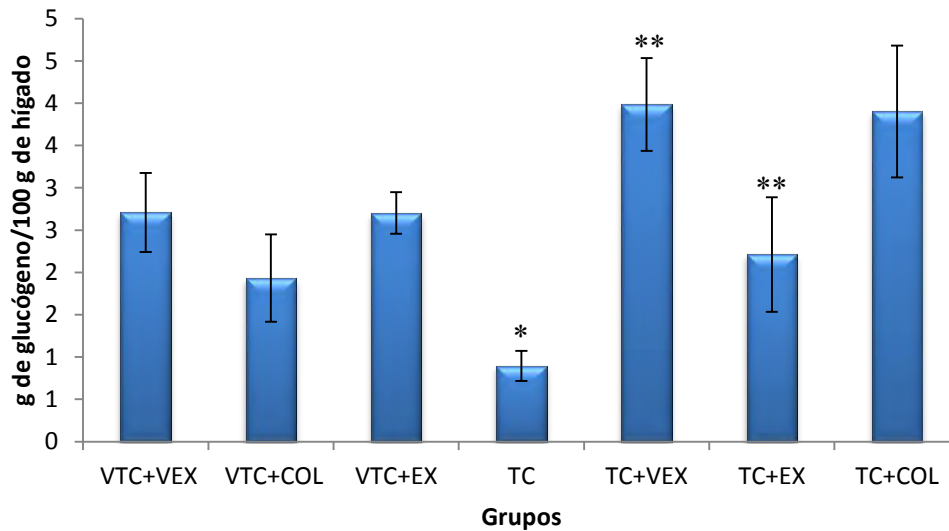
Gráfica 4. Lipoperoxidación (marcador de daño oxidativo membranal). Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos \pm EE. * indica la diferencia significativa con respecto al grupo VTC+VEX; ** indica la diferencia significativa con respecto al grupo TC, con una $P < 0.05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls.

- Catalasa.** La actividad enzimática de catalasa (Gráfica 5) incrementó en un 40% aproximadamente en el grupo dañado (TC) con respecto al control de controles. Los grupos de reversión natural (TC+VEX) y TC+EX, mostraron evidentemente el efecto de reversión del extracto, ya que los niveles disminuyeron hasta el mismo nivel de ratas sanas, es decir, no muestran diferencia significativa con respecto a VTC+VEX. Sin embargo, de igual manera que en los marcadores anteriores no hay diferencia significativa entre la reversión natural y la administración con el extracto.



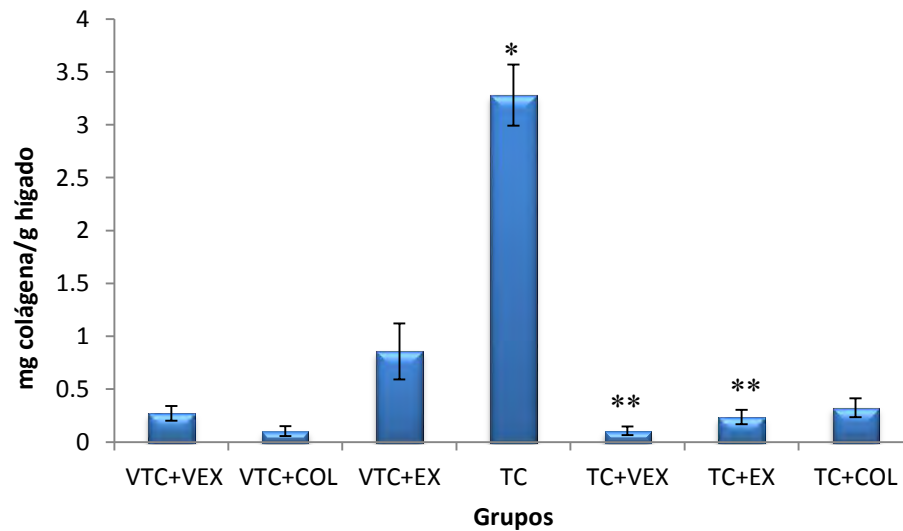
Gráfica 5. Catalasa (indicador de funcionalidad hepática y estrés oxidativo). Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos \pm EE. * indica la diferencia significativa con respecto al grupo VTC+VEX; ** indica la diferencia significativa con respecto al grupo TC, con una $P < 0.05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls.

- Nivel de glucógeno.** Se observó una baja ostensible en la cantidad de glucógeno en el grupo cirrótico (TC) (Gráfica 6), pero el efecto fue revertido por la administración del extracto ya que el nivel de glucógeno de este grupo se elevó hasta valores del grupo control, el grupo de reversión natural mostró el mismo efecto, aunque nuevamente no hay diferencia significativa entre ambos grupos y tampoco con respecto al grupo administrado con colchicina.



Gráfica 6. Glucógeno (indicador de funcionalidad hepática y estrés oxidativo). Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos \pm EE. * indica la diferencia significativa con respecto al grupo VTC+VEX; ** indica la diferencia significativa con respecto al grupo TC, con una $P < 0.05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls.

- Cuantificación de colágena.** Se observa un aumento marcado de colágena en el grupo cirrótico (TC). Asimismo, se observa que la administración del EX, revierte totalmente la fibrosis, es decir, exhibe un efecto fibrolítico, ya que el nivel de colágena del grupo control es muy similar al cuantificado en el grupo reto, así como al nivel del grupo de reversión natural y al administrado con colchicina (Gráfica 7); estos resultados sugieren que además de actividad anticolestática, el EX tiene también un efecto fibrolítico.



Gráfica 7. Colágena (indicador de fibrosis). Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos \pm EE. * indica la diferencia significativa con respecto al grupo VTC+VEX; ** indica la diferencia significativa con respecto al grupo TC, con una $P < 0.05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls.

8.4 Análisis histológico

A continuación se describen las fotografías de las muestras histológicas mostradas en la Figura 9.

- A. La imagen corresponde al grupo cirrótico (TC) y a la muestra se le realizó una tinción tricrómica de Masson. Se identifica tejido fibroso en color azul, esto se debe a la acumulación de proteínas de matriz extracelular como respuesta a la necrosis y destrucción del tejido; también, se observa necrosis extendida por el tejido y un evidente grado de inflamación.
- B. La imagen corresponde nuevamente al grupo cirrótico (TC), en esta ocasión con una tinción de HE. Se observa que la administración del TC, causó una destrucción casi total del tejido; se identifican focos de necrosis, muchas células con necrosis balonizante, inflamación del parénquima, micro y macrovacuolización (esteatosis), los núcleos presentan picnosis y, de hecho, se observa el comienzo de migración celular leucocitaria hacia estos focos de necrosis e inflamación.
- C. Esta imagen representa al grupo VTC+VEX; en este caso, se observa el tejido completamente homogéneo y sano, es decir, los hepatocitos se encuentran dispuestos habitualmente en empalizados celulares. Al centro se aprecia una vena central y sinusoides.
- D. Se observa la muestra representativa del grupo TC+VEX, se evidencia la reversión del daño al suspender la administración de TC, ya que la mayor parte del tejido se encuentra íntegro; se observa necrosis balonizante ligera y limitada a la zona pericentrilobulillar.
- E. En el grupo VTC+COL, se observa el parénquima sano con poca inflamación, los hepatocitos uniformes y bien definidos, lo que demuestra que la administración de colchicina no causa hepatotoxicidad por sí misma. Al centro se aprecia una triada portal bien definida.

- F. Se observa que en el grupo TC+COL, la reversión del daño es mucho menor que el grupo TC+VEX, ya que se presenta un alto grado de inflamación extendida por todo el tejido, células en proceso de necrosis, picnosis, congestión vascular, y necrosis balonizante en la zona pericentrilobulillar.

- G. La imagen del grupo VTC+EX, hace evidente que la administración del extracto no causa ningún tipo de daño *per se*; el tejido se encuentra homogéneo y los hepatocitos bien definidos.

- H. En la muestra del grupo TC+EX se observa una gran mejoría, incluso en comparación con los grupos TC+VEX y TC+COL. Se aprecia la mayor parte del tejido íntegro y en zona pericentral, el daño es discreto.

En conclusión, la administración con TC, causa un daño grave y evidente a nivel celular y extendido por todo el parénquima; sin embargo, la suspensión del hepatotóxico, permite la regeneración del tejido, y de hecho, en mayor grado que utilizando un fármaco comúnmente utilizado en padecimientos hepáticos. Por otro lado, en este análisis, se confirma que la administración del extracto tiene una tendencia a la reversión del daño ya que en las muestras histológicas muestra una mejoría incluso mayor que la reversión natural y el tratamiento con colchicina.

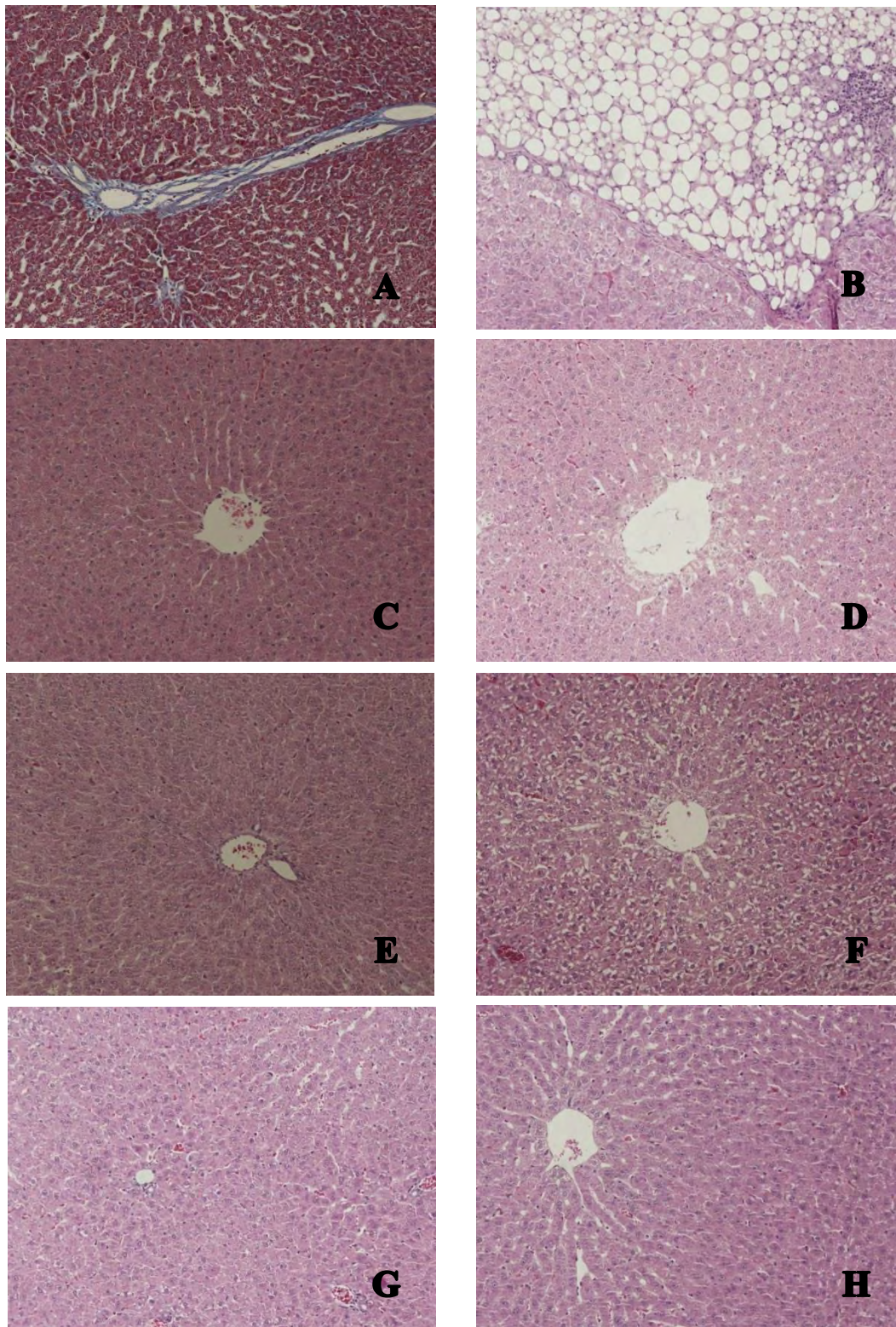


Figura 9. Panel de fotografías de muestras histológicas (aumento 10x). A: Grupo cirrótico (TC), tinción tricrómica de Masson; B: Grupo cirrótico (TC), tinción HE; C: Control de controles (VTC+VEX), tinción HE; D: Reversión natural (TC+VEX), tinción HE; E: Control colchicina (VTC+COL), tinción HE; F: Control positivo (TC+COL), tinción HE; G: Control extracto (VTC+EX), tinción HE; H: Grupo reto (TC+EX), tinción HE.

IX. DISCUSIÓN

El efecto de reversión de la cirrosis por TC observado en la investigación presente, se evaluó con marcadores bioquímicos de colestasis (FA y GGTP), necrosis (ALT), funcionalidad hepática y estrés oxidativo (CAT, LP y glucógeno hepático) y fibrosis (HP) además del análisis histológico; y sugiere una tendencia a la reversión del daño debido al efecto biológico o farmacológico probable como mecanismo de acción del componente mayoritario del extracto (obtenido preliminarmente por IR y CG/EM) en conjunto con los demás componentes presentes en él.

También se presume que el extracto promueve un ligero efecto protector y antioxidante, basado en las pruebas DPPH^{*}, ABTS^{*+} y FRAP realizadas para este estudio, así como los reportes previos del efecto hepatoprotector de extracto hexánico de *C. vulgare*.

9.1 Efecto antioxidante y contenido fenólico del extracto. Acetato de lupenilo: componente mayoritario

El efecto hepatoprotector mostrado en estudios anteriores por *C. vulgare*, 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 del extracto polar metanólico de *C. vulgare* y su efecto hepatoprotector. ^[10, 36]

Particularmente, en este estudio, según los resultados obtenidos en el análisis por IR las $\nu_{\text{máx}}$ obtenidas coinciden con las reportadas en el análisis por IR realizado al acetato de lupenilo en análisis previos. ^[68] Esta sugerencia se refuerza con los resultados obtenidos en el análisis por CG/EM. En ambos análisis (gases y masas) se comparó el tiempo de retención y el patrón de fragmentación, respectivamente, con el tiempo de retención y patrón de fragmentación del acetato de lupenilo reportados también en la literatura y la coincidencia en ambos, sugiere fuertemente la posibilidad de que el componente mayoritario obtenido en el extracto hexánico de *C. vulgare* es acetato de lupenilo ^[68]. Además, este compuesto ha sido identificado en otras dos especies del género, *C. setosum* y *C. japonicum*, por lo tanto, la relación quimiotaxónomica entre especies del mismo género, sugiere nuevamente la presencia del acetato de lupenilo como

componente mayoritario. ^[69,70] Aunado a ello, diferentes efectos benéficos de este compuesto han sido reportados, entre ellos el efecto antiinflamatorio, anticancerígeno, contra artritis, diabetes y enfermedades cardíacas, además de protección renal y hepática. La protección hepática del acetato de lupenilo, se atribuye a que promueve la actividad de antioxidantes endógenos como glutatión reducido, catalasa y superóxido dismutasa; además, ha sido reportado que el acetato de lupenilo disminuye algunos marcadores de daño hepático (inducido por TC) como ALT, LP (medida por MDA) y ON. La actividad antiinflamatoria, particularmente, ha sido asociada a la capacidad del compuesto de disminuir citocinas proinflamatorias (factor de necrosis tumoral- α , TNF- α) y se relaciona también con su actividad inhibitoria sobre el complejo PG sintetasa; ^[71-74] lo anterior refuerza el probable mecanismo de acción inmunomodulador por parte del extracto, a lo que se atribuye la tendencia a la reversión de la cirrosis observada en el estudio presente.

En la investigación presente, la actividad antioxidante encontrada en el extracto resultó ser baja a diferencia de otros extractos, evaluados por diferentes autores en extractos polares, por ejemplo, antioxidantes conocidos como el vino tinto contienen una concentración de fenoles totales de 3500 mg EAG/ L, el arándano 2300 mg EAG/ L y el extracto polar metanólico de la cáscara de granada 2347 mg EAG/ 100 g. ^[75] En el caso de actividad antioxidante medida por el método DPPH^{*}, algunos extractos metanólicos de especies del género *Calophyllum* dan valores entre 15067 y 2651 $\mu\text{mol ET/g}$ (según la estructura de la planta extraída; tallos u hojas, respectivamente); para el caso de ABTS^{**}, estos mismos extractos presentaron valores de 8492 y 39393 $\mu\text{mol ET/g}$, respectivamente; finalmente en el caso del ensayo FRAP 47261 y 30473 mg EAA/g, respectivamente. ^[53] En comparación, los valores aquí obtenidos son muy bajos, esto se debe probablemente a la naturaleza del extracto, ya que en esta ocasión se evaluó un extracto no polar (hexánico); por ello, se sugiere que en este extracto las moléculas polares como los flavonoides no están presentes o se hallan en cantidad muy baja; sin embargo, el extracto contiene diferentes metabolitos secundarios con actividad biológica que promueven un ligero efecto antioxidante. Específicamente, los reportes anteriores sobre *C. vulgare*, la mayoría de los componentes identificados de esta especie son polares o poco polares, por ejemplo, se reporta la presencia de flavonoides: kaempferol-3-O-glucósido, quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-galactósido, apigenina-7-O-diglucósido y genkuanina-4-O-glucósido; ác. fenólicos: p-cumárico,

caféico, ferúlico, gálico, clorogénico, rosmarínico, vaníllico, ferúlico y p-hidroxibenzoico; esteroides: Δ -5-avenasterol, brasicasterol, campesterol, β -sitosterol y estigmasterol, y 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. [6, 7, 36] Las investigaciones realizadas utilizando disolventes no polares para la extracción, como en el caso de los extractos hexánicos de *C. ehrenbergii* y *C. vulgare*, [10, 41, 46] el extracto hexánico de *C. pascuarensis* [76] 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; mismos a los que se atribuye la ligera actividad antioxidante mencionada anteriormente y/o la capacidad inmunomoduladora mediada por receptores nucleares donde se unen esteroides como el acetato de lupenilo, que emulan el efecto de hormonas sexuales o de ácidos biliares hepatoprotectores. [51]

9.2 Reversión de colestasis, necrosis, estrés y daño oxidativo y fibrosis inducidos por TC en ratas

En esta investigación, los marcadores bioquímicos mostraron que el extracto tiene una actividad de reversión de la cirrosis inducida por TC, aunque no se observó una diferencia estadística ($P < 0.05$) con respecto al grupo de reversión natural; sin embargo, sí existe diferencia significativa en cuanto al grupo dañado; por ello, es importante reiterar que la administración del extracto muestra una tendencia a revertir el daño. Debido a ello, se presume que el efecto de reversión podría resultar en mayor grado que la reversión natural si el esquema de administración se ajustara a dos veces por día porque, quizás, el $t_{1/2}$ de eliminación sea corto y requiera ese cambio para asegurar una mejor biodisponibilidad de los componentes hepatoprotectores, e incluso, podría elevarse la dosis del extracto que ha sido evaluado en dosis de hasta 500 mg/kg. [46]

El incremento en marcadores de colestasis tales como la actividad enzimática de FA y GGTP, en el grupo cirrótico se debe a que, durante la colestasis, estas enzimas membranales se liberan a suero a causa de la respuesta inflamatoria que aparece y de la permeabilidad celular aumentada, este incremento en suero puede observarse en casos de cirrosis y hepatitis. [4,14,54] Los resultados

de esta investigación mostraron que la administración del extracto hexánico de *C. vulgare* en el grupo con cirrosis, tiene un efecto colagogo, es decir, disminuyó significativamente el nivel de estos dos marcadores con respecto al grupo cirrótico, el comportamiento de estas enzimas durante el daño, coincide con los resultados de hepatoprotección observados con *C. vulgare* en modelos de daño agudo y crónico, respectivamente y ambos inducidos con TC; así como el extracto hexánico de *C. ehrenbergii* (300 mg/kg) en un modelo de daño crónico con el mismo hepatotóxico, por lo tanto ambas especies también tienen efecto anticoléstatco [10, 41, 46]. Los resultados obtenidos en marcadores de colestasis, sugieren que el extracto no polar, posee propiedades anticoléstatcas o como colagogos de forma similar a los resultados de la evaluación de los extractos polares de varias plantas del mismo género, como se ha comentado anteriormente. Sin embargo, aun con la tendencia exhibida por el extracto, la diferencia no fue significativa con respecto al grupo de reversión natural.

Los niveles enzimáticos elevados de ALT indican la existencia de necrosis; este incremento aparece en casos de cirrosis, colestasis e incluso neoplasias hepáticas. [14] 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 [54]. El extracto hexánico de *C. vulgare* disminuyó significativamente la actividad enzimática de ALT en suero, esto sugiere actividad antinecrótica del extracto; el resultado obtenido, coincide nuevamente con los estudios hepatoprotectores previos de la especie (con dosis de 250 y 500 mg/kg y 300 mg/kg respectivamente) que también muestran la prevención de necrosis en un daño agudo y crónico, respectivamente. 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. [10,41,46] El efecto antinecrótico también se observa en los marcadores ALT y AST con la administración de extractos polares de otras especies, por ejemplo, los extractos metanólicos de *C. setidens* y *Trichosanthes cucumerina* (hepatoprotección y reversión), daño por D-galactosamina y TC respectivamente, y del extracto acuoso de *C. arisanense*, daño provocado por tacrina. [30, 43, 45] El efecto antinecrótico posiblemente se debe a la presencia de metabolitos atrapadores de radicales libres, que aunque en baja concentración evitan el daño en las membranas de los hepatocitos y, en consecuencia, la muerte celular provocada por el estrés

oxidativo generado por agentes hepatotóxicos. ^[77] La prevención, o en el caso de este trabajo, la reversión de la colestasis, conlleva la detención del proceso inflamatorio, que a su vez, causa necrosis de los hepatocitos, por lo tanto la relación entre ambos tipos de marcadores, sugiere nuevamente el efecto antioleostático y colagogo del extracto hexánico de *C. vulgare*; sin embargo, es más probable que ambos efectos estén asociados a la presencia del acetato de lupenilo ya que, como se mencionó anteriormente, promueve la actividad de antioxidantes endógenos y tiene la capacidad de disminuir citocinas proinflamatorias. Ambos efectos se observan en modelos de reversión de la cirrosis que han evaluado diferentes compuestos como el celecoxib, alopurinol, silimarina y colchicina. ^[47,48,50]

Los lípidos componentes de las membranas son esenciales para el sistema de soporte de las células, la destrucción de sus propiedades estructurales puede tener consecuencias fatales para las funciones celulares. La peroxidación de lípidos se considera considerada el efecto principal de la oxidación por radicales libres. La medición de lipoperoxidación mediante TBARS, como el malondialdehído, es un marcador de daño membranar en los hepatocitos; el malondialdehído, es un producto resultante del metabolismo y la muerte celular, por lo tanto, es proporcional al daño. En este marcador, el extracto mostró una evidente reversión del daño oxidativo por TC, aunque nuevamente, no alcanzó una diferencia estadística con respecto al grupo de reversión natural, sin embargo, sigue exhibiendo la tendencia mencionada anteriormente y cabe remarcar que si mostró diferencia significativa en comparación con el grupo cirrótico. Este resultado es similar a la hepatoprotección observada al administrar el extracto hexánico de *C. ehrenbergii* en una dosis de 500 mg/kg y *C. vulgare* (300 mg/kg) en modelos agudo y crónico respectivamente ^[41, 46]. La protección contra la peroxidación lipídica puede atribuirse a la presencia del acetato de lupenilo y otros metabolitos que promueven la actividad antioxidante (en menor cantidad) en los extractos; esto sugiere un mecanismo de acción que implica probablemente receptores nucleares y como se mencionó anteriormente, dicho compuesto promueve también la actividad de antioxidantes endógenos. Por ello, se presume que se detiene el progreso del daño hepático, ya sea suspendiendo el agente hepatotóxico en el caso del grupo de reversión natural o bien, como se observó en este caso, administrando el extracto de *C. vulgare* (actividad antioxidante promovida por el acetato de lupenilo). ^[51]

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 durante enfermedades como la cirrosis y, por ende, hay un incremento de ROS y radicales libres, lo cual se ve reflejado por la acumulación de peróxido de hidrógeno. [3] Sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación muestran un aumento de la actividad de catalasa en respuesta al daño, lo que difiere con otras investigaciones realizadas, en las que catalasa se encuentra en cantidades muy bajas al inducir el daño [3]. La elevación de la enzima en este caso podría deberse a la fase en la que se encuentra el daño, es decir, sí existe una cantidad grande de agentes oxidantes, y la funcionalidad hepática aún es considerable, la catalasa aumentaría tratando de ejercer el efecto antioxidante, a diferencia de una fase más avanzada donde la cantidad de agentes oxidantes supera la capacidad de la enzima. Se observó que el extracto por sí mismo y al ser administrado después del TC y en el grupo de reversión natural, disminuyó significativamente el nivel en este marcador con respecto al grupo cirrótico; este resultado se relaciona nuevamente con la presencia del acetato de lupenilo que como se ha mencionado en ocasiones repetidas, promueve la actividad de antioxidantes endógenos, entre ellos, la catalasa. [51]

El hígado, lleva a cabo funciones de síntesis, depósito y catabolismo del glucógeno, que es su principal fuente de energía, por lo tanto el nivel de glucógeno es uno de los principales marcadores funcionalidad hepática; éste disminuye considerablemente durante el daño. [4,11] El ON, es un mediador del daño hepático, éste puede ser un agente antioxidante pero, en altas cantidades y al ser altamente inestable, puede resultar un efecto contrario y es inducido por citocinas proinflamatorias como TNF- α . Al administrar un hepatotóxico como el TC, el nivel del glucógeno disminuye significativamente e incluso llega a agotarse; [51] por el contrario, el extracto de *C. vulgare* mantuvo los niveles de glucógeno durante el daño crónico por TC. Sin embargo, igual que en cada uno de los marcadores mencionados anteriormente, no se observó diferencia estadística entre el grupo administrado con TC+EX y el grupo de reversión natural. La prevención del daño se ha observado con la administración del mismo extracto pero en dosis de 250 y 500 mg/kg durante el daño agudo y 300 mg/kg en daño crónico, así como el mismo extracto de otras especies como *C. ehrenbergii* durante la cirrosis, ambos inducidos por TC.

[10,41,46] Estos resultados podrían estar relacionados también con la actividad del acetato de lupenilo y la posible inhibición de agentes como el ON, ya que el compuesto y algunos derivados han mostrado actividad inhibitoria contra ON y citocinas proinflamatorias y se presume que promueven un incremento de glucosa, ya que al inhibir al ON, la síntesis de glucógeno y glucogenólisis no se ven afectadas. Asimismo, el hígado queda protegido contra la progresión de colestasis, necrosis y en consecuencia, de fibrosis; es como se logra iniciar la regeneración de la estructura anatómica y la funcionalidad hepática. [51]

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. [3,77] 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. [14] En esta investigación, la administración del extracto, mostró un efecto fibrolítico, es decir revirtió el grado de fibrosis al ser administrado después del daño, nuevamente no mostró diferencia significativa comparándolo contra el grupo de reversión natural ni contra el grupo tratado con colchicina (conocido alcaloide antifibrótico); sin embargo, la tendencia a revertir el daño sigue observándose. Además, el extracto hexánico de *C. vulgare*, también ha mostrado un efecto protector, es decir, antifibrótico, evitando el depósito de colágena en el hígado; de igual forma que otros extractos y con diferentes dosis, otro ejemplo es el extracto hexánico de *C. ehrenbergii*, en una dosis de 300 mg/kg, en el daño crónico por TC. [10,41] Cabe mencionar que igual que en este estudio, otra evaluación de reversión de la fibrosis, utilizando colchicina y silimarina, e induciendo daño por TC, la coadministración con ambos componentes, no mostró actividad fibrolítica significativa con respecto a la reversión natural. [50] 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. [10,14] El Factor de crecimiento transformante (TGF- β), un factor de crecimiento multifuncional, es la citocina profibrogénica más potente secretada por las HSC y es un mediador de la respuesta inflamatoria, de hecho las HSC son la mayor fuente de TGF- β , sin embargo, las células Kupffer, los hepatocitos y las plaquetas también secretar esta

citocina. TGF- β es un mediador clave en la fibrogénesis, ya que favorece la transición de las HSC a células con funciones miofibroblásticas, estimula la síntesis de proteínas componentes de ECM e inhibe su degradación, por lo tanto, la expresión de TGF- β y sus receptores incrementa tras la activación de las HSC. ^[78-80]

La señalización intracelular de TGF- β se lleva a cabo vía proteínas Smad; la unión de TGF- β con el receptor tipo II recluta y fosforila al receptor tipo I. Las proteínas Smad2 y Smad3 son reclutadas al receptor tipo I activado donde ambas son fosforiladas. Las proteínas Smad están involucradas en la activación de macrófagos mediada por TGF- β . ^[78,79] 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, de esto existen reportes de diferentes compuestos vegetales que exhiben propiedades inmunomoduladoras; algunos de ellos son flavonoides glucósidos, ácidos fenólicos, alcaloides, terpenoides y esteroides como el acetato de lupenilo, que como se ha mencionado repetidamente, inhibe citocinas proinflamatorias. ^[51,81]

En ninguno de los marcadores bioquímicos se observó diferencia significativa entre los grupos TC+EX, TC+VEX y TC+COL. Aun así, la presencia de acetato de lupenilo, permite sugerir y proponer que al modificar el esquema de administración del extracto, aumentando la dosis o bien, duplicar la administración diaria, el proceso de reversión se observaría en menos tiempo que en el proceso de reversión natural y en la administración de colchicina. Esta propuesta se refuerza al observar el análisis histológico que será discutido a continuación.

9.3 *Análisis histológico*

Los resultados del análisis histológico, coincidieron con los obtenidos en el análisis bioquímico. En las muestras con tinción HE, la destrucción del tejido es evidente al administrar TC, debido a la necrosis que provoca y todo el daño que conlleva. Por el contrario, en los grupos control de controles, control de extracto y control colchicina (sin administración de TC), el tejido se mantuvo sano y es notable la integridad de las células. En el grupo de reversión natural, se induce la regeneración hepática al suspender el agente hepatotóxico, sin embargo, aún se observó un ligero daño en zona pericentral; a diferencia de ello, la tendencia a revertir el daño por parte del extracto, se evidenció aún más marcadamente con este análisis ya que, al comparar el tejido del grupo reto (TC+EX), contra el grupo TC+COL, es notable la mejoría causada por la

administración del extracto, a diferencia de la administración con colchicina, donde la inflamación del tejido, necrosis, y en general el daño celular se observan mucho más presentes. En la tinción tricrómica de Masson, el tejido fibroso, se halló únicamente en el grupo cirrótico. En el resto de los grupos no se observó la aparición de fibrosis.

El deterioro o destrucción del tejido, incluye principalmente inflamación, necrosis balonzante (en zona pericentral, principalmente, y en el grupo cirrótico extendida por todo el tejido), picnosis, micro y macrovacuolización. La necrosis en zona pericentrilobulillar, es considerada la causa principal de la inducción del daño inducido con TC, aunque también puede ser causada por fármacos (que se metabolizan en el hígado) y otras toxinas, lo que explicaría el daño observado en el grupo administrado con colchicina. ^[82] La necrosis balonzante, también es uno de los primeros y más frecuentes cambios observados cuando se induce daño con TC y se observa en algunas otras condiciones como infecciones virales, daño causado por el consumo de alcohol y obstrucción de conductos biliares. La vacuolización (esteatosis) también es una característica de la administración del TC ^[4,24,82] Cuando el daño es persistente, como el caso del modelo crónico evaluado en esta ocasión, donde el estancamiento biliar es prolongado, la necrosis incrementa significativamente y esto produce fagocitosis por las células Kupffer y en respuesta a ello, se observa claramente, la migración celular hacia los focos de necrosis; ahí intervienen las HSC, que sufren una activación en la que adquieren funciones similares a miofibroblastos, como la secreción de citocinas proinflamatorias, profibrogénicas y comienza el establecimiento de la fibrosis. En el desarrollo de fibrosis están involucradas algunas citocinas entre ellas, el factor de crecimiento transformante- beta ($TGF-\beta$) que es proinflamatoria pero sobre todo profibrogénica y es secretada por las HSC; y otro factor importante con propiedades profibrogénicas es el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF). Al activarse las HSC también se produce ON, por ello, es posible atribuir nuevamente, el efecto fibrolítico del extracto a la presencia del acetato de lupenilo, que como se mencionó anteriormente probablemente promueve la inhibición del ON. ^[14,78-80]

Con relación a lo anterior, algunos fármacos como el celecoxib y alopurinol, además de productos naturales como la silimarina y colchicina, han mostrado tener propiedades preventivas y de reversión contra la fibrosis, aunque es importante recordar que en la administración con

silimarina y colchicina, el efecto fibrolítico no fue significativo con respecto a la reversión natural. ^[50] Los resultados observados en el grupo administrado con extracto coinciden con los obtenidos en el análisis histológico del efecto hepatoprotector del extracto hexánico de *C. vulgare*, y de otras especies como *C. ehrenbergii* y *R. officinalis*. ^[10,41,49]

X. CONCLUSIONES

Según el análisis con IR y CG/EM, el componente mayoritario del extracto es acetato de lupenilo; esto coincide con los datos antiinflamatorios reportados en la literatura sobre dicho compuesto que está presente en otras especies del género *Cirsium*, tales como *C. japonicum* y *C. setosum*; por lo tanto es posible sugerir un mecanismo de acción inmunomodulador del extracto.

El contenido fenólico del extracto hexánico de *C. vulgare* es mínimo al ser un extracto de naturaleza no polar. Sin embargo, contiene diferentes metabolitos secundarios con actividad biológica que promueven un efecto antioxidante no atrapador de radicales libres durante la cirrosis, como el acetato de lupenilo que promueve la actividad de diferentes antioxidantes endógenos.

El extracto hexánico de la inflorescencia de *C. vulgare*, en una dosis de 300 mg/kg diariamente por cuatro semanas, revierte ligeramente los niveles de los marcadores bioquímicos de colestasis, necrosis, daño membranal, estrés oxidativo, funcionalidad hepática y fibrosis; en marcadores de como LP, GGTP y ALT, sin embargo, el extracto únicamente exhibe una tendencia a revertir el daño, debido a que no presentó diferencia significativa en ninguno de los marcadores con respecto al grupo de reversión natural y al grupo administrado con colchicina, sin embargo, el extracto no muestra causar ningún tipo de daño *per se* ya que también se mantiene sin diferencia significativa con respecto al control de controles (VTC+VEX) en todos los marcadores bioquímicos, además en todos ellos, si existe diferencia significativa con respecto al grupo cirrótico (TC).

XI. PERSPECTIVAS

Debido a que no se observó una diferencia significativa con respecto al grupo de reversión natural en ningún marcador, pero si fue evidente la mejoría de la cirrosis con la administración del extracto, se recomienda realizar pruebas toxicológicas como dosis letal 50 (DL-50) del extracto hexánico de las inflorescencias de *C. vulgare*; donde, se recomienda ajustar una dosis mayor del extracto y administrarlo dos veces al día para asegurar su biodisponibilidad y así comprobar si aumenta su efecto de reversión de la cirrosis.

REFERENCIAS

1. Kuntz E, Kuntz HD. Hepatology: principles and practice. Germany: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2006.
2. Instituto Nacional del Cáncer; [actualizado 2016; citado 2017]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/higado>.
3. Galicia-Moreno M, *et al.* Trolox mitigates fibrosis in a bile duct ligation model. *Fundam Clin Pharmacol.* 2013; 27: 308-18.
4. Muriel P. Nitric oxide protection of rat liver from lipid peroxidation, collagen accumulation, and liver damage induced by carbon tetrachloride. *Biochem Pharmacol.* 1998; 56: 773-9.
5. Muriel P, Rivera-Espinoza Y. Beneficial drugs for liver diseases. *J. Appl. Toxicol.* 2008; 28: 93-103.
6. Kozyra M, *et al.* GC/MS analysis of the essential oil isolated from the herb of *Cirsium vulgare* (Savi.) Ten. and its antimicrobial activity. *Annales UMCS.* 2009; 22 (4): 149-54.
7. Kozyra M, Glowniak K. Phenolic acids in extracts obtained from the flowering herbs of *Cirsium vulgare* (Savi) Ten. growing in Poland. *Acta Soc. Bot. Pol. Pol.* 2013; 82 (4): 325-9.
8. Csupor-Löffler B, *et al.* Antiproliferative activity of Hungarian Asteraceae species against human cancer cell lines. Part II. *Phytother. Res.* 2009; 23: 1109-15.
9. Borawska M, *et al.* Enhancement of antibacterial effects of extracts from *Cirsium* species using sodium picolinate and estimation of their toxicity. *Nat Prod Res.* 2010; 24 (10): 554-61.
10. Rodríguez-Pastén A. Evaluación del efecto hepatoprotector del extracto hexánico de la inflorescencia de *Cirsium vulgare* (Asteraceae) en un modelo de cirrosis en rata. Tesis de licenciatura. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2014.
11. Guyton AC, Hall JE. Tratado de Fisiología Médica. US: University of Mississippi Medical Center; 2009.
12. Geneser F. Histología. Sobre bases biomoleculares. Argentina: Médica Panamericana; 2008.

13. Lippert H. Anatomía con orientación clínica. España: Marbán; 2005.
14. Méndez-Sánchez N, Uribe M. Conceptos Actuales en Hepatología. México: Masson Doyma; 2003.
15. Fisiología Médica; [actualizado 2013; citado 2017]. Disponible en: <http://medicinamiguellopez.blogspot.mx/2013/05/lobulillo-hepatico.html>.
16. Herrerías-Gutiérrez JM, *et al.* Tratado de Hepatología. España: Universidad de Sevilla; 1996.
17. Fernández-Martínez E. Síntesis de un análogo de la talidomida (3-ftalimido-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanamida) y su evaluación farmacológica en la cirrosis biliar secundaria en la rata. Tesis de maestría. México: Instituto Politécnico Nacional; 2000.
18. Fox S. Fisiología Humana. España: Interamericana, McGraw-Hill; 2008.
19. Pérez-Tamayo R, López-Corella E. Principios de Patología. México: Médica Panamericana; 2007.
20. México: Secretaría de Salud; [actualizado 2008; 2017]. Disponible en: <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/index.htm>.
21. Secretaría de Salud. Diagnóstico y Tratamiento de la Insuficiencia Hepática Crónica. 2008 [citado 2017]. Disponible en: <http://www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html>.
22. Porth CM. Fisiopatología, salud-enfermedad: un enfoque conceptual. Argentina: Médica Panamericana; 2007.
23. Selema de la Morena G, Martínez-Pérez J. Efecto hepatoprotector inducido por el flavonoide Astilbina frente a un modelo animal tratado con tetracloruro de carbono. *Rev Cubana Plant Med.* 1999; 1 (4): 36-9.
24. Muriel P. Peroxidation of lipids and liver damage en oxidants, antioxidants and free radicals. En: Baskin SI, Salem H, editors. Pennsylvania; 1996. p. 237-57.
25. Calderón de Rzedowski G, Rzedowski J. Flora fanerogámica del Valle de México. Segunda Edición. México: Instituto de Ecología, A.C. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO); 2001.
26. Halevy HA. Handbook of flowering. US: CRC Press; 1998.

27. México: Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO); [actualizado 2009; citado 2017]. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/cirsiumvulgare/fichas/ficha.htm>.
28. Farnsworth NR, Soejarto DD. Global importance of medicinal plants en: Akereke O, Heywood VH, Syngé H, editores. The conservation of medicinal plants. US: Cambridge University Press; 1991. p. 25-50.
29. Muñeton P. Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. Revista Digital Universitaria. México: Universidad Nacional Autónoma de México. 2009; 10 (9).
30. Kumar S, *et al.* Hepatoprotective effect of *Trichosantes cucumerina* Var *cucumerina* L. on carbon tetrachloride induced liver damage in rats. J Ethnopharmacol. 2009; 123: 347-50.
31. Villavicencio-Nieto MA, Pérez-Escandón BE. Plantas útiles del estado de Hidalgo. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 1995.
32. Villavicencio-Nieto MA, *et al.* Plantas útiles del estado de Hidalgo II. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2002.
33. Villavicencio-Nieto MA, Pérez-Escandón BE. Guía de la flora útil de la Huasteca y la zona Otomí-Tepehua, Hidalgo I. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2005.
34. Villavicencio-Nieto MA, Pérez-Escandón BE. Plantas útiles del estado de Hidalgo III. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2006.
35. Liu S, *et al.* Anticancer activity and quantitative analysis of flavone of *Cirsium japonicum* DC. J Nat Prod. 2007; 21 (10): 915-22.
36. Nazaruk J. Antioxidant activity and total phenolic content in *Cirsium* five species from north-east region of Poland. Fitoterapia. 2008; 79: 194-6.
37. Ganzera M, *et al.* Differentiation of *Cirsium japonicum* and *C. setosum* by TLC and HPLC-MS. Phytochem Anal. 2005; 16: 205-9.
38. Nazaruk J, Jakoniuk P. Flavonoid composition and antimicrobial activity of *Cirsium rivulare* (Jacq.) All. flowers. J Ethnopharmacol. 2005; 102: 208-12.

39. Fernández-Martínez E, *et al.* Preliminary Phytochemical and Biological Study of *Cirsium ehrenbergii*. Proc West Pharmacol Soc. 2007; 50: 162-4.
40. Pérez-Escandón BE, *et al.* Lista de las Plantas útiles del estado de Hidalgo. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2003.
41. Alvarado-Baca M. 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. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2012.
42. Park J, *et al.* 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. *Phytother. Res.* 2004; 18: 19-24.
43. Ku K, *et al.* Hepatoprotective Effect of *Cirsium arisanense* Kitamura in tacrine-treated hepatoma Hep 3B cells and C57BL mice. *Am J Chin Med.* 2008; 36 (2): 355-68.
44. Lee S, *et al.* Antioxidant and Hepatoprotective Activities of *Cirsium setidens* NAKAI against CCl₄ – Induced Liver Damage. *Am J Chin Med.* 2008; 36: 107-14.
45. Yoo Y, *et al.* Pectolinarin and pectolinarigenin of *Cirsium setidens* prevent hepatic injury in rats caused by D- galactosamine via an Antioxidant Mechanism. *Biol. Pharm. Bull.* 2008; 31 (4): 760-4.
46. Jiménez-Santana M. 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. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2010.
47. Chávez E, *et al.* Antifibrotic and fibrolytic properties of celecoxib in liver damage induced by carbon tetrachloride in the rat. *Liver Int.* 2010; 30 (7): 969-78.
48. Aldaba-Muruato LR, *et al.* Allopurinol reverses liver damage induced by chronic carbon tetrachloride treatment by decreasing oxidative stress, TGF- β production and NF- κ B nuclear translocation. *Pharmacol.* 2013; 92 (3-4): 138-49.
49. Gutiérrez R, *et al.* Oxidative stress modulation by *Rosmarinus officinalis* in CCl₄-induced liver cirrhosis. *Phytother Res.* 2010; 24 (4): 595-601.

50. Muriel P, *et al.* Resolution of Liver Fibrosis in Chronic CCl₄ Administration in the Rat after Discontinuation of Treatment: Effect of Silymarin, Silibinin, Colchicine and Trimethylcolchicinic Acid. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005; 96: 375-80.
51. Fernández-Martínez E, *et al.* Hepatoprotective effects of nonpolar extracts from inflorescences of thistles *Cirsium vulgare* and *Cirsium ehrenbergii* on acute liver damage in rat. *Phcog Mag.* 2017; xx: xx-xx.
52. Gutiérrez Avella DM, *et al.* Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. Simposio de Metrología. México; 2008.
53. Mesa-Vanegas AM, *et al.* Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. *Rev Cubana Plant Med.* 2010; 15 (2).
54. Kaplan M. *Laboratory Tests en Diseases of the Liver.* US: JB Lippincott Company; 1993; 108-44.
55. Berger L, Rudolph G. Alkaline phosphatase. *Standard methods of clinical chemistry.* US: Meites Academic Press; 1967.
56. Bergmeyer H, *et al.* Enzymes. En: Bergmeyer H, Grabl M, editores. Alemania: Verlag-chemie Weinheim. 1983; 269-70.
57. Glossman M, Neville D. Glutamyl transferase in kidney brush border membranes. *FEBS Letters.* 1972; 19: 340-4.
58. Reitman S, Frnkl SA. A colorimetric for the determination of serum glutamic oxaloacetic pyruvic and glutamic pyruvic transminases. *Am J Clin Pathol.* 1978; 28: 56-63.
59. Woodman D. Assessment of Hepatic Function and Damage in Animal Species. *J. Appl. Toxicol.* 1988; 8 (4): 249-54.
60. Cohen G, *et al.* Measurement of Catalase Activity in Tissue Extracts. *Anal Biochem.* 1969; 34: 30-8.
61. Buege JA, Austin SD. *Methods in Enzymology;* 1978.
62. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-54.
63. Seifter S, *et al.* The estimation of glycogen with the reagent. *Arch Biochem.* 1950; 25: 191.

64. Rojkind M, González E. An improved method for determining special radioactivities of proline and hydroxyproline. *Anal Biochem.* 1974; 57: 1-7.
65. Fortoul T, Castell A. *Histología y biología celular.* México: Interamericana, Mc Graw-Hill; 2010.
66. Álvarez-Amezcu MC. Modificación del curso de la cirrosis experimental con extractos totales de Romero (*Rosmarinus officinalis*). Tesis de maestría. México: Universidad de Colima; 1994.
67. Daniel W. *Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud.* México: Limusa; 2002.
68. Supaluk P, *et al.* New bioactive triterpenoids and antimalarial activity of *Diospyros rubra* Lec. *EXCLI Journal.* 2009; 9: 1-10.
69. Choi Y-J, *et al.* Effects of medicinal herb extracts and their components on steatogenic hepatotoxicity in Sk-hep1 Cells. *Toxicol Res.* 2011; 27: 211–6.
70. Li L, *et al.* Triterpene compounds from *Cirsium setosum*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi = China J Chinese Mater Medica.* 2012; 37: 951–5.
71. Saleem M. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer Lett.* 2009; 285: 109-15.
72. Pranav K, *et al.* Lupeol: Connotations for chemoprevention. *Cancer Lett.* 2008; 263: 1-13.
73. Wal A, *et al.* Lupeol as a magical drug. *Pharmaceutical and biological evaluations.* 2015; 2 (5): 142-51.
74. Geetha T, Varalakshmi P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. *J Ethnopharmacol.* 2001; 76: 77-80.
75. Sánchez-Crisóstomo MI. Efecto antígenotóxico de la cáscara de granada (*Punica granatum* L.) contra el daño producido por la doxorubicina en ratón CD1+. Tesis de maestría. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2015.
76. Pérez-Gutiérrez RM. *et al.* Effect of *Cirsium pascuarensense* on Blood Glucose Levels of Normaglycaemic and Alloxan – diabetic Mice. *Phytother Res.* 2001; 15: 552-4.
77. Muriel P. Role of free radicals in liver diseases. *Hepatol Int.* 2009; 3: 526-36.
78. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *Science in medicine.* 2005; 2: 209-18.
79. Tsukada S, *et al.* Mechanisms of liver fibrosis. *Clinica Chimica Acta.* 2006; 364: 33-60.

80. Aschcroft GS. Bidirectional regulation of macrophage function by TGF- β . *Microbes and infection*. 1999; 1: 1275-82.
81. Patwardhan B, Gautam M. Botanical immunodrugs: scope and opportunities. *Drug Discov Today*. 2005; 10 (7): 495-502.
82. Shi J, *et al.* Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after administration of carbon tetrachloride. *Am. J. Pathol.* 1998; 153: 515-25.