



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Área Académica de Química

Licenciatura en Química

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 CCl_4 en ratas

TESIS

Para obtener el título de:
Licenciado en Química

Presenta:
Maribel Jiménez Santana

Director: Dr. Tomás Eduardo Fernández Martínez

Mineral de la Reforma, Octubre de 2010

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Química Medicinal y Farmacología del Centro de Investigación en Biología de la Reproducción (CIBIOR), del Área Académica de Medicina del Instituto de Ciencias de la Salud, UAEH, bajo la dirección del Dr. Tomás Eduardo Fernández Martínez. Se otorgó una beca de parte de FOMIX-Hidalgo 2008 con clave de proyecto 2008-C01-97092.

AGRADECIMIENTOS

A FOMIX-Hidalgo 2008 por el apoyo económico para la elaboración del presente trabajo.



Mis más sinceros agradecimientos al Dr. Tomás Eduardo Fernández Martínez por haberme tenido la confianza para realizar este trabajo, por todas sus enseñanzas, por los consejos, por la paciencia, por todo lo que me ayudó no sólo para ser mejor estudiante sino también mejor persona, ¡muchas gracias Doctor!. Agradezco a la Dra. Erika Vázquez Tzompantzi por su colaboración para la realización de dicho trabajo.



Agradezco a Dios por haberme dado una familia maravillosa, a quienes debo todos los esfuerzos y el amor incondicional para conmigo, a mis padres: Eduardo Jiménez Montiel y Matilde Santana Monroy, a mis hermanos: Carlos Alberto y Marisol, a mi sobrino Gabrielito por dar alegría a mi vida, a mi abuelito Eduardo Jiménez Flores y a mis tíos por creer en mí.



Agradezco a mis amigos: Yohany, Gisell, Noemí, Fanny, Marcos, Nayely, Claudia, Erick, Laura, Lisbeth, Christiaan y Christianne por apoyarme siempre. Mi gratitud hacia a mis compañeros y amigos de laboratorio Monserrat, Magali, Rosario, René y Elvia.

Mi gratitud hacia Daniel, quien me ha apoyado siempre a pesar de los problemas que se han presentado.



Finalmente agradezco a los profesores y doctores quienes con sus consejos ayudaron a la terminación de este trabajo de tesis.

DEDICATORIA

“El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir.”

Albert Einstein.



Con amor... A mi familia

ÍNDICE

RESUMEN	1
1.- INTRODUCCIÓN	2
1.1.- Hígado: anatomía	2
1.1.1.- Irrigación sanguínea hepática	3
1.1.2.- Histología hepática	4
1.1.2.1.- El hepatocito	5
1.2.2.2.- Células sinusoidales	6
1.2.- Sistema biliar	9
1.2.1.- Vesícula biliar	9
1.2.2.- Bilis	10
1.2.2.1.- Ácidos biliares	10
1.3.- Fisiología del hígado	12
1.4.- Enfermedades hepáticas	12
1.4.1.- Colestasis	12
1.4.2.- Cirrosis	13
1.4.3.- Enfermedad hepática alcohólica	13
1.4.4.- Hepatotoxicidad e importancia del citocromo P-450	14
1.5.- Modelos de daño hepático	15
1.6.- Marcadores bioquímicos de daño hepatocelular	17
2.- ANTECEDENTES	22
2.1.- La actividad hepatoprotectora de especies del género <i>Cirsium</i>	27
2.2.- Propiedades terapéuticas de especies del género <i>Cirsium</i>	30
2.3.- Especies del género <i>Cirsium</i> en el estado de Hidalgo	31
2.3.1.- <i>Cirsium vulgare</i>	31
2.3.2.- <i>Cirsium ehrenbergii</i> Sch. Bip.	32
3.- JUSTIFICACIÓN	34
4.- HIPÓTESIS	37
5.- OBJETIVOS	38
5.1.- Objetivo general	38

5.2.- Objetivos específicos	38
6.- METODOLOGÍA	39
6.1.- Preparación de extractos hexánicos de <i>C. vulgare</i> y <i>C. ehrenbergii</i>	39
6.2.- Grupos experimentales	40
6.3.- Determinación de parámetros bioquímicos	41
6.3.1.- Determinación de FA	42
6.3.2.- Determinación de ALT	42
6.3.3.- Determinación de GGTP	43
6.3.4.- Determinación de bilirrubinas	43
6.3.5.- Determinación de glucógeno hepático	43
6.3.6.- Determinación del grado de peroxidación lipídica	44
6.3.7.- Determinación de proteínas	44
6.3.8.- Determinación de óxido nítrico en hígado	44
6.3.9.- Histología	45
6.4.- Análisis estadístico	45
7.- RESULTADOS	47
7.1.- Resultados de los marcadores bioquímicos de daño	47
7.2.- Resultados de histología	54
8.- DISCUSIÓN	57
9.- CONCLUSIONES	63
10.- BIBLIOGRAFÍA	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Ubicación del hígado	2
Fig. 2 Anatomía del hígado	3
Fig. 3 (A) Lobulillo de Kiernan, (B) acino hepático	4
Fig. 4 El hepatocito	5
Fig. 5 El sinusoides hepático	7
Fig. 6 Células sinusoidales	8
Fig. 7 Vesícula biliar	9
Fig. 8 Ácidos biliares primarios	11
Fig. 9 (3) Glicina y (4) taurina	11
Fig. 10 Ácidos biliares secundarios	11
Fig. 11 Metabolismo del etanol	14
Fig. 12 Reacción catalizada por ALT	17
Fig. 13 Clasificación de bilirrubinas	19
Fig. 14 Estructura de la colchicina	26
Fig. 15 Isómeros de la silimarina	26
Fig. 16 Estructura de la curcumina	27
Fig. 17 Estructura del α -tocoferol	28
Fig. 18 Estructura de ácido graso	28
Fig. 19 Estructura de esterol	28
Fig. 20 Estructura de la pectolarina	28
Fig. 21 Estructura de la pectolarigenina	29
Fig. 22 Estructura del hipidulin neoesperidosido	29
Fig. 23 <i>Cirsium vulgare</i>	31
Fig. 24 <i>Cirsium ehrenbergii</i>	32
Fig. 25 Distribución porcentual de las defunciones registradas por principales causas de muerte según sexo, INEGI-2007	35
Fig. 26 Mapa de ubicación de especies	39
Fig. 27 Aparato de extracción de Soxhlet	40
Fig. 28 Esquema de tratamiento	41

Fig. 29 Actividad enzimática de FA	47
Fig. 30 Actividad enzimática de GGTP	48
Fig. 31 Actividad enzimática de ALT	49
Fig. 32 Determinación de bilirrubinas directas	50
Fig. 33 Determinación de bilirrubinas totales	51
Fig. 34 Grado de peroxidación lipídica	52
Fig. 35 Cuantificación de glucógeno	53
Fig. 36 Determinación de nitratos/nitritos	54
Fig. 37 Panel histológico de la tinción hematoxilina/eosina (10X)	56
Tabla 1 Plantas medicinales del estado de Hidalgo usadas en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades hepáticas	22

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

ADH	deshidrogenasa de alcohol
ADN	ácido desoxirribonucleico
ALDH	deshidrogenasa de aldehído
ALT	alanina aminotransferasa
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
AST	transaminasa de aspartato
ATP	trifosfato de adenosina
°C	grados Celsius
cm	centímetro
CYP	citocromo P-450
CYP1	tipo de enzima que pertenece al citocromo P-450
CYP2	tipo de enzima que pertenece al citocromo P-450
CYP2B1	tipo de enzima que pertenece al citocromo P-450
CYP2B2	tipo de enzima que pertenece al citocromo P-450
CYP2E1	tipo de enzima que pertenece al citocromo P-450
Ece250	extracto de <i>Cirsium ehrenbergii</i> en dosis de 250 mg/Kg
Ece500	extracto de <i>Cirsium ehrenbergii</i> en dosis de 500 mg/Kg
Ecv250	extracto de <i>Cirsium vulgare</i> en dosis de 250 mg/Kg
Ecv500	extracto de <i>Cirsium vulgare</i> en dosis de 500 mg/Kg
eNOS	sintasa del óxido nítrico tipo endotelial
FA	fosfatasa alcalina
Fig.	figura
g	gramo
GGTP	gamma-glutamil traspeptidasa
h	hora
IMSS	Instituto mexicano del seguro social
INEGI	Instituto nacional de estadística y geografía
iNOS	sintasa del óxido nítrico tipo inducible

Kg	kilogramo
Km	kilómetro
M	molaridad
MDA	malondialdehído
mg	miligramo
ml	mililitro
μL	microlitro
mm	milímetro
μm	micrómetro
mM	milimolar
N	normalidad
n	tamaño de muestra
NADH	dinucleótido de nicotinamida y adenina, forma reducida
NAD ⁺	dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADH	dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma reducida
NADP	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida
NF-κB	factor nuclear
NK	natural killers o linfocitos NK
nm	nanómetro
nNOS	sintasa del óxido nítrico tipo neuronal
NOS	sintasas del óxido nítrico
ON	óxido nítrico
pH	potencial de iones hidronio
RE	retículo endoplásmico
rpm	revoluciones por minuto
TBA	ácido tiobarbitúrico
TC	tetracloruro de carbono
TNF-α	factor de necrosis tumoral
U	unidades
VE	vehículo del extracto: <i>Cirsium vulgare</i> o <i>Cirsium ehrenbergii</i>
VTC	vehículo de tetracloruro de carbono

RESUMEN

Las enfermedades hepáticas son consideradas como una de las causas principales de mortandad en nuestro país y sus tratamientos no son suficientes, por lo que se buscan nuevas alternativas que sean efectivas para aliviar estas hepatopatías (Muriel, 2003). En la búsqueda de medicamentos sintéticos y fitomedicamentos que posean dicha actividad farmacológica se han encontrado aquellos capaces de prevenir el daño hepático tal es el caso del análogo del ácido cafeico (ácido 4-hidroxicinámico) (Rico-Almanza, 2003), la colchicina (Muriel y Rivera-Espinoza, 2008) y algunos análogos sintéticos de la talidomida (Fernández-Martínez *et al.*, 2008) con el fin de ofrecer más alternativas farmacológicas en la terapia hepática.

En el presente trabajo se evaluó el efecto hepatoprotector de los extractos hexánicos de las flores de dos especies del género *Cirsium*, *C. vulgare* y *C. ehrenbergii*, en un modelo de daño agudo al hígado con tetracloruro de carbono (CCl₄, TC). Se utilizaron ratas Wistar macho, para formar 8 grupos (n = 6): VE + VTC, VE + TC, Ece500 + VTC, Ecv500 + VTC, Ece500 + TC, Ecv500 + TC, Ece250 + TC y Ecv250 + TC, que fueron administrados de acuerdo a un esquema de tratamiento previamente establecido con dos dosis de extractos (250 mg/Kg y 500 mg/Kg). Se realizaron las determinaciones de marcadores de daño a partir de muestras de plasma (fosfatasa alcalina, gamma-glutamil transpeptidasa, alanina aminotransferasa, bilirrubinas directas y totales) y de tejido hepático (grado de peroxidación lipídica, cuantificación de proteínas, glucógeno, óxido nítrico y análisis histológico). Los resultados se analizaron estadísticamente, los cuales mostraron que ambos extractos tienen la capacidad de prevenir el daño provocado por tetracloruro de carbono en ambas dosis y de forma similar.

La actividad protectora que mostraron los extractos contra el deterioro hepatocelular, el estrés oxidativo y el efecto antioleostático y antinecrótico frente al daño inducido con tetracloruro de carbono se podría atribuir a los compuestos presentes en el extracto floral, cuya posible capacidad antioxidante, puede deberse a una alta concentración de compuestos fenólicos atrapadores de radicales libres.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Hígado: anatomía

Es un órgano que se forma a partir del día 18 de gestación y su importancia en el feto radica en la hematopoyesis, la cual inicia a partir de la quinta semana de la gestación y desaparece después de la segunda semana del nacimiento (Aguirre-García, 2003).

El hígado es considerado como una glándula voluminosa de forma semiovoidea que se encuentra ubicada en el hipocondrio derecho, abarcando el epigastrio y el hipocondrio izquierdo, como se observa en la Fig. 1. Es de color rojo oscuro, posee cierta consistencia que permite que los órganos vecinos lo opriman; en promedio en una persona adulta, mide 28 cm en sentido transversal y 8 cm de espesor en la parte más voluminosa, contiene de 800 a 900 g de sangre y tiene un peso promedio de 1500 g (Rouviere, 1979; Quiroz-Gutiérrez, 2002).

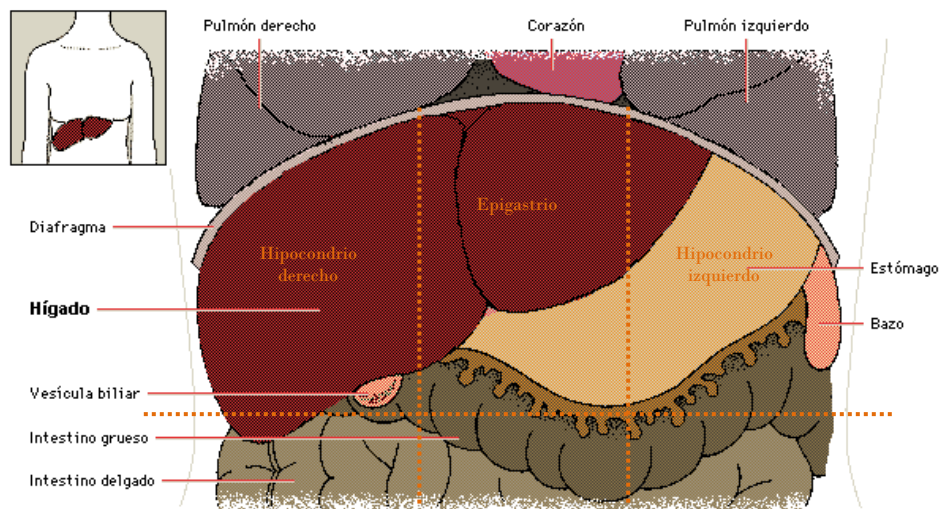


Fig. 1 Ubicación del hígado

El hígado está sostenido por un tejido conjuntivo muy denso que une el diafragma y la cara posterior del mismo, y por la vena cava inferior a la que se encuentran adheridas las venas suprahepáticas (Rouviere, 1979).

El hígado consta de dos lóbulos, derecho e izquierdo, separados por una hendidura longitudinal que contiene un ligamento, denominado falciforme, y parte del conducto venoso. Cada lóbulo se divide en segmentos anterior y posterior, cada uno de ellos puede subdividirse también como superior e inferior, provistos de ramas específicas de los conductos biliares, arterias hepáticas y vena porta (Schaffner y Popper, 1987; Méndez-Sánchez *et al.*, 2005).

1.1.1.- Irrigación sanguínea hepática

El hígado recibe sangre de la vena porta y la arteria hepática. La vena porta se encarga de transportar sustancias alimenticias al estómago y los intestinos y es la mayor estructura que se encuentra en el espacio porta; la vena está rodeada por una membrana basal y una envoltura de colágena, su endotelio es plano y fino, excepto cuando la presión arterial total es elevada, y mide un poco más de 1 cm de diámetro; habitualmente, se unen a esta vena las venas coronaria, pilórica, pancreático-duodenal superior y cística (Schaffner y Popper, 1987).

La arteria hepática aporta sangre oxigenada proveniente del corazón. Se origina en el tronco celiaco, al penetrar en el hígado se divide en dos ramas: derecha e izquierda, en donde es prácticamente una arteria terminal (Schaffner y Popper, 1987).

La sangre suministrada al hígado se vacía por la vena cava inferior. Los vasos principales responsables de llevar a cabo la irrigación de sangre en el hígado se muestran en la Fig. 2.

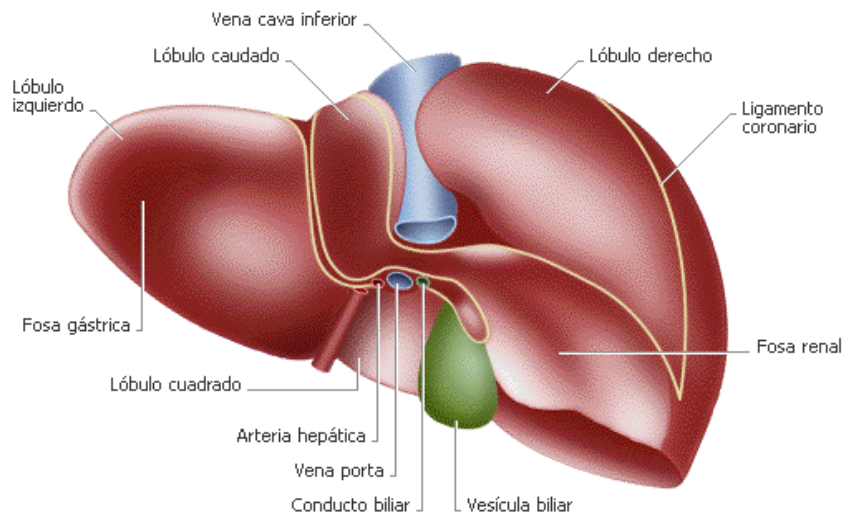


Fig. 2 Anatomía del hígado

1.1.2.- Histología hepática

El hígado posee unidades estructurales concebidas desde diferentes puntos de vista. El lobulillo de Kiernan o lobulillo hepático está representado como un hexágono, en donde a cada ángulo de dicho polígono le concierne un espacio porta y en la porción central se encuentra la vena o vénula centrolobulillar, está delimitado por tejido conectivo y placas de hepatocitos situadas a modo de radios (Aguirre-García, 2003).

El ácino hepático definido por Rapapport en 1954 (Aguirre-García, 2003), cuya forma es oval o romboidal, es la parte de tejido irrigada por una vénula porta terminal y la arteriola hepática. El acino de Rapapport se divide en tres zonas: la zona 1 es la que rodea al espacio porta y corresponde a la porción periférica del lobulillo clásico o área periportal; la zona 2 comprende la porción intermedia del lobulillo de Kiernan y la zona 3 corresponde a la porción centrolobulillar. Estas zonas diferentes tienen implicaciones funcionales relacionadas con actividades enzimáticas, por ejemplo, la liberación de glucosa, el metabolismo oxidativo, la formación de urea y la excreción de bilirrubina son funciones de la porción periportal, mientras que la síntesis de lípidos y la asimilación de glucosa es responsabilidad de la parte centrolobulillar. Estas funciones específicas se basan en la saturación de oxígeno en los tejidos (Schaffner y Popper, 1987; Aguirre-García, 2003).

Actualmente se han definido otras unidades funcionales, pero cabe señalar que el lobulillo de Kiernan y el acino de Rappaport son utilizadas para describir alteraciones histológicas en el hígado; ambas unidades se muestran en la Fig. 3.

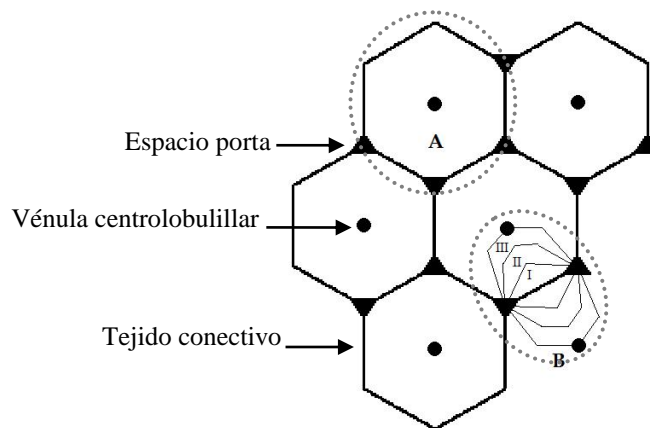


Fig. 3 (A) Lobulillo de Kiernan, (B) acino hepático

El espacio porta es una zona con colágena de tipo I en donde se encuentran conductos biliares y ramas de la arteria hepática y de la vena porta, a este conjunto de estructuras se les ha denominado triadas, aunque análisis histológicos han demostrado que la estructura del hígado no es uniforme, ya que pueden existir, en algunas ocasiones, diadas y rara vez mónadas. El 38% de los espacios porta no tienen venas, el 9% carece de arterias y el 7% no contiene conductos biliares, es común encontrar vasos linfáticos, pocos linfocitos y nervios (Aguirre-García, 2003).

1.1.2.1.- El hepatocito

Son las células más numerosas que se encuentran en el hígado y corresponden al 78% de su volumen total, son parecidas a un poliedro de 12 lados que mide en promedio 25 μm , presenta pocas modificaciones respecto al modelo de célula animal básica a pesar de las complejas funciones, y contiene en su membrana microvellosidades (Fig. 4) (Schaffner y Popper, 1987).

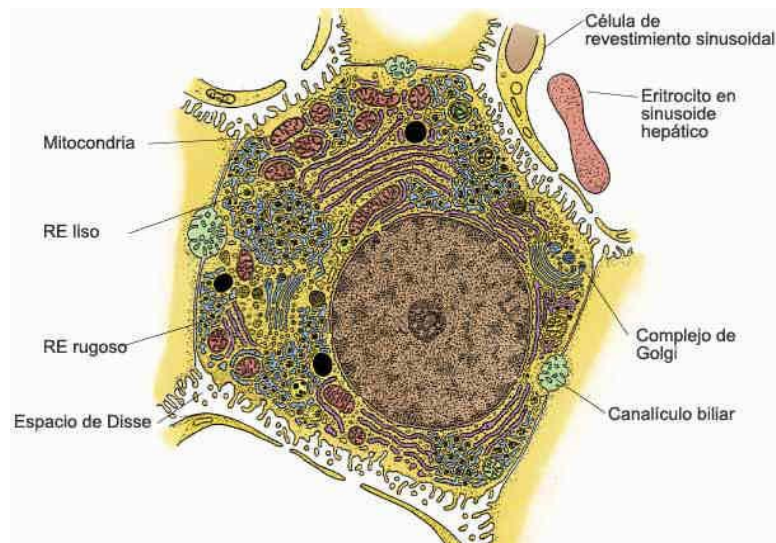


Fig. 4 El hepatocito

En el citoplasma de estas células aparecen organelos de diversos tipos, suspendidos en el citosol o en el jugo celular rico en proteínas. Los organelos más importantes son las mitocondrias ya que su tamaño, y posiblemente el número de ellas, se relaciona con el oxígeno que recibe la célula y el órgano en sí. El hepatocito humano contiene en promedio 2,300 de estas estructuras que poseen su propio ácido

desoxirribonucleico (ADN), el cual es diferente al ADN nuclear. También pequeñas cantidades de ácido ribonucleico (ARN). Su función es transformar la energía almacenada por la célula en forma de glucosa, en energía biológica creando puentes de fosfato de adenosin trifosfato (ATP) ricos en energía (Schaffner y Popper, 1987).

El retículo endoplasmático ocupa alrededor del 15% del volumen de la célula, adopta la forma de rebordes paralelos, es la estructura donde se libera glucosa a partir de glucosa-6-fosfato. A lo largo de los rebordes aparecen pequeñas partículas denominadas ribosomas, las que proporcionan un aspecto rugoso y se encargan de seleccionar, alinear y unir aminoácidos, transportados por el ARNt, a las cadenas peptídicas. La presencia de ribosomas sueltos o aislados es signo de lesión (Schaffner y Popper, 1987).

El aparato de Golgi aparece como una pila de sáculos rodeados por numerosas vesículas, se encarga de llevar a cabo la adición de carbohidratos a ciertas proteínas para formar glucoproteínas (Schaffner y Popper, 1987).

En un adulto los hepatocitos se disponen en láminas que tienen una célula de grosor. En el feto y en niños estas láminas tienen un grosor de dos células. Se encuentran unidos entre sí por medio de zonas de inserción a las que se denomina complejo de unión. Entre las láminas existe una separación que consiste en un laberinto ocupado por sinusoides, que se comunican entre sí para asegurar una máxima exposición. Al menos dos superficies de cada célula están en contacto con el denominado espacio de Disse que se localiza entre los hepatocitos y los canales vasculares sanguíneos (Schaffner y Popper, 1987; Aguirre-García, 2003).

1.1.2.2.- Células sinusoidales

El sinusoides hepático (Fig. 5) es un sistema de canales vasculares que se comunican entre sí. Se encarga de distribuir la sangre, de nutrir a las células hepáticas y mantenerlas vivas y de permitir la transferencia de elementos absorbidos en el intestino para su transformación intracelular (Schaffner y Popper, 1987).

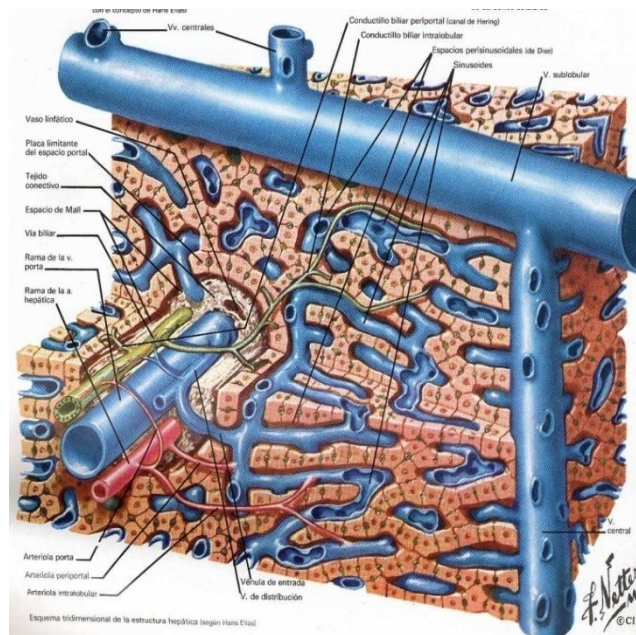


Fig. 5 El sinusoides hepático

Existen diferentes tipos de células encontradas en el sinusoides:

- I. Células endoteliales (Fig. 6): son las más abundantes, constituyen el 70% de las células sinusoidales y pueden ser destruidas por los efectos de toxinas, alcohol, hipoxia, virus, etc., lo que provoca que los hepatocitos permanezcan expuestos y por lo tanto vulnerables al daño (Kuntz y Kuntz, 2006). Son de forma plana, alargada y en el citoplasma muestra fenestraciones que le permiten comunicarse y transportar sustancias entre sinusoides y el espacio de Disse, participan en la coagulación, fibrinólisis, reacciones inflamatorias, respuesta inmunitaria, regulación de la presión sanguínea, angiogénesis y en el metabolismo de lípidos (Aguirre-García, 2003).
- II. Células estelares (Fig. 6): también denominadas células de Ito o células cebadas (por almacenar grasa), se encuentran en los espacios de Disse y en el estado embrionario aparecen a partir de la sexta u octava semana de gestación (Aguirre-García, 2003). Constituyen del 3-8% del peso total de hígado y son capaces de sintetizar colágena tipo I, III y IV, fibronectina, laminina, entre otros; además de que juegan un papel muy importante en la fibrogénesis cuando existe daño con TC y etanol (Kuntz y Kuntz, 2006), se encargan de producir y mantener la matriz extracelular, el control del tono vascular, almacenan retinoides, llevan a

cabo la cicatrización y regeneración ya sea bajo condiciones normales o condiciones patológicas (Aguirre-García, 2003).

- III. Células de Kupffer (Fig. 6): denominadas así por K. W. Von Kupffer, constituyen cerca del 25% de las células del sinusoides, y del 8 al 12% del total de las células del hígado; el número de células por mg de hígado es de aproximadamente 31,000 con un tiempo de vida media de 12.4 días. Se encuentran distribuidas aleatoriamente en el endotelio y el sinusoides, pero en mayor proporción en la región periportal. La función principal de estas células es llevar a cabo la fagocitosis que se puede ver modificada por alcohol y otras sustancias exógenas (Kuntz y Kuntz, 2006), pero también se encargan de la captación y el metabolismo de los lípidos, la eliminación de eritrocitos viejos, la degradación de hemoglobina, el almacenamiento de hierro y el catabolismo de algunas enzimas (Aguirre-García, 2003).
- IV. Linfocitos NK (natural killers) (Fig. 6): también denominadas células de Pit, se encuentran en el espacio de Disse, participan en la destrucción de células tumorales y de los hepatocitos infectados por virus (Aguirre-García, 2003). La proporción de células Pit y células Kupffer es de 2:10 (Kuntz y Kuntz, 2006).

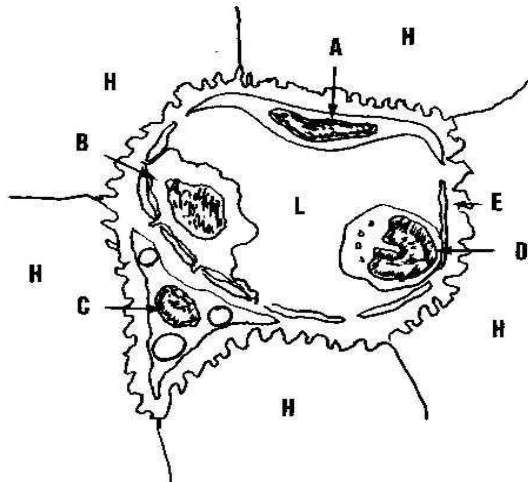


Fig. 6. Células sinusoidales

A) célula endotelial. B) célula de Kupffer. C) célula estelar. D) célula de Pit. H) hepatocito. E) espacio de Disse. L) luz del sinusoides.

1.2.- Sistema Biliar

Se refiere al conjunto de conductos por los cuales circula la bilis, iniciando en el hígado y finalizando en el duodeno (Garrigues y Ponce, 1996). El hígado humano en un adulto tiene más de 2 Km de conductos biliares los cuales tienen la capacidad de modificar el flujo, gracias a las células que forman los conductos, y la composición de la bilis en respuesta a hormonas y neurotransmisores (Suchy, 2004).

1.2.1.- Vesícula biliar

La vesícula biliar se desarrolla en el embrión a partir del tercer mes de gestación y los pliegues que contiene se forman en el último período. Se origina a partir de células hepáticas endodérmicas y hepatoblastos (Suchy, 2004). Es un saco con forma de pera (ver Fig. 7) que se encuentra ubicado en la superficie dorsal del lóbulo derecho del hígado. Sus dimensiones, en el adulto, son en promedio 10 cm de largo, 3 a 4 cm de ancho y de 1 a 2 mm de grosor de la pared. Su capacidad es de 50 mL, pero debido a la elasticidad del tejido, la vesícula biliar puede aumentar su volumen al doble (Garrigues y Ponce, 1996). Posee numerosos pliegues que le permiten aumentar la superficie de absorción y está dividida en cuatro partes: el fondo, el cuerpo, el infundíbulo o saco de Hartmann y el cuello. Su función principal es la de almacenar y permitir que los ácidos biliares sean vaciados al duodeno en una alta concentración y así solubilizar los lípidos (Suchy, 2004).

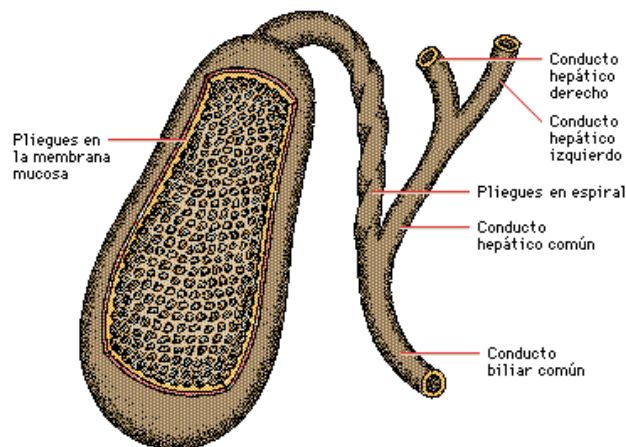


Fig. 7 Vesícula biliar

La arteria cística es la encargada de irrigar a la vesícula biliar y se deriva de la arteria hepática derecha; esta irrigación se realiza en dos formas, una superficial y una profunda, la sangre es drenada de la vesícula biliar y de los conductos císticos hacia la vena porta, aunque en algunas ocasiones suele dirigirla a los sinusoides hepáticos (Suchy, 2004).

La pared de la vesícula biliar se encuentra cubierta por una mucosa, formada por células de epitelio, una lámina propia, una túnica muscular que es gruesa y contiene fibras musculares lisas en espirales y longitudinales, y una túnica serosa. En el cuello de la vesícula se encuentran glándulas encargadas de producir moco (Suchy, 2004).

1.2.2.- Bilis

Es una solución micelar compleja compuesta por agua, electrolitos inorgánicos (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+}), ácidos biliares, bilirrubina, fosfolípidos (fosfatidilcolina), colesterol, péptidos, aminoácidos (glutación, glutamato, aspartato, glicina) y pigmentos biliares, cada uno en proporciones variadas, siendo los ácidos biliares los compuestos predominantes. Se estima que la producción de bilis está entre los 500 y 600 mL/día y es esencial para el buen funcionamiento del hígado, para llevar a cabo la digestión y absorción de lípidos en el intestino, la homeostasis del colesterol, así como la excreción de xenobióticos, fármacos y algunos metales pesados (Suchy, 2004).

1.2.2.1- Ácidos biliares

Son productos hidrosolubles que poseen funciones biológicas múltiples y son sintetizados a partir del colesterol y una de las rutas importantes para su eliminación es mediante la excreción fecal. Su determinación en líquidos corporales se utiliza en el diagnóstico de enfermedades intestinales y hepáticas (Méndez-Sánchez, 2003).

Los ácidos biliares primarios (ver Fig. 8) son aquellos que se sintetizan a partir del colesterol en los hepatocitos periportales, es un proceso donde el colesterol insoluble se modifica para formar dos compuestos solubles en agua: ácido cólico (**1**) con tres grupos hidroxilo en los carbonos C-3, C-7 y C-12 y el ácido quenodesoxicólico (**2**) con dos grupos hidroxilo en las posiciones C-3 y C-7, los cuales se amidan con la

glicina (3) o taurina (4) (ver Fig. 9) para así formar cuatro ácidos conjugados: glicocólico, taurocólico, glicoquenodesoxicólico y tauroquenodesoxicólico.

Los ácidos biliares secundarios (ver Fig. 10), el ácido desoxicólico (5) y ácido litocólico (6) se forman a partir de los primarios por la acción bacteriana en el intestino bajo condiciones anaerobias, donde el cambio importante en ambos compuestos es la 7-deshidroxilación, y también se amidan con glicina o con taurina. La amidación de los ácidos biliares o también llamada conjugación juega un papel importante en la difusión de éstos a través de las membranas celulares, ya sea a lo largo del árbol biliar o en el intestino delgado, ya que sólo se absorben si existe un transportador específico y el efecto neto de este proceso es mantener una concentración adecuada de ácidos biliares en el intestino delgado que faciliten la digestión y la absorción de grasas, colesterol y vitaminas liposolubles (A, D, E y K) (Suchy, 2004).

Los ácidos biliares también tienen la capacidad de ligar calcio y así evitar la formación de cálculos de este elemento en la vesícula (Suchy, 2004).

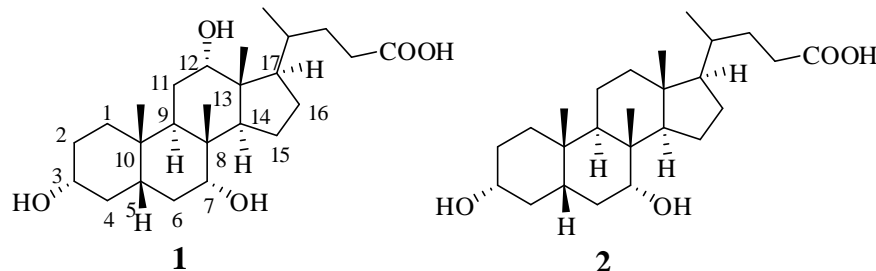


Fig. 8 Ácidos biliares primarios

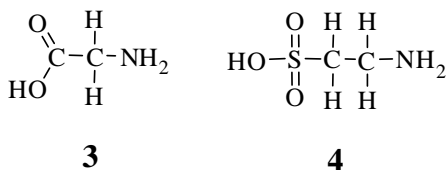


Fig. 9 (3) Glicina y (4) taurina

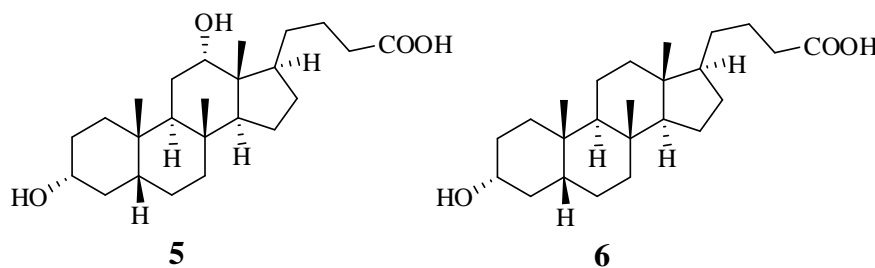


Fig. 10 Ácidos biliares secundarios

1.3.- Fisiología del hígado

Es un órgano que desempeña funciones específicas indispensables para el bienestar físico, como lo son: el consumo y almacenamiento de glucosa, la cual es liberada por el hígado a partir del glucógeno, y la conversión de ésta a partir de galactosa y fructosa. Lleva a cabo varios procesos como el metabolismo de lípidos, aminoácidos, proteínas, vitamina A, bilirrubinas, etc., la degradación de ácidos grasos en compuestos más pequeños (aportan energía), la síntesis de colesterol, también sirve de suministro energético en períodos de ayuno, transporta material de desecho de otros órganos transformándolo en combustible metabólico o los libera como parte de excreciones urinarias o fecales, se encarga de desintoxicar compuestos como hormonas y venenos y realiza la biotransformación de fármacos (Jenkins y Billing, 1987).

1.4.- Enfermedades hepáticas

Son trastornos que modifican el funcionamiento del hígado, pueden transmitirse genéticamente o pueden ser la causa algunos agentes externos como: fármacos, consumo de alcohol, toxinas, anestésicos, virus, bacterias, parásitos e incluso transfusiones sanguíneas. Se puede considerar daño crónico cuando la persistencia de los síntomas y marcadores bioquímicos permanecen por más de tres meses y daño agudo cuando los indicios de daño no superan este tiempo.

Algunas de las enfermedades del hígado pueden ser identificadas mediante una observación física que puede ser: la existencia o no de ictericia (coloración amarillo-verdosa en la piel y en las membranas mucosas debido a un aumento en la concentración de bilirrubina), la pérdida de la masa hepatocelular (esta deformación sugiere fibrosis y/o cirrosis) y la hipertensión portal; aunque es necesario mencionar que estos síntomas coexisten en un individuo y pueden variar con el tiempo (Maher, 2003).

1.4.1.- Colestasis

Se conoce así a la acumulación de bilis en las células y vías biliares, la cual pasa a formar parte de la sangre y si la retención de ácidos biliares es persistente se ha

determinado que puede causar efectos negativos sobre otros órganos como los riñones y la presencia de bilirrubina no conjugada en el cerebro es tóxica. Desde el punto de vista funcional la colestasis se define como la disminución del flujo de la bilis producida por los hepatocitos, con independencia de la secreción y una reabsorción posterior por las vías biliares. Se ha dividido en dos categorías: con obstrucción (intrahepática y extrahepática, localizada o difusa) y sin obstrucción (Popper y Schaffner, 1987). Se manifiesta con prurito, coluria, acolia y muy frecuentemente ictericia, algunos marcadores bioquímicos se elevan como son fosfatasa alcalina (FA), gamma-glutamil transpeptidasa (GGTP) y alanina amino transferasa (ALT), siendo este último menos evidente (Farrell, 2004).

1.4.2.- Cirrosis

Es una enfermedad crónica, progresiva y en muchos de los casos llega a ser mortal (Williams y Maddrey, 1987). Se define así al conjunto de alteraciones en la arquitectura del hígado por la existencia de necrosis celular, inflamación, regeneración nodular del parénquima y proliferación del tejido conectivo fibrótico. La cirrosis está dentro de las 15 causas principales de muerte. Sin embargo, hoy en día no hay suficientes agentes totalmente efectivos para el tratamiento de esta enfermedad (Muriel y Rivera-Espinoza, 2008). Puede ser originada por el consumo de múltiples agentes como etanol, cloruro de vinilo, arsénico, fármacos (metotrexano) e incluso dosis altas de vitamina A (Aguilar-Ramírez, 2003).

1.4.3.- Enfermedad hepática alcohólica

El consumo de alcohol es una de las causas principales de enfermedades hepáticas ya que va de esteatosis a hepatitis alcohólica, a fibrosis hepática y a cirrosis, dependiendo de la cantidad de alcohol ingerido y de factores hereditarios o ambientales ya que se ha determinado mediante estudios que la frecuencia en el consumo de alcohol no fija el riesgo a presentar enfermedades hepáticas. Se han propuesto teorías diferentes que han tratado de describir la manera de como el etanol actúa sobre el hígado para causar el daño, pero ninguna ha predominado. Las siguientes reacciones describen el metabolismo del etanol en el hígado y la forma en que posiblemente causa el daño (ver Fig. 11) (Maher, 2003).

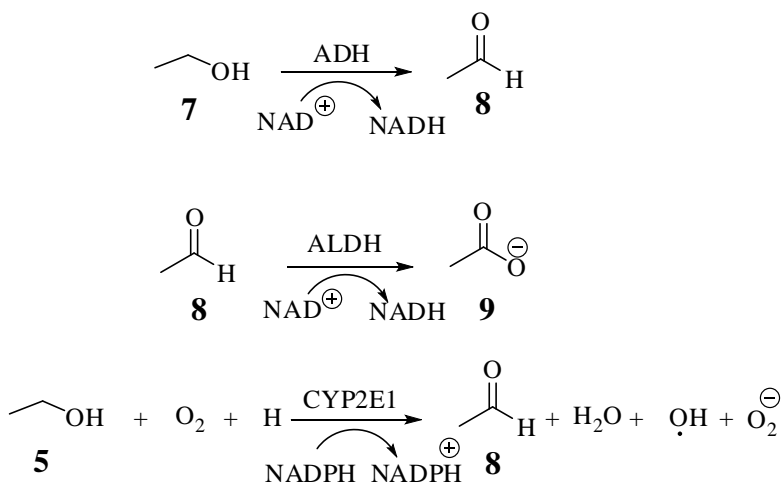


Fig. 11 Metabolismo del etanol

ADH: Deshidrogenasa de alcohol, ALDH: Deshidrogenasa de aldehído, NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleótido, NADH: nicotinamida adenina dinucleótido reducido, CYP2E1: tipo de enzima que forma parte del citocromo P-450, NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido, NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

El etanol (**7**) es oxidado en diversas partes del cuerpo ya que la enzima deshidrogenasa de alcohol (ADH), una enzima del citosol, está presente en el estómago, intestino e hígado y se encarga de oxidar al etanol transformándolo en acetaldehído (**8**) el cual es posteriormente oxidado en las mitocondrias por la enzima deshidrogenasa de aldehído (ALDH) a acetato (**9**). La existencia de una enzima capaz de oxidar al etanol en el estómago limita la cantidad disponible para el hígado. En el hígado el citocromo P-450E1 o CYP2E1 se encarga de metabolizarlo y el daño hepático se hace relevante ya que durante su oxidación se forman intermediarios de oxígeno reactivos como el radical ión superóxido (O₂⁻) y el radical hidroxilo (•OH), los cuales interactúan con las proteínas, lípidos o ADN para llevar a cabo una serie de reacciones de peroxidación que provocan la muerte celular (Maher, 2003).

1.4.4.- Hepatotoxicidad e importancia del citocromo P-450

El citocromo P-450 (CYP) es una superfamilia de proteínas hemo-tiolato que se localiza en el retículo endoplásmico de algunas células y con mayor frecuencia en los hepatocitos. El CYP es también llamado sistema de oxidasas de función mixta debido a que funciona como una cadena de transferencia de electrones por un átomo de oxígeno

molecular al sustrato. Se ha realizado una clasificación de este grupo de proteínas en 17 familias y sus subfamilias, la cual se estableció con base en la semejanza de la secuencia de aminoácidos, y se ha determinado que las familias CYP1, CYP2 y CYP3 son las encargadas de la biotransformación de fármacos en seres humanos (Pérez-Álvarez, 2003).

La mayoría de los fármacos administrados y toxinas se absorben en el hígado y se excretan en la orina a través de la bilis, generalmente estas reacciones son catalizadas por oxidasas microsómicas con una proteína como componente, perteneciente a la superfamilia genética CYP y tanto la afinidad como la especificidad de estas enzimas frente a diversas drogas, o agentes externos se debe a que existen en el hígado más de 20 enzimas CYP con numerosas proteínas estrechamente relacionadas (Farrell, 2004).

La hepatotoxicidad puede ser inducida por compuestos medicinales, como vitaminas, remedios de herbolaria, etc., también algunas de las causas es la exposición a sustancias tóxicas presentes en los alimentos, agua y ambiente de trabajo. El uso de algunas plantas medicinales no tiene un efecto inocuo sobre el organismo, sino por el contrario, pueden resultar hepatotóxicos, y más aún si el límite de la dosis recomendada se excede, tal es el caso de remedios utilizados durante años como: germandria, el aceite de menta, muérdago, valeriana, asafétida, lúpulo y la hoja de chaparral (Farrell, 2004). Existen, también compuestos utilizados a nivel industrial que han sido descritos como agentes hepatotóxicos, entre éstos se encuentran: el cloroformo, tetracloroetano, clorobifenilo, dinitrobenzono, tetracloruro de carbono, dinitrofenol, arsénico, compuestos fosforados y aquéllos que contienen talio, isocianato, 1,4-dioxano, derivados de hidrazina, etc. (Kuntz y Kuntz, 2006).

1.5.- Modelos de daño hepático

En los últimos años se han realizado estudios que demuestran la actividad biológica de compuestos (extraídos de plantas y/o semisintéticos) sobre el tratamiento de diversos padecimientos hepáticos, para lo cual se ha hecho uso de modelos de daño sobre animales (el más empleado es la rata por su alta resistencia aún cuando ha sido inducido un daño con alcohol), ya sea para enfermedades crónicas (cirrosis y fibrosis) o

agudas (hepatitis), que dependen del tiempo de exposición al agente etiológico. Los modelos más manejados son:

- I. Daño por obstrucción biliar: es un proceso quirúrgico de la ligadura del colédoco, donde la toxicidad es inducida por la acumulación de las sales biliares alcanzando una concentración alta que al contacto con las membranas ejercen sobre ellas una acción detergente, con lo cual se conduce a la necrosis. El empleo de este modelo produce estrés oxidativo (peroxidación lipídica), que se hace evidente después que el daño se presenta y continúa a pesar de la administración de antioxidantes (Muriel, 2003). Se ha determinado que cuando la obstrucción permanece por un período de una semana, hay un daño agudo mostrando un cuadro de colestasis aguda y necrosis, y por un período de 15 días hay un daño crónico mostrando fibrosis para posteriormente a los 28 días generar cirrosis (Muriel, 2003).
- II. Daño inducido por tetracloruro de carbono (CCl_4 , TC): es considerado como uno de los agentes hepatotóxicos más utilizados en modelos de daño ya que actúa directamente sobre la membrana celular. El TC se metaboliza en el hígado por acción de CYP2E1, CYP2B1 y CYP2B2 (Kuntz y Kuntz, 2006) que pertenecen a la superfamilia del citocromo P-450 en el retículo endoplásmico, y lo transforman en un radical libre triclorometilo ($\bullet\text{CCl}_3$), el cual reacciona rápidamente con el oxígeno para formar un peróxido $\bullet\text{OCCl}_3$, proceso que se ve influenciado por la concentración de oxígeno presente en las células, aunque a pesar de eso el daño al hepatocito es inevitable. La peroxidación lipídica y el estrés oxidativo son consecuencias evidentes del metabolismo del TC (Recknagel *et al.*, 1989).
En la mayoría de los experimentos en los que se pretende inducir cirrosis el TC se utiliza como agente etiológico en dosis de 4 g/Kg, enfermedad que se puede prevenir con inhibidores metabólicos y antioxidantes (vitamina C y vitamina E), ésta tal vez sea una de las ventajas de este modelo ya que pretende extrapolar los resultados a seres humanos (Muriel, 2003). El TC no es el único compuesto que se utiliza para estimular daño al hígado, también se administra etanol, que puede conducir a un daño agudo o crónico dependiendo del tiempo de exposición (Kuntz y Kuntz, 2006), y D-galactosamina, que provoca daño parecido a la hepatitis viral incrementando los niveles de marcadores de daño en suero

como transaminasa de aspartato (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) (Yoo *et al.*, 2008).

1.6.- Marcadores bioquímicos de daño hepatocelular

Son aquellas pruebas bioquímicas que se realizan tanto en plasma como en tejido hepático que permiten determinar la presencia de ciertos compuestos que se denominan marcadores, cuyas concentraciones reflejan daño en el hígado o en los conductos biliares. Entre estos marcadores se encuentran:

- I. Alanina aminotransferasa (ALT): es una enzima que se encarga de catalizar la transferencia de grupos amino alfa desde sus respectivos alfa-L-aminoácidos, en este caso de la L-alanina (**10**) hacia el 2-oxoglutarato (**11**) para producir piruvato (**12**) y glutamato (**13**), reacción que se muestra en la Fig.12. Esta enzima se localiza en el citosol de los hepatocitos y es un indicador de necrosis celular (Méndez-Sánchez *et al.*, 2001).

La actividad enzimática de ALT cuantificada en plasma de rata en ausencia de daño hepático se encuentra entre 20 y 30 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ (Rico-Almanza, 2003; Rivera-González, 2005).

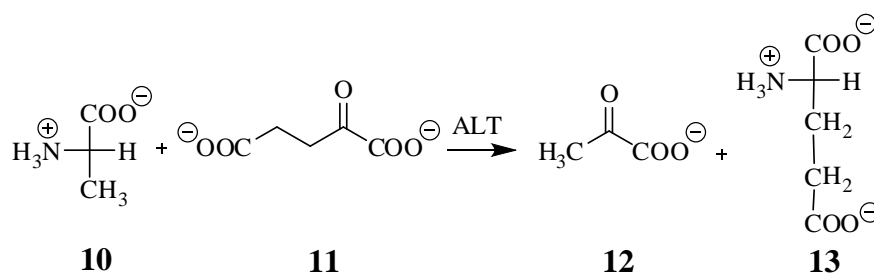


Fig. 12 Reacción catalizada por ALT

- II. Fosfatasa alcalina (FA): comprende un grupo de isoenzimas que trabajan a un pH alcalino óptimo, llevan a cabo la hidrólisis de ésteres de fosfato y se pueden encontrar en el hígado (asociada con los sinusoides y las membranas canaliculares y a su vez también presentes en el citosol), en hueso, en la placenta durante el primer trimestre de gestación, en riñones, intestinos y células sanguíneas; aunque sólo son detectables en orina, bilis, linfa y suero, siendo

este último el más utilizado en análisis clínicos. La FA es un marcador de colestasis, pero cabe señalar que esta enzima suele elevarse bajo ciertas condiciones, como por ejemplo; en el embarazo a partir del tercer mes, en pacientes con cáncer, durante la niñez, la pubertad y en la vejez (sexo femenino), por lo que los niveles normales de FA varían con la edad (Méndez-Sánchez *et al.*, 2001; Méndez-Sánchez *et al.*, 2003).

La actividad enzimática de FA cuantificada en plasma de rata en ausencia de daño hepático se encuentra entre 110 y 120 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ (Rico-Almanza, 2003; Rivera-González, 2005) e incluso el valor puede llegar hasta 150 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ (Fernández-Martínez, 2000).

- III. Gamma-glutamil transpeptidasa (GGTP): es una enzima microsomal, cataliza la transferencia de grupos gamma-glutamil de péptidos a otros aminoácidos; se encuentra en tejidos de riñón, bazo, páncreas, corazón, pulmón, cerebro y en el hígado (en la membrana sinusoidal y en el citosol en el RE liso). Una alta concentración de esta enzima indica colestasis (Méndez-Sánchez *et al.*, 2001), de hecho es el marcador de colestasis más sensible y mayoritariamente producido en el hígado.

La actividad enzimática de GGTP cuantificada en plasma de rata en ausencia de daño hepático se encuentra entre 10 y 15 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ (Rico-Almanza, 2003; Rivera-González, 2005).

- IV. Bilirrubinas: son compuestos formados por anillos pirrólicos unidos por tres carbonos, que poseen un color amarillo. El 85% de bilirrubinas se origina de la hemoglobina, el resto proviene de hemoproteínas no hemoglobínicas y de la destrucción de eritrocitos inmaduros o por la eritropoyesis ineficaz. Las bilirrubinas se dividen en dos tipos (ver Fig. 13): bilirrubinas libres o no conjugadas (**14**), que son liposolubles y tóxicas, y bilirrubinas conjugadas (**15**), que son atóxicas e hidrosolubles lo que facilita su eliminación por la bilis. El proceso de conjugación de las bilirrubinas que consiste en una esterificación se lleva a cabo en el retículo endoplásmico liso (Méndez-Sánchez *et al.*, 1993) por la acción de la enzima microsomal glucuronosiltransferasa que esterifica el ácido propiónico de la bilirrubina con el ácido glucurónico (Blanckaert *et al.*, 1979).

Cuando existen lesiones en el hígado, el proceso de eliminación de las bilirrubinas se altera lo que disminuye su excreción u origina regurgitación de la bilirrubina conjugada del hígado al torrente sanguíneo, por lo que es fácil medir este parámetro en plasma (Méndez-Sánchez *et al.*, 1993).

La determinación de bilirrubinas conjugadas en plasma de rata en ausencia de daño hepático se encuentra entre 5 y 10 mg/L (Rico-Almanza, 2003) y de bilirrubinas no conjugadas entre 11 y 15 mg/dL (Fernández-Martínez *et al.*, 2006).

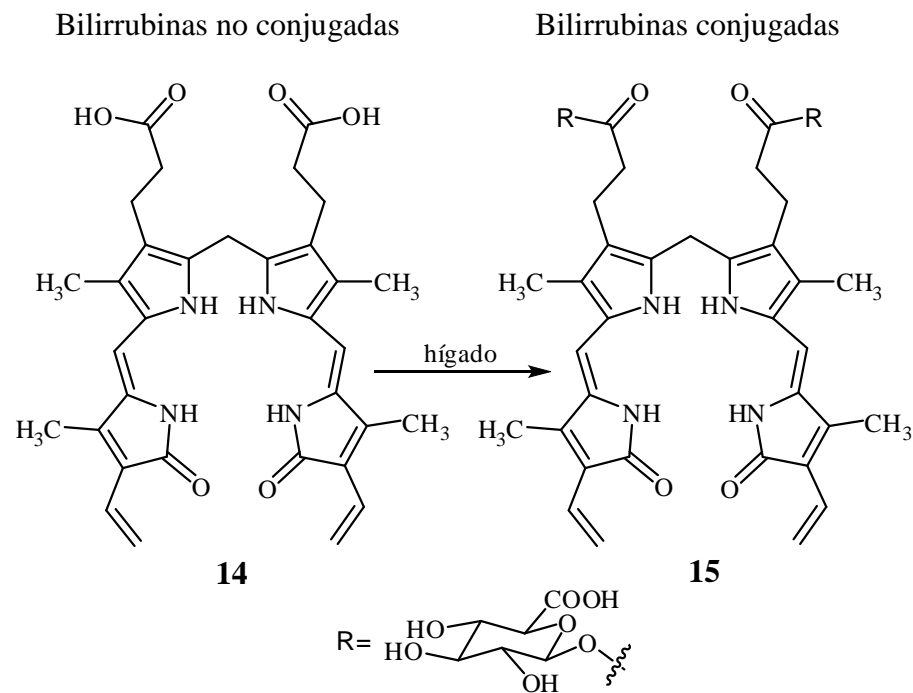


Fig. 13 Clasificación de bilirrubinas

- V. **Proteínas:** el hepatocito es una célula con la capacidad de llevar a cabo la síntesis de proteínas plasmáticas (albúmina y globulina que están relacionadas con el transporte de hormonas y lípidos y en procesos de coagulación, inflamación e inmunológicos), ya sea para su exportación o bien para reemplazar sus propias enzimas, aunque presenta un nivel mayor de síntesis de albúmina. Este proceso se lleva a cabo en la superficie de los ribosomas y es necesaria la presencia de aminoácidos activados por enzimas aminoacil-ARNt sintetasas, energía en forma de ATP, factores proteicos y ARNm. La formación de enlaces peptídicos entre aminoácidos se realiza en dirección de la traducción de ARNm (5'a 3') (Tresguerres *et al.*, 1999). La determinación de proteínas en plasma es útil

debido a que la disminución de albúmina plasmática va siempre acompañada de una elevación de globulinas y la relación entre ambas puede presentar un panorama del estado funcional del hígado (Olivera- Martínez, 1993). Las proteínas son determinadas con el fin de calcular el grado de peroxidación lipídica.

- VI. Peroxidación lipídica: es un proceso complejo que involucra la destrucción de los fosfolípidos de membranas celulares debido a la formación de compuestos reactivos, tales como radicales libres que son consecuencia del metabolismo del TC o formados a partir del oxígeno molecular (Recknagel *et al.*, 1989). La peroxidación lipídica es la responsable de que se efectúe la inactivación de enzimas y de la modificación oxidativa de moléculas como lipoproteínas, proteínas, ácidos nucleicos, etc. (Kuntz y Kuntz, 2006), por lo que es un parámetro que indica el daño en el hígado. El caso más estudiado es el daño que se causa con la administración de TC, que forma el radical triclorometilo ocasionando este proceso.

El grado de peroxidación lipídica determinado en tejido hepático de rata en ausencia de daño se encuentra entre 0.2 y 0.4 nmol MDA/mg proteína (Rico-Almanza, 2003; Rivera-González, 2005).

- VII. Glucógeno: es una macromolécula que se almacena en el hígado, constituye aproximadamente el 10% del peso de éste, puede permanecer almacenado hasta por dos días y es la fuente principal de glucosa para eritrocitos, retina, médula renal y cerebro. Está formado por unidades de glucosa con uniones 1,4 para formar cadenas lineales y uniones 1,6 para formar cadenas ramificadas. Para que se lleve a cabo su síntesis los sustratos son: glucosa-6-fosfato y glucosa-1-fosfato, los cuales se originan del metabolismo de fructosa y galactosa, de la gluconeogénesis (el hígado tiene la capacidad de producir hasta 240 mg de glucosa por día) y la glucogenólisis (Stolz, 2004).

Tanto la síntesis como la degradación del glucógeno está controlado por una serie de enzimas como la glucógeno-fosforilasa, útil para degradar subunidades de glucógeno, y la glucógeno-sintetasa que aumenta en unidades de glucosa a la cadena en expansión (Stolz, 2004).

El glucógeno cuantificado en tejido hepático de rata en ausencia de daño se encuentra entre 3 y 6 g de glucógeno/100 g de hígado (Rico-Almanza, 2003; Rivera-González, 2005).

- VIII. Óxido nítrico (ON): es un radical libre con un tiempo de vida media muy corto que se sintetiza por tres sintetasas del óxido nítrico (NOS): nNOS, NOS tipo 1 o también llamada neuronal; eNOS, NOS tipo 3 o endotelial y la iNOS, NOS tipo 2 o inducible (Muriel y Rivera-Espinoza, 2008), que son enzimas que utilizan como sustrato la L-arginina. El ON es responsable de efectuar numerosas funciones, entre las cuales destaca la neurotransmisión, la relajación del músculo liso, la actividad citotóxica de las células del sistema inmunitario y la respiración mitocondrial (Muriel, 1998).

Se determina como la concentración total de nitratos y nitritos por ser los productos finales en el metabolismo del ON; para el caso de daño inducido con TC disminuye la necrosis y colestasis así como la acumulación de colágena gracias al incremento en la producción de ON causado por la administración de L-arginina (Muriel, 2003). Sin embargo también puede tener efectos deletéreos al aumentar excesivamente e inducir estrés oxidativo.

La síntesis del ON a partir de iNOS se estimula gracias a endotoxinas, citocinas pro-inflamatorias como el caso del factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleucinas e interferon- γ (Li y Billiar, 1999).

El óxido nítrico cuantificado en tejido hepático de rata en ausencia de daño se encuentra entre 0.10 y 0.20 nmol/mg hígado (Fernández-Martínez *et al.*, 2006).

2.- ANTECEDENTES

El uso de plantas medicinales data desde hace mucho tiempo, ya que el hombre se ha interesado por el estudio de plantas diversas y encontró que algunas de ellas poseen propiedades que aliviaban ciertas patologías; aunque durante un período la curación natural se vio sustituida por la medicina moderna, la cual no debe subestimarse, ya que ambas se complementan para ofrecer mejores alternativas que brindan un nivel más alto en la calidad de vida (Santillo, 2000).

En el estado de Hidalgo, el empleo de plantas medicinales para aliviar enfermedades hepáticas es muy frecuente, sobre todo en la Huasteca y la zona Otomí, donde los habitantes a lo largo de los años se han encargado de que esta tradición prevalezca. La tabla 1 muestra las plantas medicinales utilizadas para padecimientos hepáticos, no sólo en el estado de Hidalgo (Villavicencio-Nieto y Pérez-Escandón, 2005) sino también en algunos otros estados de la República Mexicana.

Tabla 1 Plantas medicinales del estado de Hidalgo usadas en medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades hepáticas

NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO	OBSERVACIONES
Agrimonia	<i>Scutellaria gaumeri</i>	(Martínez, 1996).
Alcachofa, Rabanillo	<i>Senecio farfarus</i> Hemsl.	Se encuentra en Mineral del Monte, las flores se preparan en té (Zamora-Martínez y Barquín-López, 1997).
Aranthó	<i>Decatropis bicolor</i> (Zucc.)	Se toma el té de la raíz (Pérez-Escandón <i>et al.</i> , 2003).
Cenizo	<i>Leucophyllum</i> <i>ambiguum</i> H. y B.	Se prepara infusión de la raíz (Pérez-Escandón <i>et al.</i> , 2003).
Chamisa	<i>Eupatorium vernicosum</i> Sch. Bip.	Se encuentra en Mineral del Monte. Se toma el té de las ramas durante el ayuno (Zamora-Martínez y Barquín-López, 1997).

NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO	OBSERVACIONES
Chicalote	<i>Argemone platyceras</i> Link y Otto	Se toma la infusión de raíz, hoja y flor (Pérez-Escandón <i>et al.</i> , 2003).
Colochichi, sopa	<i>Eupatorium petiolare</i> Moc. ex DC	Se encuentra en Mineral del Monte y Mineral del Chico, Hidalgo. Las hojas se usan en té (Zamora-Martínez y Barquín-López, 1997).
Diente de león	<i>Taraxacum officiale</i> Weber	Se toma la infusión (Villavicencio-Nieto y Pérez-Escandón, 2005).
Doradilla	<i>Selapinella lepidophylla</i>	Se localiza en el valle de México, Coahuila, Nuevo León, etc. (Martínez, 1996).
Estafiate, Istafiate	<i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. Mexicana	Las ramas se preparan en té (Villavicencio-Nieto y Pérez-Escandón, 2005).
Fideo	<i>Cuscuta tinctoria</i> Mart.	Se utiliza la infusión para la ictericia y la hepatitis (Pérez-Escandón <i>et al.</i> , 2003).
Garañona, Cola de borrego	<i>Castilleja canescens</i>	Se toma la infusión en ayuno (Martínez, 1996).
Golondrina	<i>Euphorbia anychioides</i> Boiss.	Se prepara infusión con las ramas, se ingiere por espacio de un mes (Martínez-Pérez, 2007).
Gramma, Pata de gallo	<i>Capriola dactylon</i>	Para las obstrucciones del hígado (Martínez, 1996).
Hierba del conejo	<i>Castilleja tenuiflora</i> Benth.	Se prepara infusión de la raíz (Pérez-Escandón <i>et al.</i> , 2003).
Hierba del zorrillo	<i>Croton dioicus</i>	Se localiza en Nuevo León, Durango, Oaxaca y Veracruz (Martínez, 1996).

NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO	OBSERVACIONES
Hierba fría	<i>Chrysactinia mexicana</i> Gray	Se prepara una infusión con la raíz de la planta (Pérez-Escandón <i>et al.</i> , 2003).
Hinojo	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Se prepara infusión de la raíz (Pérez-Escandón <i>et al.</i> , 2003).
Huashe, Huajes	<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.)	Se prepara el té de las ramas (Villavicencio-Nieto y Pérez-Escandón, 2005).
Jarilla	<i>Senecio salignus</i> DC.	Se utilizan las hojas y se prepara una infusión (Zamora-Martínez y Barquín-López, 1997).
Marrubio	<i>Marrubium vulgare</i>	Se utilizan las ramas, se colectan antes de la floración (Martínez, 1996).
Oreja de ratón	<i>Dichondra argentea</i> H. y B.	Se prepara una infusión de la raíz (Pérez-Escandón <i>et al.</i> , 2003).
Pesma, Tepezincoyule	<i>Cyathea mexicana</i> Schlecht	Se toma el té del tronco (Villavicencio-Nieto y Pérez-Escandón, 2005).
Rábano, Rábano negro	<i>Raphanus sativus</i> L.	Se localiza en Mineral de Monte, cultivada en casa (Zamora-Martínez y Barquín-López, 1997).
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Se localiza en Mineral de Monte y Mineral del Chico (Zamora-Martínez y Barquín-López, 1997).
Santa Martha	<i>Helianthemum</i> <i>glomeratum</i> Lag.	Se utiliza el té de la raíz, la administración puede ser oral o local (Pérez-Escandón <i>et al.</i> , 2003).

NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO	OBSERVACIONES
Simonillo	<i>Conyza filaginoides</i> (DC.) Hieron	Se hierve la planta completa y se toma 1 ó 2 veces al día (Villavicencio-Nieto <i>et al.</i> , 2002).
Tláxcal	<i>Juniperus flaccida</i> Schlenchtt	Se utilizan las semillas para el tratamiento de cirrosis, vía oral (Martínez-Pérez, 2007).
Zacapemucho	<i>Erythrina lanata</i> Rose	Se toma el té de la corteza en pequeñas cantidades (Villavicencio-Nieto y Pérez-Escandón, 2005).

El uso tradicional de la mayoría de las plantas del estado de Hidalgo mencionadas anteriormente aún no ha sido motivo de investigación científica, lo cual permitiría corroborar sus propiedades ya sea para aliviar o para prevenir enfermedades hepáticas. Se han realizado estudios farmacológicos de compuestos extraídos de plantas, algunos de los cuales han mostrado propiedades hepatoprotectoras, antinecróticas, antifibróticas, anticoléstatas, etc., entre los casos más conocidos se encuentran:

I.- Colchicina (**16**) (ver Fig. 14): es un alcaloide obtenido de la planta *Colchicum autumnale*, conocido por sus propiedades antimicóticas, antiinflamatorias y su aplicación médica en el tratamiento de la gota, además de su actividad antitumoral (Muriel y Rivera-Espinoza, 2008). Se ha encontrado útil en el tratamiento de la cirrosis, pero con una limitante por sus efectos secundarios (diarrea aún en dosis terapéuticas), por lo que el estudio de este alcaloide ha llevado a sintetizar y evaluar compuestos análogos de la colchicina que han mostrado efectos equivalentes a ésta, a pesar del empleo de dosis más altas, y sin efectos colaterales (Muriel, 2003); también previene la hepatitis inducida por la D-galactosamina y la toxicidad causada por paracetamol (Muriel y Rivera-Espinoza, 2008).

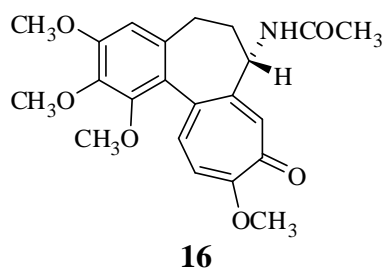


Fig. 14 Estructura de la colchicina

II.- Silimarina: es un flavonoide formado por un conjunto de cuatro isómeros: silibinina (**17**), isosilibina (**18**), silidianina (**19**) y silicristina (**20**) (ver Fig. 15), obtenidos de la planta *Silybum marianum* que ha mostrado una alta protección en modelos de daño hepático por su potencial antioxidante, anti-peroxidación lipídica, estabilizador de membrana, inmunomodulación y mecanismos de regeneración del hígado. Además, se han demostrado sus efectos benéficos contra el daño provocado por hepatotoxinas, por ejemplo, la silimarina previene la cirrosis y fibrosis producidas por el TC en ratas, con lo cual los niveles de peroxidación lipídica son normalizados por la acción de este compuesto (Muriel y Rivera-Espinoza, 2008) siendo clínicamente utilizado para el tratamiento de cirrosis, hepatitis, daño isquémico, etc. (Ku *et al.*, 2008).

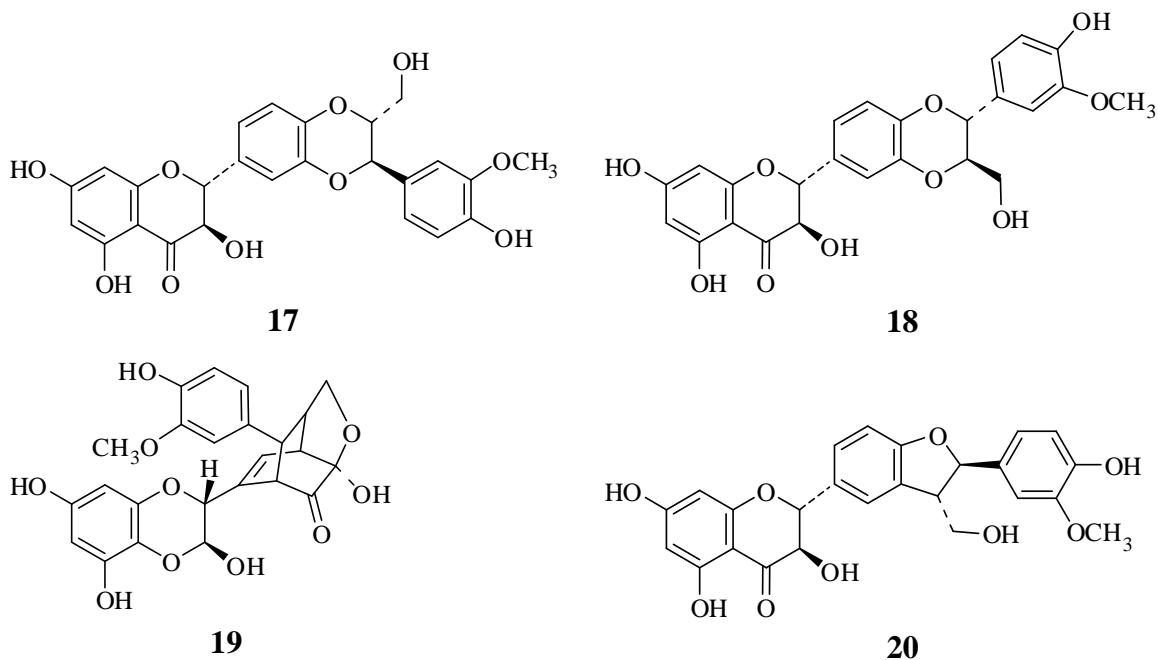


Fig. 15 Isómeros de la silimarina

III.- Curcumina (**21**) (ver Fig. 16): compuesto extraído de *Curcuma longa* L. que ha sido ampliamente utilizado en la medicina indígena por sus actividades farmacológicas y fisiológicas. Posee una acción hepatoprotectora en daño agudo y crónico, exhibe una fuerte actividad antioxidante comparada con la vitamina C y E, previene las alteraciones como la fibrosis inducida por el TC, tiene propiedades antioxidantes y habilidad para inactivar el factor nuclear (NF-κB) que induce la síntesis de agentes proinflamatorios endógenos durante el daño hepático, con lo que reduce la inflamación asociada a la producción de citocinas que se describe como el mecanismo de acción más probable de la curcumina. Este compuesto es seguro para ser ingerido por humanos y sus efectos favorecedores en padecimientos hepáticos incluye la cirrosis (Muriel y Rivera-Espinoza, 2008).

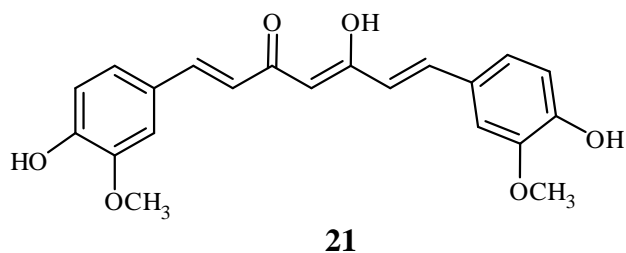


Fig. 16 Estructura de la curcumina

2.1.- La actividad hepatoprotectora de especies del género *Cirsium*

Entre las plantas estudiadas por sus propiedades hepatoprotectoras, se encuentran también aquellas que pertenecen al género *Cirsium*, cuyos estudios demuestran su capacidad para prevenir el daño contra diversos agentes tóxicos como el TC y la D-galactosamina. Es importante mencionar que en el estado de Hidalgo no está documentado el uso tradicional de este género para padecimientos hepáticos, sin embargo es ampliamente usado en Asia. Las especies que han sido investigadas por dichas propiedades se describen a continuación:

De *Cirsium setidens* Nakai se han aislado compuestos de las fracciones de cloruro de metileno, tales como terpenos (**22**) (ver Fig. 17), ácidos grasos (**23**) (ver Fig. 18), esteroides (**24**) (ver Fig. 19), entre otros (Lee *et al.*, 2002). Se ha descrito que el extracto butanólico contiene ingredientes activos con un efecto hepatoprotector cuando el daño es inducido con TC debido a su actividad antioxidante, que inhibe el mecanismo complejo de este agente tóxico (TC) que como ya se ha mencionado causa estrés

oxidativo, proceso degenerativo relacionado con el incremento de la liberación de enzimas (Lee *et al.*, 2008). Este extracto también ha mostrado ser un hepatoprotector eficiente del daño causado por D-galactosamina, que produce un deterioro similar a la hepatitis viral: incrementa los niveles enzimáticos de ALT, AST e incrementa la peroxidación lipídica. Si se administra la pectolarina (**25**) (ver Fig. 20) o pectolarigenina (**26**) (ver Fig. 21), que son los compuestos principales del extracto butanólico, se disminuye el daño hepático causado por la D-galactosamina y por lo tanto son considerados como agentes protectores vía mecanismo antioxidante (Yoo *et al.*, 2008).

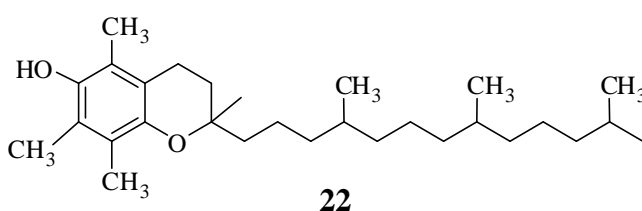


Fig. 17 Estructura del α -tocoferol

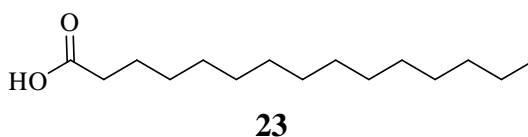


Fig. 18 Estructura de ácido graso

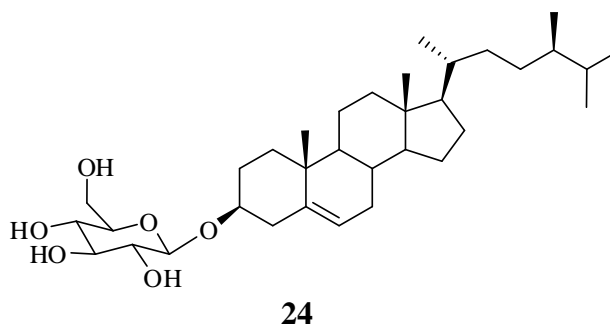
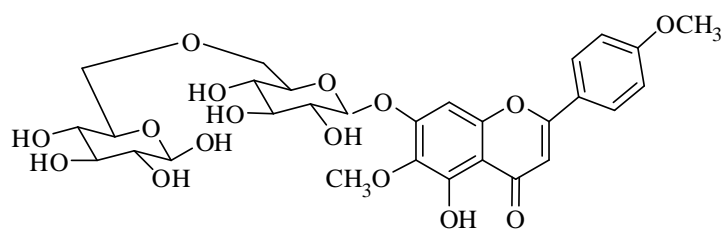
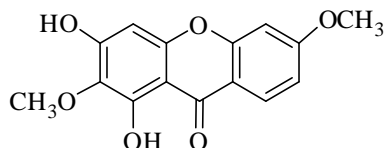


Fig. 19 Estructura de esteroles



25

Fig. 20 Estructura de la pectolarina

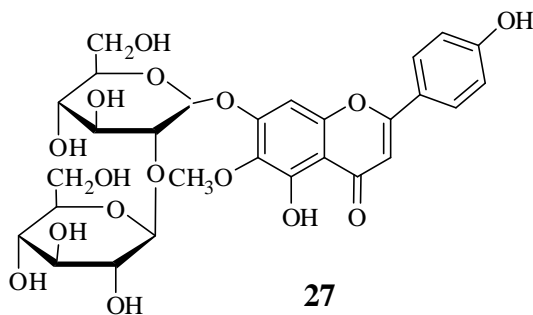


26

Fig. 21 Estructura de la pectolarigenina

Se realizó una investigación sobre la actividad de los extractos acuosos de raíces y tallos de *Cirsium arisanense* Kitamura, planta utilizada en Taiwan por años como agente hepatoprotector. Ambos extractos mostraron contenido fenólico y propiedades antioxidantes; así como la capacidad de accionar mecanismos en las células del hígado para prevenir la hepatotoxicidad inducida por agentes químicos gracias a que modulan los niveles de NO (Ku *et al.*,2008).

De *Cirsium japonicum* se aisló el compuesto hispidulin neoesperidosido (**27**) (ver Fig. 22) obtenido a partir de los extractos metanólicos que mostraron tener un efecto favorecedor al hígado contra la peroxidación lipídica inducida con etanol (Park *et al.*, 2004).



27

Fig. 22 Estructura del hispidulin neoesperidosido

2.2.- Propiedades terapéuticas de especies del género *Cirsium*

Este género no sólo ha mostrado propiedades hepatoprotectoras, sino que también ha tenido otros efectos terapéuticos, que además proporcionan información de los compuestos presentes en los extractos de diversas polaridades que pueden ser utilizados para el tratamiento de enfermedades como la diabetes e incluso que mostraron propiedades antimicrobianas. Hasta hoy en día, se han realizado estudios diversos de las propiedades que poseen algunas especies del género *Cirsium*, especialmente en países del Oriente, con lo que se han demostrado dichas propiedades.

En 1998, se aisló la molécula de pectolinarina (**26**) (ver Fig. 21) del extracto acuoso de *Cirsium subcoriaceum* y se evaluó su efecto analgésico, obteniendo muy buenos resultados. Se administró tanto el compuesto aislado como el extracto acuoso (Martínez-Vázquez *et al.*, 1998).

Se ha determinado que algunas especies del género *Cirsium* tienen propiedades antimicrobianas. De *Cirsium* sp. se obtuvieron los extractos polares (metanol y agua) los cuales inhiben el crecimiento de algunos microorganismos (Barbour *et al.*, 2004). De *Cirsium tenoreanum*, originario de Italia, se aislaron tres flavonoides (extracción con metanol y acetato de etilo) a los cuales se les atribuye la capacidad antiproliferativa de microorganismos (Loizzo *et al.*, 2004). Los extractos acuosos de las flores de *Cirsium rivulare* muestran una alta actividad contra bacterias Gram positivas (Nazaruk y Jaconiuk, 2005).

También se han estudiado las propiedades terapéuticas de los extractos polares de *Cirsium japonicum*, que mostraron la capacidad de inhibir la proliferación de células cancerosas que ha sido atribuida a la probable presencia de flavonoides (Liu *et al.*, 2007), y de inducir en rata la relajación del tejido de la aorta mediante un mecanismo posible de producción/liberación de ON (Kim *et al.*, 2008).

Otras especies se han investigado por sus propiedades antidiabéticas, tal es el caso de *Cirsium pascuarense* mejor conocido en México como “cardo santo”, cuyo extracto hexánico reduce los niveles de glucosa y su efecto persiste aún después de 24 h en un modelo de ratas diabéticas (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2001). De algunas otras plantas del género *Cirsium* únicamente se ha realizado una caracterización química de

las moléculas que constituyen dicha especie, por ejemplo, de *Cirsium rhinoceros* se aisló poliacetileno y flavonoides (Yim *et al.*, 2003), compuestos abundantes en estas plantas.

2.3.- Especies del género *Cirsium* en el estado de Hidalgo

El género *Cirsium* pertenece a la familia Asteraceae constituido por diversas especies a las cuales se les ha denominado comúnmente “cardos”, es un género formado por unas 200 especies distribuidas en el hemisferio boreal y algunas de éstas localizadas en el valle de México. Son plantas herbáceas perennes por lo general espinosas, poseen flores con corolas blancas, amarillas, rosas o moradas (Calderón de Rzedowski y Rzedowski, 2001).

En el estado de Hidalgo existen 6 especies del género *Cirsium*: *C. vulgare*, *C. ehrenbergii*, *C. raphilepis*, *C. subuliforme* (Pérez-Escandón *et al.*, 2003), *C. durangense* y *C. jorullense* (Calderón de Rzedowski y Rzedowski, 2001). Particularmente, en este trabajo se decidió llevar a cabo el estudio de las propiedades hepatoprotectoras de dos de las seis especies encontradas en Hidalgo: *C. vulgare* y *C. ehrenbergii*, con base en los reportes previos ya mencionados para otras especies del género. Cabe mencionar que de ambas especies no hay reportes científicos de sus constituyentes químicos y sus efectos farmacológicos, sólo de *Cirsium ehrenbergii* se han estudiado los extractos acuosos, metanólicos y hexánicos, en cuanto a sus propiedades antimicrobianas y su capacidad para relajar el tejido uterino (Fernández-Martínez *et al.*, 2007).

2.3.1.- *Cirsium vulgare*

También conocida como “cardo”. Planta herbácea bienal, erecta, de hasta 1.5 m de altura, con tallos ramificados en la parte superior, aracnoideo-lanoso; tiene hojas sin peciolo bien definido y con margen irregularmente espinuloso, aracnoideo-pubescentes; flores de color lila, sus corolas de 2.5 a 3.5 cm de largo, anteras de 8 a 11 mm de largo (Fig. 23). Es considerada maleza ocasional, crece a una altitud de 2550 m. Es nativa de Eurasia, pero introducida en Norte y Sudamérica (Calderón de Rzedowski y Rzedowski, 2001).



Fig. 23 *Cirsium vulgare*

2.3.2.- *Cirsium ehrenbergii* Sch. Bip.

También conocida como “cardo”, “cardo colorado”, “cardo de montaña”, “cardo santo”, “cuaulhizquílitl”, “rosa de las nieves”, ésta es la especie de *Cirsium* más común en el Valle de México además de ser la más vistosa por el tamaño y color de sus flores (Calderón de Rzedowski y Rzedowski, 2001). Planta herbácea perenne, de hasta 1.5 m de alto, con tallo erecto sin ramificaciones en su base y con finas líneas longitudinales, posee hojas espinosas blanco pubescentes (Monroy-Ortíz y Castillo-España, 2000), las cabezuelas también espinosas tienen sólo flores tubulares en el extremo de las ramas, son grandes y pesadas (Benítez Badillo, 1986), con corolas entre 3.5 a 6 cm y anteras de 8 a 15 mm de longitud color rosado-rojizas en la parte superior (Ver Fig. 24).



Fig. 24 *Cirsium ehrenbergii*

Es una especie que florece de octubre a enero (Benítez-Badillo, 1986), se localiza en los lugares montañosos y húmedos del valle de México a una altura de

2600-4000 m; preferentemente en bosques de coníferas y de encinos, en praderas alpinas, en los estados de Durango, Nuevo León, Jalisco, Hidalgo, Morelos y Veracruz. Ha sido utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas afecciones (Calderón de Rzedowski y Rzedowski, 2001), por ejemplo, en el estado de Hidalgo, se utilizan las flores y las raíces en infusión, ya sea para beber o en lavados vaginales para el tratamiento de flujo o hemorragias vaginales (Pérez-Escandón *et al.*, 2003) , para tos y dolor de pecho (Fernández-Martínez *et al.*, 2007).

Se llevó a cabo el estudio fitoquímico y biológico de *Cirsium ehrenbergii*, a partir de los extractos polares (metanol y agua) y no polares (hexano) en donde se observó que las fracciones hexánicas poseen una actividad antimicrobial alta comparada con los extractos polares, que se atribuye posiblemente a la presencia de alcaloides. También se evaluaron sus efectos relajantes en útero de rata; el extracto hexánico inhibió la contracción inducida con KCl hasta en un 93%. Cabe mencionar que los extractos polares (metanol y agua) no mostraron efectos biológicos significativos comparados con los obtenidos con los extractos hexánicos, que mostraron poseer capacidades antimicrobianas y relajantes (Fernández-Martínez *et al.*, 2007). Tales hallazgos permiten justificar el uso de esta planta en la medicina tradicional.

3.- JUSTIFICACIÓN

En México, el índice de enfermedades crónico-degenerativas es la principal causa de muerte en la población, aunque esto se observa con mayor frecuencia en zonas rurales de los estados de Oaxaca, Chiapas e Hidalgo, donde la cifra supera a las defunciones registradas en zonas urbanas. Datos obtenidos del INEGI informan que los padecimientos en el hígado se encuentran como la cuarta causa de muerte en los habitantes, enfermedades que destacan en el sexo masculino entre los 30-59 años de edad (Fig. 25) y esto se debe principalmente al consumo de alcohol, aunque también son causa de hepatopatías los virus (hepatitis) y la exposición a compuestos hepatotóxicos (sustancia capaz de producir efectos destructivos sobre células hepáticas y alterar la función o estructura anatómica del hígado) (Muriel, 2003).

Entre los compuestos que ejercen efectos tóxicos al hígado, y a los que con mayor frecuencia la población se halla expuesta, están los medicamentos, ya que como se ha descrito anteriormente el hígado es un órgano con múltiples funciones, entre ellas destaca el metabolismo y biotransformación de fármacos o sustancias químicas para así ser eliminadas del organismo. El nivel dañino del compuesto depende de muchos factores, entre los cuales se encuentran la vía de administración, genética del individuo, el medio ambiente, e incluso antecedentes de otra enfermedad. Algunos fármacos dañinos son el acetaminofeno (paracetamol), metotrexano, estrógenos, esteroides, diclofenaco, tacrina, ketorolaco, ibuprofeno, naproxeno, metildopa, penicilina, isoniacida, etc. y compuestos químicos como TC, clorobenceno, arsénico, cloruro de vinilo y dosis altas de vitamina A, siendo éstos últimos relacionados con la cirrosis (Aguilar-Ramírez, 2003).

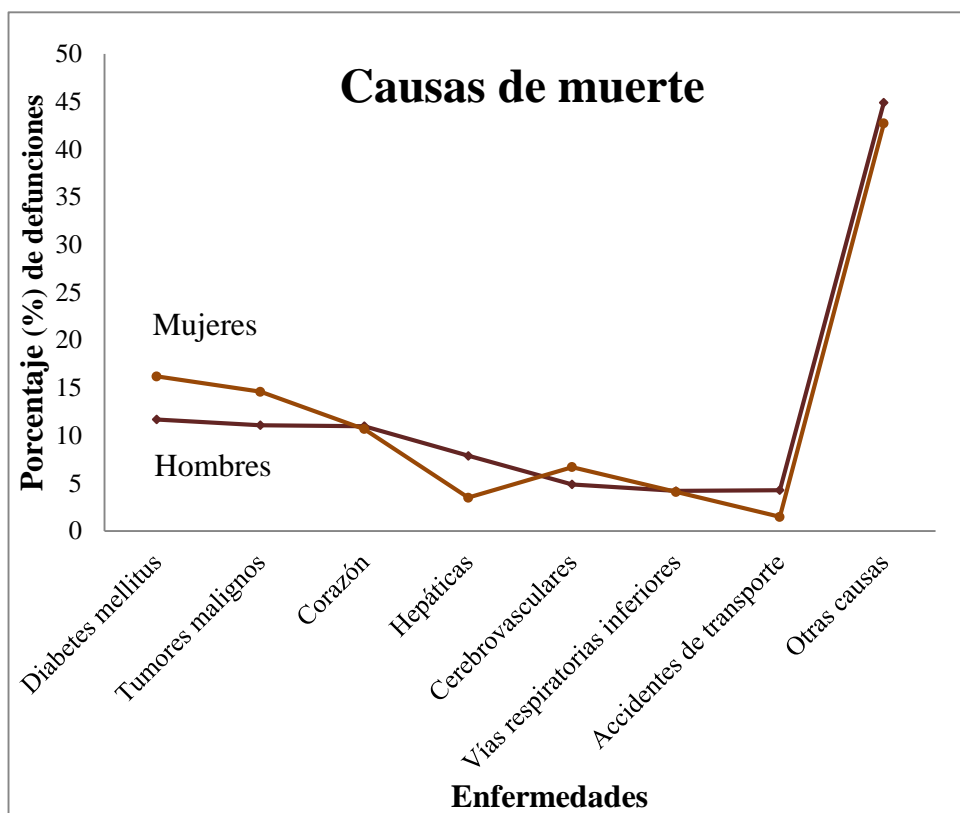


Fig. 25 Distribución porcentual de las defunciones registradas por principales causas de muerte según sexo, INEGI-2007

Como se indicó muchos de los medicamentos y de los compuestos químicos utilizados en industrias ejercen un efecto dañino al organismo que se ve reflejado como alguno de los diferentes trastornos hepáticos, para los cuales en muchas ocasiones sólo se sugiere una dieta para su mejora, lo anterior nos indica que existe una deficiencia de fármacos destinados al tratamiento de enfermedades hepáticas.

Entre algunos de los tratamientos se encuentran: la combinación de *N*-acetilcisteína con metionina que se utiliza como antídoto contra la intoxicación aguda por TC y otros compuestos, la sulfo-adenosil-L-metionina que favorece la preservación del parénquima hepático durante la obstrucción biliar. Además cabe destacar los recientes estudios sobre el ácido cafeico como inhibidor en la síntesis de leucotrienos, de corticosteroides por sus efectos antiinflamatorios y algunos análogos de la talidomida que han demostrado ser eficaces para prevenir necrosis y fibrosis (Muriel, 2003). Sin embargo, no hay fármacos suficientes para el tratamiento de enfermedades hepáticas.

Es aquí donde radica la importancia de realizar estudios que proporcionen información sobre nuevos agentes hepatoprotectores, los cuales aún cuando no reviertan o curen la enfermedad la puedan prevenir y que son necesarios como alternativas farmacológicas futuras. Estas investigaciones involucran con mayor frecuencia a productos naturales o compuestos semi-sintéticos, que son el resultado de la modificación química de algún compuesto natural. Entre estos productos han destacado por sus efectos la colchicina (**16**) y la silimarina (**17, 18, 19 y 20**) (Muriel, 2003) y algunos como los flavonoides aislados del *Cirsium setidens* (**25 y 26**) (Yoo *et al.*, 2008).

Dada la falta de medicamentos para el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas hepáticas, se pretende encontrar alternativas nuevas que sirvan en un futuro como fitomedicamentos para el ser humano, que provean de una mejor calidad de vida a los pacientes y que posean la capacidad de prevenir dichos padecimientos. Por lo tanto, la evaluación de las propiedades hepatoprotectoras de los extractos hexánicos de dos especies del género *Cirsium* luce atractiva, no sólo para ampliar las expectativas terapéuticas durante las hepatopatías que son una causa importante de mortalidad en nuestro país sino, que al mismo tiempo se aprovecha la biodiversidad vegetal que tiene nuestro país y nuestro estado.

4.- HIPÓTESIS

La administración de los extractos hexánicos de las flores de las especies: *Cirsium vulgare* y *Cirsium ehrenbergii*, ejercerán un efecto hepatoprotector contra el daño agudo inducido con tetracloruro de carbono (CCl₄, TC) en ratas Wistar.

5.- OBJETIVOS

5.1.- Objetivo general

Evaluar el efecto hepatoprotector de los extractos hexánicos de las flores de *Cirsium vulgare* y *Cirsium ehrenbergii* en un modelo de daño agudo inducido con tetracloruro de carbono (CCl₄, TC) en ratas Wistar.

5.2.- Objetivos específicos

- i. Inducir un daño agudo a los grupos experimentales y administrar dos dosis diferentes de los extractos hexánicos de las flores de ambas especies.
- ii. Analizar el efecto hepatoprotector mediante marcadores bioquímicos de daño, así como pruebas de histología.
- iii. Llevar a cabo un análisis estadístico de los datos obtenidos con el fin de comparar entre los grupos los efectos que producen ambos extractos hexánicos.
- iv. Relacionar el efecto hepatoprotector producido por los extractos con su capacidad antioxidante sobre peroxidación lipídica y concentración de ON.

6.- METODOLOGÍA

6.1.- Preparación de los extractos hexánicos de *C. vulgare* y *C. ehrenbergii*

Para la identificación de las especies *Cirsium vulgare* y *Cirsium ehrenbergii*, se entregó un espécimen de cada una en el Herbario del Centro Médico Siglo XXI del IMSS, con número de voucher 15598IMSSM y 15597IMSSM respectivamente y de ambas se colectaron únicamente las flores que se localizaron en los municipios de Mineral de la Reforma y Mineral el Chico, Hidalgo (Fig. 26).



Fig. 26 Mapa de ubicación de especies

Las flores se secaron, se molieron y se pesaron (total de materia orgánica: 1.802 Kg de *C. vulgare* y 3.721 Kg de *C. ehrenbergii*). Las extracciones se llevaron a cabo mediante un aparato de Soxhlet utilizando hexano como se muestra en la Fig. 27, y el extracto se concentró en un evaporador rotatorio hasta sequedad eliminando el disolvente para obtener en ambos casos una miel color verde-café oscura y de consistencia viscosa. Se obtuvieron los rendimientos siguientes:

Cirsium vulgare: 20.48 mg/g de materia orgánica seca

Cirsium ehrenbergii: 71.87 mg/g de materia orgánica seca

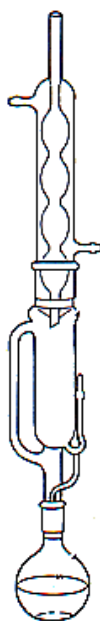


Fig. 27 Aparato de extracción de Soxhlet

6.2.- Grupos experimentales

Se utilizaron ratas macho Wistar con un peso de 200-250 g. Los animales permanecieron en cajas plásticas a temperatura constante de 21°C, bajo ciclos de luz/obscuridad de 12 h y tuvieron acceso libre al agua purificada y alimento (dieta estándar Purina chow). Las ratas recibieron trato humanitario de acuerdo a los lineamientos institucionales y a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), acerca de las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

Se formaron ocho grupos, cuatro de los cuales corresponden a grupos control, y los restantes a grupos con un daño inducido con TC y administrados con los extractos en dos diferentes dosis (250 y 500 mg/Kg); todos con una N = 6:

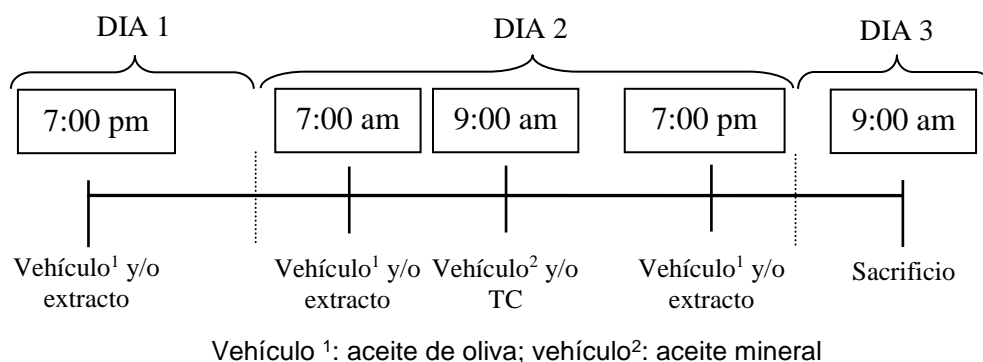
- 1) **[VE + VTC]** Vehículo del extracto (aceite de oliva, 1mL) + Vehículo del CCl₄ (aceite mineral, 1 mL)
- 2) **[Ecv500 + VTC]** Extracto de *Cirsium vulgare* 500 mg/Kg + Vehículo del CCl₄ (aceite mineral, 1 mL)
- 3) **[Ece500 + VTC]** Extracto de *Cirsium ehrenbergii* 500 mg/Kg + Vehículo del CCl₄ (aceite mineral, 1 mL)
- 4) **[VE + TC]** Vehículo del extracto (aceite de oliva, 1 mL) + CCl₄ (4 g/Kg)

- 5) **[Ecv500 + TC]** Extracto de *Cirsium vulgare* 500 mg/Kg + CCl₄ (4 g/Kg)
- 6) **[Ece500 + TC]** Extracto de *Cirsium ehrenbergii* 500 mg/Kg + CCl₄ (4 g/Kg)
- 7) **[Ecv250 + TC]** Extracto de *Cirsium vulgare* 250 mg/Kg + CCl₄ (4 g/Kg)
- 8) **[Ece250 + TC]** Extracto de *Cirsium ehrenbergii* 250 mg/Kg + CCl₄ (4 g/Kg)

Cada extracto se pesó en la cantidad adecuada y fue disuelto en un volumen de aceite de oliva como vehículo, hasta quedar en una concentración tal que asegurara la dosificación requerida por 1 mL administrado de la mezcla por rata.

El TC fue disuelto en una relación 1:1 con aceite mineral, en un volumen que asegurara la administración de 4 g/Kg en 1 mL por rata.

La administración en cada uno de los grupos se realizó vía oral con una cánula metálica de punta roma bajo el siguiente esquema de tratamiento (Fig. 28):



Vehículo¹: aceite de oliva; vehículo²: aceite mineral

Fig. 28 Esquema de tratamiento

6.3.- Determinación de parámetros bioquímicos

Después de 38 h de que se inició el experimento las ratas se sacrificaron por exsanguinación con punción cardíaca bajo anestesia ligera con éter etílico. La sangre se colectó en una jeringa conteniendo heparina sódica (1000 U/mL); el hígado se removió y se lavó con solución salina (0.9%). Las muestras se conservaron en hielo para realizar las determinaciones bioquímicas en plasma e hígado, el plasma se obtuvo al centrifugar la sangre a 3000 rpm por 10 minutos.

En el plasma se determinó:

- 1.-Actividad de FA.
- 2.-Actividad de GGTP.
- 3.-Actividad de ALT.

4.-Bilirrubinas directas (conjugadas) y totales.

En hígado se determinó:

- 1.- Grado de peroxidación lipídica.
- 2.- Cuantificación de proteínas
- 3.- Cantidad de glucógeno.
- 4.- Óxido nítrico hepático.
- 5.- Muestras para histología (tinción de eosina /hematoxilina).

6.3.1.- Determinación de FA

Método que se basa en la hidrólisis del *p*-nitrofenilfosfato por la fosfatasa alcalina para producir fosfato inorgánico y *p*-nitrofenol, el cual se lee a 410 nm (Berger y Rudolph, 1963; Bergmeyer *et al.*, 1983). La cantidad de *p*-nitrofenol se determinó a partir de una curva estándar de *p*-nitrofenol de 10 $\mu\text{mol/mL}$ con el fin de interpolar los resultados de las muestras y obtener su actividad enzimática.

Para medir la actividad enzimática se colocaron en cada uno de los tubos de ensayo, 0.25 mL de un amortiguador de glicina 0.1 M con MgCl_2 1 mM a pH= 10.5 y 0.25 mL de *p*-nitrofenilfosfato. Los tubos se incubaron en baño de María a 37°C por 5 minutos, enseguida se adicionaron 50 μL de plasma, se mezcló y se incubó por 30 minutos a la misma temperatura anterior. Transcurrido este tiempo se adicionaron 5 mL de NaOH 0.02 N, se agitó y se tomó la lectura en un espectrofotómetro a 410 nm. El blanco se preparó con los reactantes descritos anteriormente, pero sustituyendo la muestra plasmática por agua.

6.3.2.- Determinación de ALT

Este método se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Reitman y Frankel (1957). Se rotulan los tubos para la muestra problema y un tubo blanco por cada muestra; se agregaron 0.25 mL de sustrato a cada uno de los tubos, enseguida se adicionaron únicamente a los tubos problema 0.05 mL y todos los tubos se incuban durante una hora en baño de María a 37°C. Después se agregó a cada tubo 0.25 mL de reactivo cromógeno (blanco y problema) y únicamente a los tubos blanco 0.05 mL de plasma. Posteriormente, todos los tubos se incubaron en baño de María a la misma

temperatura durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo se agregaron 2.5 mL de NaOH 0.4 N a todos los tubos, se tomó la lectura en un espectrofotómetro a 515 nm.

6.3.3.- Determinación de GGTP

Esta técnica utiliza como sustrato la glutamil-*p*-nitroanilida que en presencia de la enzima γ -1-glutamyl transpeptidasa y del receptor del grupo γ -1-glutamilo, como lo es glicil-glicina, produjo γ -glutamilglicina y *p*-nitroanilina que se cuantifica con un espectrofotómetro a 410 nm (Glossman y Neville, 1972) descrita a continuación:

En cada uno de los tubos se colocaron 400 μ L de tris-HCl 200 mM a pH= 8.2, 100 μ L de MgCl₂ 200 mM, 100 μ L de glicil-glicina 40 mM pH= 8.2 y 200 μ L de γ -glutamyl-*p*-nitroanilida 10 mM, los tubos se incubaron en baño de María a 37 °C durante 10 minutos, se agregaron 200 μ L de plasma, se agitaron e incubaron a 37 °C durante 30 minutos. La reacción enzimática se detuvo con 2 mL de ácido acético 1.5 M. El blanco se preparó de igual forma, pero agregando 200 μ L de agua en lugar de plasma. Se tomó la lectura en un espectrofotómetro a 410 nm.

6.3.4.- Determinación de bilirrubinas

El método utilizado para cuantificar bilirrubinas, tanto directas como totales, se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por el fabricante del Kit, marca Teco Diagnostics (California, U.S.A.) que se basa en la reacción de la bilirrubina con ácido sulfanílico para formar un compuesto azoico que tiene una absorbencia máxima de 560 nm, por lo que la intensidad de la coloración es directamente proporcional a la concentración de bilirrubinas.

6.3.5.- Determinación de glucógeno hepático

La determinación de glucógeno se llevó a cabo con base en la reacción colorimétrica de antrona con glucosa (Seifter *et al.*, 1950), la cual se obtiene de la digestión de la muestra de hígado con hidróxido de potasio (KOH), técnica descrita a continuación:

Se colocaron 0.5 g de hígado en tubos esmerilados, se adicionaron 1.5 mL de KOH (30%), se taparon y se calentaron a ebullición durante media hora. El contenido de los tubos se vació cuantitativamente en matraces volumétricos de 25 mL, se realizó el

aforo; de la solución anterior se tomaron muestras de 40 a 160 μL , se llevaron a 1 mL con agua; el blanco se preparó con 1 mL de agua destilada. Se prepararon dos estándares con 20 μL glucosa (1 mg/mL) y 80 μL de agua. A cada uno de los tubos se agregaron 2 mL de antrona (0.2 % en H_2SO_4 concentrado), se enfriaron sobre hielo y se leyeron en un espectrofotómetro a 620 nm.

6.3.6.- Determinación del grado de peroxidación lipídica

Método que se basa en la reacción de dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) con una molécula de malondialdehído (MDA) formando un complejo colorido, el cual se lee a 532 nm (Buege y Aust, 1978). Para llevar a cabo la determinación se realizó el siguiente procedimiento:

Se pesaron 0.5 g de hígado, se homogenizaron con 5 mL de agua. Se tomaron alícuotas de 300 μL y se adicionaron 700 μL de Tris-HCl 150 mM; los tubos se incubaron a 37° C durante 30 minutos, transcurrido el tiempo se agregaron 2 mL de ácido tiobarbitúrico al 0.375% disuelto en ácido tricloroacético al 15%, se taparon los tubos y se colocaron en ebullición por un período de 45 minutos. Se centrifugaron 10 minutos a 3000 rpm; el sobrenadante se utilizó para la lectura en el espectrofotómetro.

6.3.7.- Determinación de proteínas

Se aplicó la técnica descrita por Bradford (1976). Para lo cual se colocaron en tubos de ensayo 100 μL del homogenado (preparado para determinar peroxidación lipídica) y 900 μL de agua. Se tomaron alícuotas de 20 μL de la mezcla preparada anteriormente y se llevaron a un volumen final de 100 μL con agua; se preparó un tubo blanco con 100 μL de agua destilada, se agregaron 2.4 mL de reactivo de Bradford y se tomó la lectura en un espectrofotómetro a 595 nm.

El valor de la concentración de proteínas en la muestra se determinó mediante una curva de calibración que se preparó colocando 0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 μL de una solución de albúmina sérica bovina (1mg/mL) y aforando cada uno a 100 μL .

6.3.8.- Determinación de óxido nítrico en hígado

Se homogenizó 1 g de hígado con 5 ml de solución salina al 0.9 % y se centrifugó a 4,300 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se pasó a través de un

filtro de 0.45 μm (Millex-HA, Millipore, Francia) para después ser centrifugado a 16,000 rpm, a 4 °C, durante 60 minutos. Se determinó la concentración total de nitratos/nitritos con un kit colorimétrico comercial (Cayman Chemical Company, MI, EUA). Para cada muestra problema la determinación se realizó por duplicado; además se preparó una curva estándar de acuerdo a las especificaciones del kit.

6.3.9.- Histología

Se aplicó la tinción de hematoxilina/eosina que muestra el núcleo de los hepatocitos de color azul y el citoplasma color rosa, técnica que se describe a continuación:

Las rebanadas de tejido (conservadas previamente en solución fijadora de formaldehído al 10% en solución salina de fosfatos) se desparafinaron y rehidrataron con xileno, etanol absoluto y etanol al 95 %, enseguida se aplicó la hematoxilina de Harris durante quince minutos, se lavaron con agua por 2 minutos. Las muestras se diferenciaron en alcohol ácido con 3 a 10 inmersiones y se observaron al microscopio donde se distinguió el color de los núcleos (azul). Posteriormente, las muestras se lavaron con agua, se sumergieron en agua amoniacal o en solución saturada de carbonato de litio, se lavaron con agua de 10 a 20 minutos, se tiñeron con eosina, se lavaron con etanol al 95%, etanol absoluto (al menos 2 cambios) y xileno (al menos 2 cambios), para finalmente montar las muestras en el polímero Permount o bálsamo.

6.4.- Análisis estadístico

A cada uno de los grupos experimentales se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) de una vía, la cual lleva a cabo una comparación de todos los grupos contra todos, mediante la denominada comparación múltiple pareada total del método de Student-Newman-Keuls; prueba que proporciona la diferencia estadísticamente significativa con una $P < 0.05$. El análisis se realizó en un paquete de Sigma-Stat versión 3.1 (SYSTAT Co. U.S.A.).

Las gráficas que se presentan como parte de los resultados involucran el promedio de cada uno de los datos obtenidos de los grupos, a partir de las determinaciones bioquímicas y +/- el error estándar indicado en la parte superior. En

cada grupo se eliminaron valores aberrantes manteniendo al menos 4 de un total de 6 animales por grupo.

7.- RESULTADOS

Los resultados de cada uno de los marcadores de daño hepático, obtenidos de la metodología descrita se describen a continuación. Los valores promedio de cada uno de los grupos se presentan en forma gráfica.

7.1.- Resultados de los marcadores bioquímicos de daño hepático

La FA (Fig. 29) es una enzima que refleja daño por colestasis, su actividad enzimática se elevó significativamente ($206.8 \mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$) cuando se administró TC (VE + TC) en comparación con los resultados obtenidos en el grupo control (VE + VTC) ($118.7 \mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$), sin embargo, el efecto que ejerce la administración de los extractos en las dos dosis diferentes (250 y 500 mg/Kg) muestra que poseen la capacidad de prevenir parcialmente la colestasis, y siendo mayor con el extracto del *Cirsium ehrenbergii* en dosis de 250 mg/Kg y de manera muy marcada en la dosis de 500 mg/Kg, donde el valor promedio obtenido ($43.5 \mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$) está aún por debajo del grupo control (VE + VTC). Los grupos control de los extractos no modifican los niveles normales de la actividad enzimática (Ecv500 + VTC con un valor promedio de $126.9 \mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ y Ece500 + VTC con un valor promedio de $134.8 \mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$).

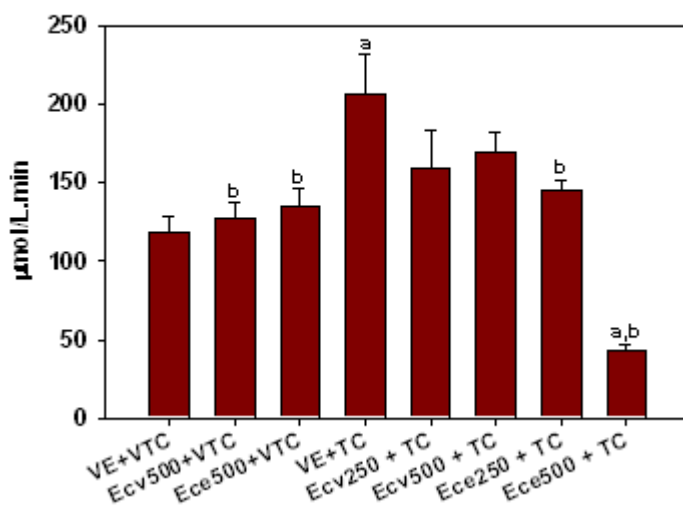


Fig. 29 Actividad enzimática de FA

La actividad enzimática de ALT se determinó en muestras de plasma de ratas Wistar, tanto en el grupo control, grupo tratado con TC disuelto en aceite mineral y grupos administrados con los extractos

hexánicos de *Cirsium vulgare* y *Cirsium ehrenbergii* disueltos en aceite de oliva, de acuerdo al esquema descrito en el apartado de metodología.

Cada una de las barras representa el valor promedio de los experimentos realizados por duplicado \pm el error estándar, con muestras de al menos 4 animales cada uno.

a) Diferente vs. grupo VE + VTC (grupo control).

b) Diferente vs. grupo VE + TC (grupo dañado).

$p < 0.05$, ANOVA, prueba de Student-Newman-Keuls.

Otra enzima cuya actividad indica colestasis es la GGTP, en este caso los grupos tratados con ambos extractos y dosis mostraron una disminución estadísticamente significativa en el valor promedio de GGTP en comparación al grupo VE + TC, donde los niveles están por arriba de los 60 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$. Los grupos Ecv500 + VTC (9.6 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$) y Ece500 + VTC (12.1 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$) muestran que los extractos no causan algún efecto colestásico al organismo por sí mismos, aún en la dosis más alta que se trabajó (Fig. 30).

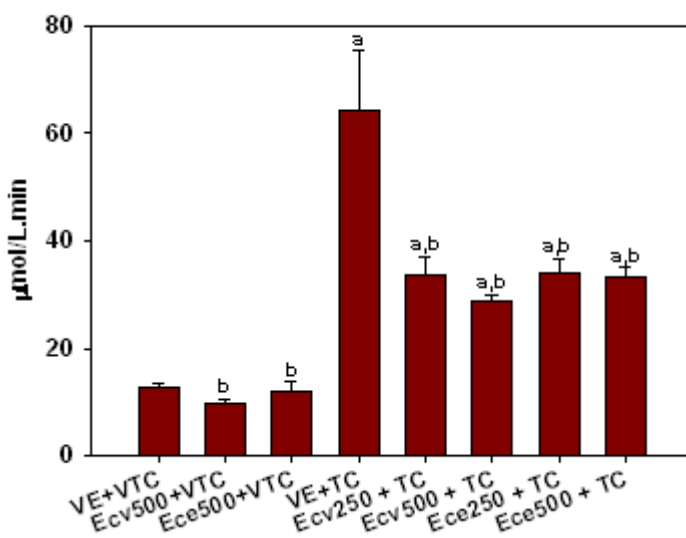


Fig. 30 Actividad enzimática de GGTP

La actividad enzimática de GGTP se determinó en muestras de plasma de ratas Wistar, tanto en el grupo control, grupo tratado con TC disuelto en aceite mineral y grupos administrados con los extractos hexánicos de *Cirsium vulgare* y *Cirsium ehrenbergii* disueltos en aceite de oliva, de acuerdo al esquema descrito en el apartado de metodología.

Cada una de las barras representa el valor promedio de los experimentos realizados por duplicado \pm el error estándar, con muestras de al menos 4 animales cada uno.

a) Diferente vs. grupo VE + VTC (grupo control).

b) Diferente vs. grupo VE + TC (grupo dañado).

p < 0.05, ANOVA, prueba de Student-Newman-Keuls.

La necrosis se manifestó con la elevación de la actividad enzimática de ALT (Fig. 31) la cual se incrementa cuando existe un daño al hígado, como lo expresan las cifras obtenidas en el grupo dañado (VE + TC, 60 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$) que se elevó en un 300%, tal incremento en la actividad enzimática se disminuyó con el extracto hexánico de ambas especies de *Cirsium*, ya que el daño se previno aproximadamente en un 50% utilizando incluso la dosis más baja (250 mg/Kg). Cabe mencionar que la dosis de 500 mg de ambos extractos en los grupos control inducen *per se* un incremento significativo de la actividad enzimática de ALT, pero no se observa un efecto pronecrótico sinérgico en los grupos dañados con TC, incluso a las dosis de 500 mg/Kg.

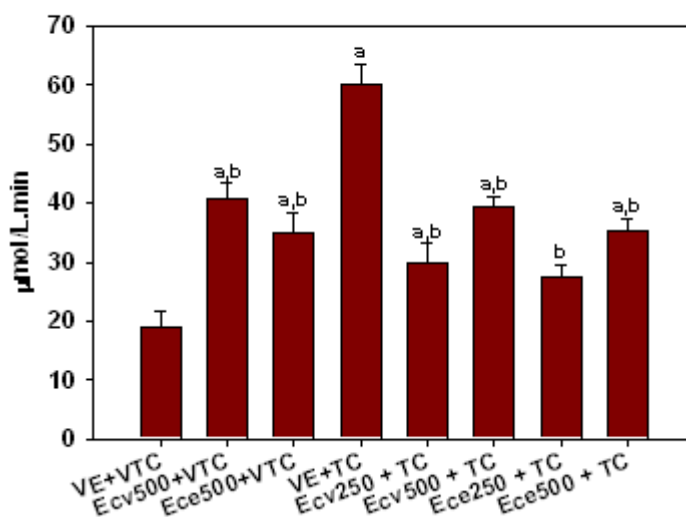


Fig. 31 Actividad enzimática de ALT

La actividad enzimática de ALT se determinó en muestras de plasma de ratas Wistar, tanto en el grupo control, grupo tratado con TC disuelto en aceite mineral y grupos administrados con los extractos hexánicos de *Cirsium vulgare* y *Cirsium ehrenbergii* disueltos en aceite de oliva, de acuerdo al esquema descrito en el apartado de metodología.

Cada una de las barras representa el valor promedio de los experimentos realizados por duplicado \pm el error estándar, con muestras de al menos 4 animales cada uno.

- a) Diferente vs. grupo VE + VTC (grupo control).
- b) Diferente vs. grupo VE + TC (grupo dañado).

p < 0.05, ANOVA, prueba de Student-Newman-Keuls.

La funcionalidad hepática puede evaluarse a partir de la determinación de bilirrubinas en plasma, además de que es también un marcador de colestasis porque

expresa la regurgitación de estos compuestos a la sangre. En ambas determinaciones, tanto en bilirrubinas directas (Fig. 32) como en bilirrubinas totales (Fig. 33), la media de los resultados obtenidos de los grupos a los que se les administraron ambos extractos y el TC muestran una diferencia significativa (para bilirrubinas totales: Ecv500 + TC = 3.6 mg/dL, Ece500 + TC = 1.3 mg/dL, Ecv250 + TC = 2.7 mg/dL, Ece250 + TC = 4.7 mg/dL y para bilirrubinas directas: Ecv500 + TC = 0.9 mg/dL, Ece500 + TC = 6.9 mg/dL, Ecv250 + TC = 2.4 mg/dL, Ece250 + TC = 0.8 mg/dL) respecto al grupo dañado (VE + TC, para bilirrubinas directas 44.2 mg/dL y para bilirrubinas totales 39.6 mg/dL), ya que los niveles disminuyen más del 90% y son muy cercanos a los obtenidos en el grupo control (VE + VTC, en bilirrubinas totales 12.5 mg/dL y bilirrubinas directas 5.0 mg/dL).

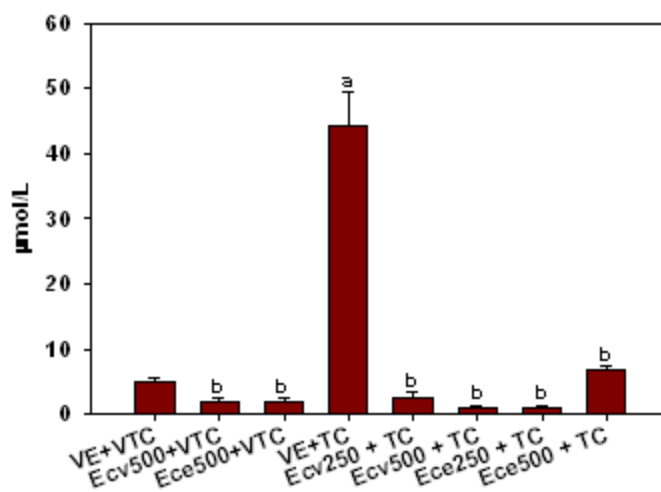


Fig. 32 Determinación de bilirrubinas directas

La concentración de bilirrubinas directas se determinó en muestras de plasma de ratas Wistar, tanto en el grupo control, grupo tratado con TC disuelto en aceite mineral y grupos administrados con los extractos hexánicos de *Cirsium vulgare* y *Cirsium ehrenbergii* disueltos en aceite de oliva, de acuerdo al esquema descrito en el apartado de metodología.

Cada una de las barras representa el valor promedio de los experimentos realizados por duplicado \pm el error estándar, con muestras de al menos 4 animales cada uno.

a) Diferente vs. grupo VE + VTC (grupo control).

b) Diferente vs. grupo VE + TC (grupo dañado).

$p < 0.05$, ANOVA, prueba de Student-Newman-Keuls.

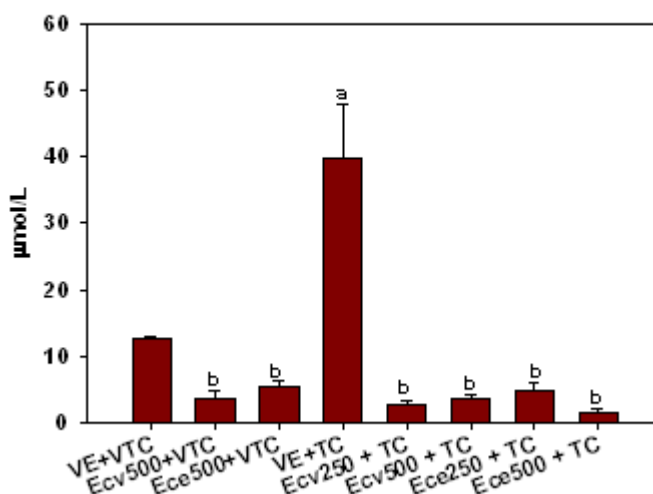


Fig. 33 Determinación de bilirrubinas totales

La concentración de bilirrubinas totales se determinó en muestras de plasma de ratas Wistar, tanto en el grupo control, grupo tratado con TC disuelto en aceite mineral y grupos administrados con los extractos hexánicos de *Cirsium vulgare* y *Cirsium ehrenbergii* disueltos en aceite de oliva, de acuerdo al esquema descrito en el apartado de metodología.

Cada una de las barras representa el valor promedio de los experimentos realizados por duplicado \pm el error estándar, con muestras de al menos 4 animales cada uno.

a) Diferente vs. grupo VE + VTC (grupo control).

b) Diferente vs. grupo VE + TC (grupo dañado).

$p < 0.05$, ANOVA, prueba de Student-Newman-Keuls.

La cuantificación del grado de peroxidación lipídica está relacionado con la determinación de proteínas porque manifiesta la inactivación de enzimas y la modificación de éstas mediante un proceso oxidativo. Se observa un incremento en el grado de peroxidación lipídica (Fig. 34) en el grupo dañado con TC (1.5 nmol MDA/mg proteína), comparado con el grupo control (0.4 nmol MDA/mg proteína), lo que es congruente debido al radical triclorometilo generado durante el metabolismo de este compuesto por el citocromo P-450; para los grupos administrados con TC y tratados con los extractos en ambas dosis los niveles disminuyeron hasta en un 70% respecto al grupo dañado. El grupo control del extracto de *C. ehrenbergii* (Ece500 + VTC) también aumenta el grado de peroxidación cerca del 50% del grupo control dañado, aunque no

alcanza diferencia estadística. Los resultados obtenidos de los grupos administrados con los extractos, que además se les trató con TC, muestran una prevención total de la peroxidación.

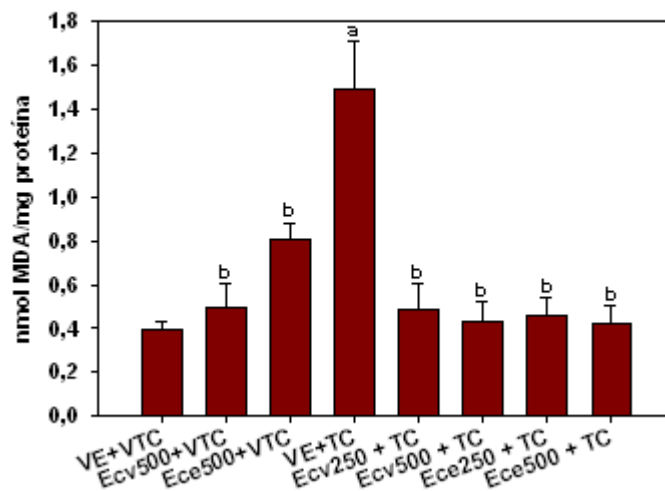


Fig. 34 Grado de peroxidación lipídica

El grado de peroxidación lipídica se determinó en muestras de hígado previamente homogenizadas, tanto en el grupo control, grupo tratado con TC disuelto en aceite mineral y grupos administrados con los extractos hexánicos de *Cirsium vulgare* y *Cirsium ehrenbergii* disueltos en aceite de oliva, de acuerdo al esquema descrito en el apartado de metodología.

Cada una de las barras representa el valor promedio de los experimentos realizados por duplicado \pm el error estándar, con muestras de al menos 4 animales cada uno.

a) Diferente vs. grupo VE + VTC (grupo control).

b) Diferente vs. grupo VE + TC (grupo dañado).

$p < 0.05$, ANOVA, prueba de Student-Newman-Keuls.

El glucógeno es la fuente principal de carbohidratos y la cuantificación de éste es de gran importancia porque refleja la disfuncionalidad y el estrés hepáticos. Como se puede observar en la Fig. 35 la cantidad de glucógeno en el grupo VE + TC (0.12 g glucógeno/100 g de hígado) disminuye considerablemente comparado con el grupo control (VE + VTC con un valor de 1.7 g de glucógeno/100 g de hígado) que refleja los valores promedio normales de glucógeno en ratas. Sin embargo la administración de los extractos (1.9 g de glucógeno/100 g de hígado para Ece500 + VTC y 2.9 g de glucógeno/100 g de hígado para Ecv500 + VTC) por sí mismos conservan la cantidad de éste, incluso el extracto de *C. vulgare* lo incrementa aunque no de forma significativa. Para las ratas tratadas con los extractos y TC (1.6 y 1.2 g de

glucógeno/100 g de hígado en dosis de 500 y 250 mg/Kg respectivamente con el extracto de *C. vulgare*; 2.6 y 1.6 g de glucógeno/100 g de hígado en dosis de 500 y 250 mg/Kg respectivamente de *C. ehrenbergii*), estos niveles se encuentran dentro de los valores normales en relación al grupo control (VE + VTC) lo que indica que los extractos previnieron por completo el estrés y el decaimiento del glucógeno.

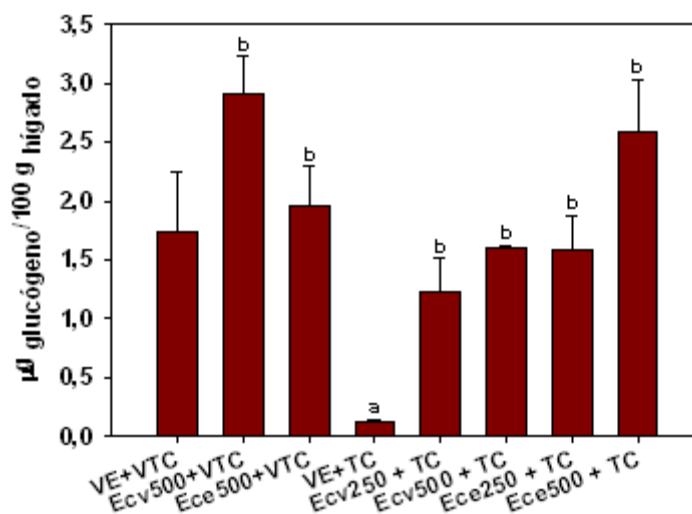


Fig. 35 Cuantificación de glucógeno

La cantidad de glucógeno se determinó en muestras de hígado previamente homogenizadas, tanto en el grupo control, grupo tratado con TC disuelto en aceite mineral y grupos administrados con los extractos hexánicos de *Cirsium vulgare* y *Cirsium ehrenbergii* disueltos en aceite de oliva, de acuerdo al esquema descrito en el apartado de metodología.

Cada una de las barras representa el valor promedio de los experimentos realizados por duplicado \pm el error estándar, con muestras de al menos 4 animales cada uno.

a) Diferente vs. grupo VE + VTC (grupo control).

b) Diferente vs. grupo VE + TC (grupo dañado).

$p < 0.05$, ANOVA, prueba de Student-Newman-Keuls.

Los datos obtenidos de la determinación de óxido nítrico hepático se muestran en la Fig. 36 en donde se observa que el nivel de ON en el grupo VE + VTC (0.20 nmol/mg de hígado) presenta una diferencia estadística significativa con respecto al grupo VE + TC (0.39 nmol/mg de hígado) donde el valor promedio de ON se incrementó cerca del 50%; en los grupos tratados únicamente con los extractos (0.25 nmol/mg de hígado para Ece500 + VTC y 0.24 nmol/mg de hígado para Ecv500 + VTC) se observó que ambos por sí mismos no causan un efecto significativo en la producción de ON. En

los animales a los que se les indujo el daño con TC y además fueron administrados con dosis de 500 mg/Kg (0.22 nmol/mg de hígado para *C. vulgare* y 0.28 nmol/mg de hígado para *C. ehrenbergii*) y 250 mg/Kg (0.25 nmol/mg de hígado para *C. vulgare* y 0.19 nmol/mg de hígado para *C. ehrenbergii*) de ambas especies de *Cirsium*, se previno completamente la elevación de ON inducida por el TC ya que los valores se encuentran dentro de los normales, por lo que la prueba Student-Newman-Keuls no sugiere diferencia significativa respecto al grupo control (VE + VTC), pero si con el grupo dañado (VE + TC).

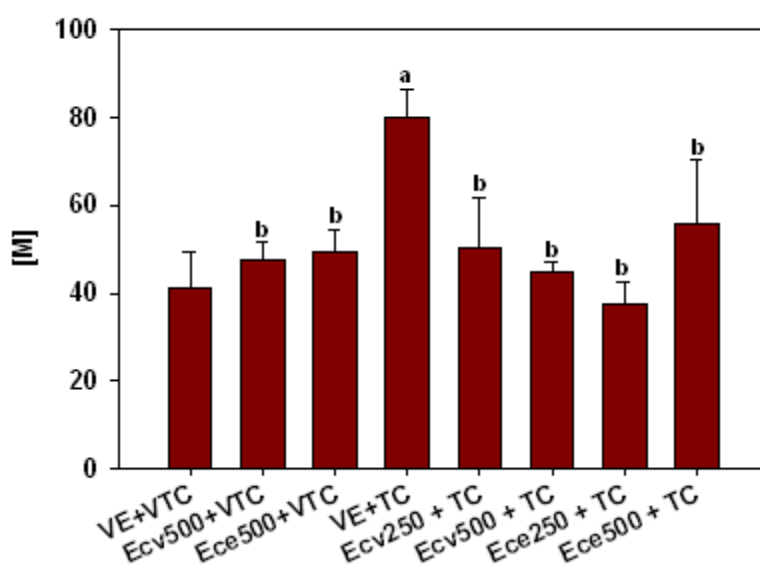


Fig. 36 Determinación de nitratos/nitritos

La concentración de nitratos/nitritos se determinó en muestras de hígado previamente homogenizadas, tanto en el grupo control, grupo tratado con TC disuelto en aceite mineral y grupos administrados con los extractos hexánicos de *Cirsium vulgare* y *Cirsium ehrenbergii* disueltos en aceite de oliva, de acuerdo al esquema descrito en el apartado de metodología.

Cada una de las barras representa el valor promedio de los experimentos realizados por duplicado \pm el error estándar, con muestras de al menos 4 animales cada uno.

- a) Diferente vs. grupo VE + VTC (grupo control).
- b) Diferente vs. grupo VE + TC (grupo dañado).

$p < 0.05$, ANOVA, prueba de Student-Newman-Keuls.

7.2.- Resultados de Histología

La figura 37 muestra la tinción hematoxilina/eosina, en la cual el grupo control VE + VTC se observa sin modificaciones en el parénquima y existe una superficie

homogénea en cuanto a la distribución de los hepatocitos; sin embargo, en el grupo VE + TC se distinguen importantes zonas de daño, necrosis diseminada tipo balonin y una marcada esteatosis hepática con hepatocitos vacuolados. Para los grupos control tratados con los extractos Ecv500 + VTC y Ece500 + VTC el tejido hepático se observa aparentemente sano, en algunas áreas con reacción inflamatoria, aunque es muy ligera. Para animales dañados y tratados con dosis de 250 mg/Kg de ambos extractos: Ecv250 + TC y Ece250 + TC se aprecian características muy similares ya que ambos presentan una congestión y una tenue inflamación, aunque se puede considerar que es un tejido evidentemente sano. En la tinción de la muestra hepática del grupo Ecv500 + TC se percibe una muy escasa vacuolización y una ligera inflamación perivascular, pero en general el hígado se encuentra aparentemente regenerado y normal, lo mismo sucede para el grupo Ece500 + TC.

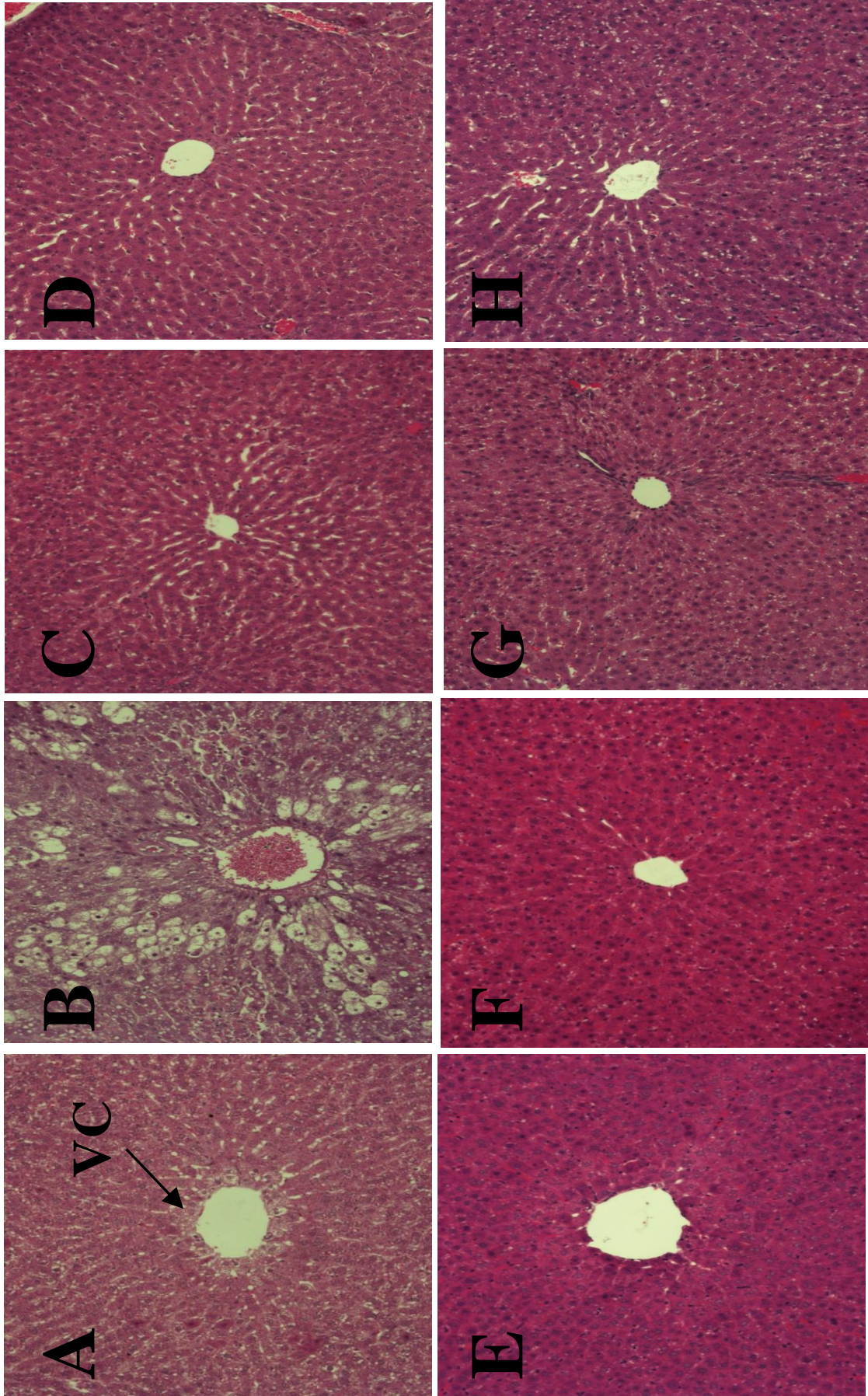


Fig. 37 Panel histológico de la tinción hematoxilina/eosina (10X)

A) VE + VTC, B) VE + VTC + VTC, C) Ecv500 + VTC, D) Ecv250 + TC, E) Ecv500 + TC, F) Ecv500 + TC, G) Ecv500 + TC, H) Ecv500 + TC.

8.- DISCUSIÓN

Las especies *Cirsium vulgare* y *Cirsium ehrenbergii* han sido utilizadas para el tratamiento de padecimientos diversos en algunos estados de la República Mexicana, entre ellos, el estado de Hidalgo. Se han realizado estudios acerca de las propiedades hepatoprotectoras de plantas del género *Cirsium*, sobre todo en países de Oriente donde se utiliza para el tratamiento de hepatitis y cirrosis; en la mayoría de los casos se han utilizado extractos polares. Para la elaboración del presente trabajo se obtuvieron los extractos no polares (hexánicos) de las flores de ambas plantas, esto se decidió porque se realizó un estudio fitoquímico y biológico preliminar, donde se observó una mayor actividad biológica con los extractos hexánicos que con los extractos metanólicos, por lo tanto resultó interesante evaluar las propiedades hepatoprotectoras de los extractos no polares (Fernández-Martínez *et al.*, 2007), los cuales mostraron una actividad biológica hepatoprotectora interesante que se discutirá a continuación.

Se administraron dos dosis de los extractos: 250 mg/Kg y 500 mg/Kg, puesto que son cantidades medias que han sido manejadas para el estudio de los efectos biológicos de especies del género *Cirsium* y han proporcionado buenos efectos terapéuticos, tal es el caso del *Cirsium setidens* Nakai donde se aplicaron 500 mg/Kg del extracto (Lee *et al.*, 2008).

En la sección anterior se presentaron los resultados obtenidos de la determinación de los marcadores de daño hepático. Con respecto a los marcadores que indican colestasis, los niveles en la actividad enzimática de FA disminuyeron en los grupos tratados con los extractos en comparación al grupo dañado con TC, así mismo corrobora la actividad antioleostática de los extractos con la disminución en la actividad de GGTP. Se han realizado estudios acerca de la capacidad antioleostática de productos naturales, entre ellos destacan: a) el ácido cafeico presente en extractos del *Rosmarinus officinalis* (romero) o en el propóleo, este compuesto es conocido por su capacidad para mantener los niveles normales de FA y GGTP durante la intoxicación con TC, esto se debe a su potencial para inhibir la síntesis de leucotrienos proinflamatorios y simultáneamente estimular la síntesis de algunas prostaglandinas (Pérez-Álvarez *et al.*, 1993; Muriel, 2003); b) el ácido trimetilcolchicínico análogo de la colchicina (**16**), el cual mostró tener propiedades antioleostáticas aún en dosis seguras

y mayores con respecto a las administradas con colchicina que es un producto natural tóxico en dosis medias (Cedillo *et al.*, 1996; Muriel, 2003); c) extractos butanólicos del *Cirsium setidens* los cuales exhibieron la capacidad de disminuir los marcadores de daño al hígado, incluyendo FA, protegiendo de la hepatotoxicidad causada por la D-galactosamina (Yoo *et al.*, 2008), relacionada a la sobreactivación de células Kupffer (Galanos *et al.*, 1979; Stachlewitz *et al.*, 1999; Yoo *et al.*, 2008). El efecto anticolestático de los extractos puede ser originado además por una mejora en el flujo biliar a nivel intrahepático y por activación de los transportadores de sales biliares y bilirrubinas de las membranas de los hepatocitos, como se discutirá más adelante.

La determinación de bilirrubinas directas y totales expresa la funcionalidad hepática, ya que un incremento de éstas señala la sobreproducción, regurgitación o alteraciones en la capacidad de excreción de las mismas. En los grupos tratados con los extractos con y sin administración de TC la cantidad de bilirrubinas directas y totales se mantiene baja e incluso está dentro de los valores obtenidos en el grupo control normal, pero sí existe una diferencia significativa con respecto al grupo VE + TC donde los niveles aumentan considerablemente. El potencial de los extractos para disminuir la concentración de bilirrubinas tal vez pueda deberse a la posible capacidad de los mismos para disminuir la concentración de citocinas proinflamatorias, entre ellas el TNF- α , ya que algunos estudios indican que un aumento en la concentración de TNF- α inhibe la actividad de transportadores de ácidos biliares y por lo tanto aumentan la concentración interna de bilirrubinas y ácidos biliares (Green *et al.*, 1996; Lickteig *et al.*, 2007) induciendo la presencia de colestasis.

ALT es una enzima que indica necrosis tisular, para los grupos administrados con ambos extractos se observó que los niveles están por arriba de los valores normales obtenidos en el grupo control VE + VTC, lo que sugeriría un aumento de la necrosis inducida *per se*. A pesar de estos resultados, no puede considerarse que existe un daño hepático propiciado por los extractos ya que la actividad de FA y GGTP están normales y el resto de los marcadores bioquímicos de daño también, lo que se corroboró con el análisis histológico de la tinción hematoxilina/eosina; el aumento de ALT puede atribuirse a algunos compuestos presentes en ambos extractos que no dañan directamente a las células hepáticas ni indujeron el incremento de ALT debido a colestasis (Méndez-Sánchez *et al.*, 2001) hecho que se descarta debido a los niveles

bajos de los marcadores de colestasis en los grupos tratados con extractos. Por el aumento de ALT (comparado con el resultado obtenido en el grupo VE + VTC), se puede suponer que la mezcla de compuestos extraídos pueden actuar de manera distinta sobre el citosol de células hepáticas, que es donde se encuentra, posiblemente poseen la capacidad de aumentar la actividad enzimática intrínseca o la concentración de la enzima reflejada como la síntesis de *novo* de ella. El estudio de metabolitos secundarios ha mostrado su capacidad de inhibir o estimular la síntesis de enzimas durante la protección al hígado de agentes tóxicos, por ejemplo el emodin (1,3,8-trihidroxi-6-metilantraquinona), es un compuesto extraído de la raíz gigante de Knotweed que disminuye los niveles de ALT cerca del 40% comparados con el grupo control dañado tratado con TC y que de forma similar en este trabajo, también incrementa *per se* la actividad de ALT, sin embargo no mostró un efecto sinérgico pronecrótico durante el daño y el emodin ha sido considerado un agente terapéutico hepatoprotector (Dong *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos por Dong y colaboradores (2009) son semejantes a los que presentan ambos extractos hexánicos de *Cirsium*, ya que éstos disminuyen hasta un 50% la actividad enzimática en relación al grupo VE + TC, mostrando un efecto antinecrótico.

El TC, como ya se explicó, es un agente hepatotóxico que es metabolizado por el citocromo P-450 para generar un radical altamente reactivo ($\bullet\text{CCl}_3$) (Edwards *et al.*, 1993), causando peroxidación lipídica en el retículo endoplásmico, daño a la membrana plasmática y un incremento del calcio intracelular (Farber y El-Mofty, 1975; Edwards *et al.*, 1993). Además de que se ha propuesto la participación de células Kupffer en la toxicidad del TC, ya que durante su metabolismo éstas son activadas por el incremento celular del Ca^{2+} , causando la liberación de citocinas proinflamatorias que contribuyen a la muerte de los hepatocitos (Birmelin y Decker, 1983; Decker *et al.*, 1989).

La peroxidación lipídica es el proceso por el cual las membranas celulares son destruidas por compuestos reactivos (radicales), es una de las consecuencias más evidentes debido a la intoxicación con TC (Recknagel *et al.*, 1989). Los resultados muestran que los extractos *C. vulgare* y *C. ehrenbergii* en ambas dosis, tienen la capacidad de prevenir el grado de peroxidación lipídica (hasta un 70%, lo que mantiene los niveles dentro de los obtenidos en el grupo control VE + VTC) ocasionado por el metabolismo del TC en el hígado. El posible mecanismo de acción de los extractos es la

capacidad atrapadora de radicales libres de moléculas presentes en los extractos no polares que son consideradas como agentes con actividad antioxidante, hecho que se ha demostrado en extractos de especies que pertenecen al mismo género, tal es el caso del *Cirsium setidens* Nakai del que se obtuvieron extractos polares con butanol, que previenen el daño al hígado con TC (Lee *et al.*, 2008) y D-galactosamina, definiendo como responsables de la hepatoprotección a la pectolinarina (25) y pectolinarigenina (26) (Yoo *et al.*, 2008). El *Cirsium japonicum* especie de la que aisló al 7-hispiludín neoesperidosido (27) a partir de una extracción metanólica a quien se le hace responsable de inhibir la peroxidación en las membranas (Park, 2004) y por último, los extractos polares del *Cirsium arisanense* Kitamura que mostraron un buen efecto protector, señalando como causantes de su actividad a la gran cantidad de flavonoides con capacidad antioxidante como atrapador de radicales libres, comparada con la de alimentos ingeridos en la dieta humana como la papa y zanahoria (Ku *et al.*, 2008). Aunque, también cabe la posibilidad de que los compuestos extraídos con hexano disminuyan la cantidad o la actividad del citocromo P-450, y así el agente hepatotóxico no pueda causar tal daño al no ser metabolizado en el retículo endoplásmico, como sucede en el tratamiento con la “colchicina”, alcaloide que ha sido muy ampliamente estudiado por sus efectos positivos en lo que se refiere a la prevención del daño hepático (Martínez *et al.*, 1995).

El óxido nítrico es una molécula inestable pues es un radical libre, de tiempo de vida muy corta, se cuantifica a partir de sus productos finales, nitratos y nitritos (Muriel, 2003), además juega un papel importante en padecimientos hepáticos como la cirrosis, la fibrosis, y la toxicidad con paracetamol, entre otros (Muriel, 2006). Bajo ciertas condiciones el ON posee capacidad protectora, aunque también puede contribuir al daño hepático (Li y Billiar, 1999). En este estudio, la concentración de nitratos/nitritos de los grupos controles de los extractos (Ece500 + VTC y Ecv500 + VTC), no mostró un cambio significativo con respecto al grupo control, lo que lleva a suponer que los extractos por sí mismos no estimulan la síntesis del ON ni su inhibición al ser administrados a las ratas. Sin embargo, el tratamiento con TC promovió una elevación en la concentración del ON; este hecho coincide con reportes previos que señalan que el ON es regulado a la alza por la expresión de iNOS en hepatocitos y células de Kupffer en respuesta a citocinas proinflamatorias durante el daño con TC y durante

otros eventos patológicos en el hígado (Decicco *et al.*, 1998; Fernández-Martínez *et al.*, 2006 y 2008). En los grupos administrados con los extractos de *Cirsium vulgare* y *ehrenbergii*, en ambas dosis, y tratados con TC se observó que la concentración de nitratos/nitritos se mantuvo dentro de los niveles normales, es decir, los extractos previnieron el incremento en la producción de ON. Como se mencionó, el ON posee efectos duales, tanto hepatoprotectores como deletéreos (Li y Billiar, 1999), y aunque en este estudio el ON no ejerció un efecto protector, sí se sugiere que contribuye al incremento del deterioro hepático; este hecho se refleja en el grado de peroxidación lipídica elevado en el grupo dañado (VE + TC), puesto que el aumento de ON, que es un radical libre, reacciona con especies reactivas de oxígeno como los superóxidos para producir peroxinitritos, los cuales contribuyen aún más al estrés oxidativo, hecho que se suma al daño producido por el metabolismo del TC (Li y Billiar, 1999). Por lo tanto, la disminución del estrés oxidativo depende también de la reducción en la concentración de nitratos/nitritos presentes en el hígado, lo que se logró con el tratamiento preventivo de los extractos; más aún, se puede sugerir que la administración de los extractos inhibió la cascada proinflamatoria inducida por el TC.

El glucógeno es quizás, la fuente principal de energía en el organismo y el control de su síntesis y degradación es muy importante para regular los niveles de glucosa en el plasma (Horton *et al.*, 1994; Fernández-Martínez *et al.*, 2008), la disminución de éste se interpreta como la existencia de un padecimiento hepático y estrés. En el grupo VE + TC los niveles de glucógeno fueron casi depletados hasta 0.12 g/100 g de hígado cuando en condiciones normales se encuentra cerca de 1.7 g/100 g de hígado (grupo VE + VTC), lo que confirma que, efectivamente, durante la existencia de algún tipo de daño al hígado el glucógeno decae debido al desgaste de energía. Existe una relación estrecha entre la concentración de nitratos/nitritos con la cantidad de glucógeno, en los grupos Ecv + TC y Ece + TC (ambas dosis: 250 y 500 mg/kg) y Ecv500 + VTC y Ece500 + VTC la concentración de nitratos/nitritos se mantienen normales, y el glucógeno aumenta comparado con el grupo VE + TC, lo que nos lleva a apoyar la idea de que los metabolitos secundarios menos polares de ambos extractos previnieron la producción de óxido nítrico y por ende el estrés oxidativo que promovería un daño mayor en el hígado, esto debido a que se ha reportado que el ON inhibe la síntesis de glucógeno, lo que se ha demostrado con la administración de

lipopolisacárido (LPS) que es un agente que induce la síntesis de ON y conlleva a la disminución en la cantidad de glucógeno (Fernández-Martínez *et al.*, 2008).

La tinción de hematoxilina/eosina permite observar el núcleo y citoplasma de los hepatocitos de distinto color (azul y rosa respectivamente) el análisis histológico complementa los resultados obtenidos de la determinación de marcadores bioquímicos, con lo que se corrobora el efecto hepatoprotector que poseen los extractos florales de las dos especies de *Cirsium* (dosis 250 o 500 mg/kg + TC), que a pesar de presentar ligera inflamación en el tejido, no se observa necrosis, lo que lleva a sostener la idea de la capacidad de compuestos presentes en los extractos para inducir la síntesis o la actividad enzimática de ALT, pero no el daño. Cabe señalar que la administración de los extractos: Ecv500 + VTC y Ece500 + VTC no ejercen alguna modificación sobre el parénquima hepático y por lo tanto sin efectos dañinos al organismo; por el contrario, se observó actividad antinecrótica, antioleostática y mejora en la funcionalidad hepática durante el daño, así como un efecto inhibitorio del estrés oxidativo.

9.- CONCLUSIONES

Con en el desarrollo de este trabajo se puede concluir:

- La evaluación de los extractos mostró que ejercieron una actividad hepatoprotectora sobre el daño inducido con TC en ratas al mantener la funcionalidad y el contenido de glucógeno.
- La administración de los extractos hexánicos florales de *Cirsium vulgare* y *Cirsium ehrenbergii* posee un efecto antinecrótico y anticolestático, puesto que disminuyen sus marcadores bioquímicos de daño.
- El efecto hepatoprotector es similar con ambos extractos, así mismo, las dos dosis administradas evidencian un nivel muy parecido de prevención del daño.
- Los extractos tienen efectos antioxidantes al disminuir la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo con la reducción del nivel de ON hepático.
- El estudio de productos naturales es de gran importancia porque abre la posibilidad de contar con nuevos fitofármacos, que en un futuro puedan proveer mejores condiciones de vida a pacientes con enfermedades crónico-degenerativas, como lo son los padecimientos hepáticos. Los resultados obtenidos muestran una alta capacidad de los extractos hexánicos florales de *C. vulgare* y *C. ehrenbergii* para prevenir el daño en hígado por lo que se sugiere ampliar la investigación hacia la química de estas especies con el fin de conocer la estructura de las moléculas bioactivas.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar-Ramírez, J. R. (2003). Capítulo 26: Hepatotoxicidad por químicos o medicamentos en *Conceptos actuales en hepatología* de Méndez-Sánchez, N.; Uribe, M. (Primera ed.). México, D. F.: Masson Doyma, pp. 252-254.

Aguirre-García, J. (2003). Capítulo 1: Anatomía e histología normales del hígado en *Conceptos actuales en hepatología* de Méndez-Sánchez, N.; Uribe, M. (Primera ed.). México, D. F.: Masson Doyma, pp. 3-8.

Barbour, E. K.; Al Sharif, M.; Sagherian, V. K.; Habre, A. N.; Talhouk, R. S.; Talhouk, S. N. (2004). Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol*; **63**: 1-7.

Benítez-Badillo, G. (1986). *Arboles y flores de Ajusco* (Primera ed.). México: Instituto de Ecología, pp. 135.

Berger, L.; Rudolph, G. N. (1963). Alkaline and acid phosphatase en *Standard methods of clinical chemistry*. (Vol. V). New York: Meites Academic Press, pp. 5673.

Bergmeyer, H. U.; Grabl, M.; Walter, H. E. (1983). Capítulo: Enzymes en *Methods of enzymatic analysis* de Bergmeyer H. U.; Grabl M. Alemania: Verlag-chemie Weinheim, pp. 269-270

Birmelin, M.; Decker, K. (1983). Ca²⁺ flux as an initial event in phagocytosis by rat Kupffer cells. *Eur J Biochem*; **131**: 539-543

Blanckaert, N.; Gollan, J.; Schmid, R. (1979). Bilirrubin diclucuronide synthesis by a UDP-glucuronic acid-dependent enzyme system in rat liver microsomes. *Proc Natl Acad Sci*; **76**: 2037-2041.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the cuantitation of microgram cuantities of protein utilizing the principal of protein dye binding. *Anal Biochem*; **72**: 248-254.

Buege, J. A.; Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzimol*; **52**: 302-310.

Calderón de Rzedowski, G.; Rzedowski, J. (2001). *Flora fanerogámica del Valle de México* (Primera ed.). Pátzcuaro, Mich.: Instituto de Ecología, pp. 950-957.

Cedillo, A.; Mourelle, M.; Muriel, P. (1996). Effect of colchicine and trimethylcolchicinic acid on CCl₄-induced cirrhosis in the rat. *Pharmacol Toxicol*; **79**: 241-246.

Decicco, L. A.; Rikans, L. E.; Tutor, C. G. et al. (1998). Serum and liver concentrations of tumor necrosis factor α and interleukin-1 β following administration of carbon tetrachloride to male rats. *Toxicol Lett*; **98**: 519-523.

Dong, M. X.; Jia, Y.; Zhang, Y. B.; Li, C. C.; Geng, Y. T.; Zhou, L.; Li, X. Y.; Liu, J. C.; Niu, Y. C. (2009). Emodin protects rat liver from CCl₄-induced fibrogenesis via inhibition of hepatic stellate cells activation. *Gastroenterol*; **15**: 4753-4762.

Edwards, M. J.; Keller, B. J.; Kauffman, F. C.; Thurman, R. G. (1993). The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*; **119**: 275-279.

Farber, J. L.; El-Mofty, S. K. (1975). The biochemical pathology of liver cells necrosis. *Am J Physiol*; **81**: 237-250.

Farrell, G. C. (2004). Capítulo 73: Hepatopatía causada por fármacos, anestésicos y toxinas en *Enfermedades gastrointestinales y hepáticas. Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento* de Feldman, M.; Friedman, S. L.; Sleisenger, M. H. (Séptima ed., Vol. II). Buenos Aires, Argentina: Médica panamericana, pp. 1489, 1490, 1512, 1513 y 1527.

Fernández-Martínez, E. (2000). *Síntesis de un análogo de talidomida (3-ftalimido-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanamida) y su evaluación farmacológica en la cirrosis biliar secundaria en la rata*, Tesis de maestría, Centro de investigación de estudios avanzados del Instituto politécnico nacional, México, pp. 69-74, 77.

Fernández-Martínez, E.; Díaz-Espinoza, R.; Villavicencio-Nieto, M. A.; Pérez-Escandón, B. E.; Pérez-Hernández, N.; Macías, A.; Ortiz, M. I.; Ponce-Monter, H. A. (2007). Preliminary phytochemical and biological study of *Cirsium ehrenbergii*. *Proc. West Pharmacol Soc*; **50**: 162-164.

Fernández-Martínez, E.; Pérez-Álvarez, V.; Tsutsumi, V.; Shibayama, M.; Muriel, P. (2006). Chronic bile duct obstruction induces changes in plasma and hepatic levels of cytokine and nitric oxide in the rat. *Exp Toxicol Pathol*; **58**: 49-58.

Fernández-Martínez, E.; Wens-Flores, I.; Moreno, M. G.; Ortiz, M. I.; Muriel, P.; Pérez-Álvarez, V. (2008). Short-term effects of thalidomide analogs on hepatic glycogen and nitric oxide in endotoxin-challenged rats. *Gen Physiol Biophys*; **27**: 203-210.

Galanos, C.; Freudenberg, M. A.; Reutter, W. (1979). Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci*; **76**: 5939-5943.

Garrigues, V. G.; Ponce J. G. (1996). Capítulo 5: Fisiología de la vía biliar en *Tratado de Hepatología* de Herrerías, G. et al.; (Vol. II). Sevilla, España: Ed. Universidad de Sevilla.

Glossman, M.; Neville, D. M. (1972). Glutamyl transferase in kidney brush border membranes. *FEBS Lett*; **19**: 340-344.

Green, R. M.; Beier, D.; Gollan, J. L. (1996). Regulation of hepatocyte bile salt transporters by endotoxin and inflammatory cytokines in rodents. *Gastroenterology*; **11**: 193-198.

Horton, R. A.; Ceppi, E. D.; Knowles, R. G.; Titheradge, M. A. (1994). Inhibition of hepatic gluconeogenesis by nitric oxide: a comparison with endotoxic shock. *Biochem J*; **299**: 735-739.

Jenkins, W. J.; Billing, B. (1987). Capítulo 147: Fisiología del hígado en *Gastroenterología, Hígado* de Berk, J.E. (Cuarta ed., Vol. V). Barcelona, España: Salvat Editores, pp. 2920-2940.

Kim, E. Y.; Jho, H. K.; Kim, D.I.; Rhyu, M. R. (2008). *Cirsium japonicum* elicits endothelium-dependent relaxation vía Histamine H1-receptor in rat thoracic aorta. *J Ethnopharmacol*; **116**: 223-227.

Ku, K. L.; Tsai, C. T.; Chang, W. M.; Shen, M. L.; Wu, C. T.; Liao, H. F. (2008). Hepatoprotective effect of *Cirsium arisanense* Kitamura in tacrine-treated hepatoma hep 3B cells and C57BL mice. *Am J Chin Med*; **36**: 335-368.

Kuntz, E.; Kuntz, H.-D. (2006). *Hepatology. Principles and Practice* (Segunda ed.). Alemania, pp. 20, 21, 568, 573 y 866.

Lee, S. H.; Heo, S. I.; Li, L.; Lee, M. J.; Wang, M. H. (2008). Antioxidant and hepatoprotective activities of *Cirsium setidens* Nakai against CCl₄-induced liver damage. *Am J Chin Med*; **36**: 107-114.

Lee, W. B.; Kwon, H. C.; Cho, O. R.; Lee, K. C.; Choi, S. U.; Baek, N. I.; Lee, K. R. (2002). Phytochemical constituents of *Cirsium setidens* Nakai and their cytotoxicity against cancer cell lines. *Arch Pharm Res*; **25**: 628-635.

Lickteig, A. J.; Slitt, A. L.; Arkan, M. C.; Karin, M.; Cherrington, N. J. (2007). Differential regulation on hepatic transporters in the absence of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , interleukin-6, and nuclear factor- κ B in two models of cholestasis. *Drug Metab Dispos*; **35**: 402-409.

Li, J.; Billiar, T. R. (1999). Nitric oxide. IV Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *Am J Physiol*; **276** (*Gastrointest Liver Physiol*): G1069-G1073.

Liu, S.; Zhang, J.; Li, D.; Liu, W.; Luo, X.; Zhang, R.; Li, L.; Zhao, J. (2007). Anticancer activity and quantitative analysis of flavone of *Cirsium japonicum* DC. *Nat Prod Res*; **21**: 915-922.

Loizzo, M. R.; Statti, G. A.; Tundis, R.; Conforti, F.; Ando, S.; Menichini, F. (2004). Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Cirsium tenoreanum*. *Fitoterapia*; **75**: 577-580.

Maher, J. J. (2003). Capítulo 39: Enfermedad hepática alcohólica en Diagnóstico y tratamiento en *Gastroenterología* de Friedman, S. L.; McQuaid, K. R.; Grendell, J. H. (Segunda ed.). México, D.F.: Manual moderno, pp. 564, 565 y 657-659.

Martínez, M. (1996). *Las plantas medicinales de México* (Séptima ed.). México, D.F.: Ediciones botas, pp. 124, 142, 144, 181 y 216.

Martínez, M.; Mourelle, M.; Muriel, P. (1995). Protective effect of colchicine on acute liver damage induced by CCl₄. Role of cytochrome P-450. *J Applied toxicology*; **15**: 49-52.

Martínez-Pérez, E. R. (2007). *Plantas medicinales de la comunidad de Plomosas, Mpio. de Actopan, Hidalgo*, Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del estado de Hidalgo, México, pp. 59, 135.

Martínez-Vázquez, M.; Ramírez-Apán, T. O.; Lastra, A. L.; Bye, R. (1998). A comparative study of the analgesic and anti-inflammatory. Activities of pectolinarin isolated from *Cirsium subcoriaceum* and linarin isolated from *Buddleia cordata*. *Planta med*; **64**:134-137.

Méndez-Sánchez, N. (2003) Capítulo 11: Circulación enterohepática de ácidos biliares en *Conceptos actuales en hepatología* de Méndez-Sánchez, N.; Uribe, M. (Primera ed.). México, D. F.: Masson Doyma, pp. 101.

Méndez-Sánchez, N. (2003) Capítulo 27: Enfermedad hepática por alcohol en *Conceptos actuales en hepatología* de Méndez-Sánchez, N.; Uribe, M. (Primera ed.). México, D. F.: Masson Doyma, pp. 259.

Méndez-Sánchez, N.; Chavez-Tapia, N. C.; Uribe, M. (2005). Capítulo 40: Fisiología hepática en *Gastroenterología* de Méndez-Sánchez, N.; Uribe-Esquivel, M. México, D. F.: Mc. Graw Hill, pp. 419, 420.

Méndez-Sánchez, N.; Guevara-González, L.; Uribe-E., M. (2003). Capítulo 22: Pruebas de funcionamiento hepático en *Conceptos actuales en hepatología* de Méndez-Sánchez, N; Uribe, M. (Primera ed.). México, D. F.: Masson Doyma, pp. 201-206.

Méndez-Sánchez, N.; Guevara-González, L.; Uribe-Esquivel, M. (2001). Capítulo 5: Pruebas de funcionamiento hepático en *Pruebas de laboratorio e imagen en Gastroenterología y Hepatología* de Méndez-Sánchez, N.; Guevara-González, L.; Uribe-Esquivel, M. México, D. F.: El manual moderno, pp. 22, 23, 24.

Méndez-Sánchez, N; Uribe, M.; Wolpert, E. (1993). Capítulo 104: Metabolismo y alteraciones de la bilirrubina en *Gastroenterología* de Villalobos, J. J. (Cuarta ed., Vol. II). México, D.F.: Méndez Editores, pp. 1303 y 1305.

Monroy-Ortíz, C.; Castillo-España, P. (2000). *Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos* (Primera ed.). México: CIB-UAEM, pp. 58.

Muriel, P. (1998). Nitric oxide protection of rat liver from peroxidation, collagen accumulation, and liver damaged induced by carbon tetrachloride. *Biochem pharmacol*; **56**: 773-779.

Muriel, P. (2003). Capítulo 8: Farmacología hepática experimental en *Conceptos actuales en hepatología* de Méndez-Sánchez, N; Uribe, M. (Primera ed.). México, D. F.: Masson Doyma, pp. 63-67.

Muriel, P. (2006). Capítulo 7: Role of nitric oxide in liver disorders en *Liver diseases, Biochemical mechanisms and new therapeutic insights* de Ali, S.; Friedman, S. L.; Mann, D. A. (Primera edición, Vol. I). E.U.A.: Science publishers, pp. 115, 116.

Muriel, P.; Rivera-Espinoza, Y. (2008). Beneficial drugs for liver diseases. *J Appl Toxicol*; **28**: 93-103.

Nazaruk, J.; Jaconiuk, P. (2005). Flavonoid composition and antimicrobial activity of *Cirsium rivulare* (Jacq.) All. flowers. *J Ethnopharmacol*; **102**: 208-212.

Olivera-Martínez, M. A. (1993). Capítulo 108: Pruebas de funcionamiento hepático en *Gastroenterología* de Villalobos, J. J. (Cuarta ed., Vol. II). México, D.F.: Méndez Editores, pp. 1365 y 1366.

Park, J. C.; Hur, J. M.; Park, J. G.; Kim, S. C.; Park, J. R.; Choi, S. H.; Choi, J. W. (2004). Effects of metanol extract of *Cirsium japonicum* var. *Ussuriense* and its principle, Hispiludin-7-O-Neohesperidose on hepatic alcohol-metabolizing enzymes and lipoperoxidation in ethanol-treated rats. *Phytother Res*; **18**: 19-24.

Pérez-Álvarez, U. M. (2003). Capítulo 7: Papel del hígado en el metabolismo de fármacos en *Conceptos actuales en hepatología* de Méndez-Sánchez, N; Uribe, M. (Primera ed.). México, D. F.: Masson Doyma, pp. 53.

Pérez-Álvarez, V.; Bobadilla-Lugo, R. A.; Muriel, P.; Favari, L. et al. (1993). Effects of leukotrienes synthesis inhibition on acute liver induce by carbón tetrachloride. *Pharmacology*; **47**: 330-336.

Pérez-Escandón, B. E.; Villavicencio-Nieto, M. A.; Ramírez-Aguirre, A. (2003). *Lista de las plantas útiles del estado de Hidalgo* (Primera ed.). Pachuca, Hidalgo: UAEH, pp. 24, 65, 64, 69, 76, 80, 81, 85 y 88.

Pérez-Gutiérrez, R. M.; Ramírez, E.; Vargas, R. (2001). Effect of *Cirsium pascuarensis* on blood glucose levels of normoglycaemic and Alloxan-diabetic mice. *Phytother Res*; **15**: 552-554.

Popper, H.; Schaffner, F. (1987). Capítulo 148: Colestasis en *Gastroenterología, Hígado* de Berk, J.E. (Cuarta ed., Vol. V). Barcelona, España: Salvat Editores, pp. 2949, 2950.

Quiroz-Gutiérrez, F. (2002). *Tratado de anatomía humana, Aparatos respiratorio, Digestivo y Genitourinario. Glándulas de secreción interna y órganos de los sentidos* (Trigésimoctava Ed. Vol. III). México, D. F.: Porrúa, pp. 181.

Recknagel, R. O; Glende, E. A. Jr.; Dolak, J. A.; Waller, R. T. (1989). Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmac. Ther*; **43**: 139-154.

Reitman, S.; Frankel, S. (1957). A colorimetric method for determination of serum oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol*; **28**: 56-63.

Rico-Almanza, M. M. (2003). *Evaluación de las propiedades hepatoprotectoras de algunos análogos del ácido cafeíco. Importancia del régimen de dosificación*, Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México, pp. 3, 4 y 10.

Rivera-González, H. I. (2005). *Evaluación de la actividad hepatoprotectora de dos análogos de la talidomida en un modelo de daño hepático agudo inducido con tetracloruro de carbono en rata*, Tesis de licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México, pp.45-49.

Rouviere, H. (1979). *Anatomía humana descriptiva y topográfica: anatomía del tronco*. México, D. F.: Nacional, pp. 280-283.

Santillo, H. (2000). *Hierbas. La curación natural*. México, D.F.: Grupo Editorial Tomo, pp. 11, 12, 48, 64, 122, 123.

Schaffner, F.; Popper, H. (1987). Capítulo 145: Estructura del hígado en *Gastroenterología, Hígado* de Berk, J.E. (Cuarta ed., Vol. V). Barcelona, España: Salvat Editores, pp. 2886-2889.

Seifter, S.; Dayton, S.; Novic, B.; Montwyler, E. (1950). The estimation of glucogen with the anthrone reagent. *Arch Biochem*; **25**: 191.-200.

Stachlewitz, R. F.; Seabra, V.; Bradford, B.; Bradham, C. A.; Rusyn, I.; Germolec, D.; Thurman, R. G. (1999). Glycine and uridine prevent D-galactosamine hepatotoxicity in the rat: role of Kupffer cells. *Hepatology*; **29**: 737-745.

Stolz, A. (2004). Capítulo 63: Fisiología y función metabólica del hígado en *Enfermedades gastrointestinales y hepáticas. Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento* de Feldman, M.; Friedman, S. L.; Sleisenger, M. H. (Séptima ed., Vol. II). Buenos Aires, Argentina: Médica panamericana, pp. 1278 y 1279.

Suchy, F. J. (2004). Capítulo 52: Anatomía, histología, embriología, anomalías del desarrollo y afecciones pediátricas de las vías biliares en *Enfermedades gastrointestinales y hepáticas en Fisiología, diagnóstico y tratamiento* de Feldman, M.; Friedman, S. L.; Sleisenger, M. H. (Séptima ed., Vol. I). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana, pp. 1079-1081.

Tresguerres, J. Á.; Benítez de Lugo, E.; Cachofeiro, M. V.; Cardinali, D.P.; Gil-Loyzada, P.; Lahera-Juliá, V. y otros. (1999). *Fisiología humana* (Segunda edición). Madrid, España: Mc Graw Hill, pp. 769-770.

Villavicencio-Nieto, M. A.; Pérez-Escandón, B. E. (2005). *Guía de la flora útil de la Huasteca y la zona Otomí-Tepehua, Hidalgo I*. Pachuca, Hidalgo: UAEH, pp. 37, 46, 80, 93 y 118.

Villavicencio-Nieto, M. A.; Pérez-Escandón, B. E.; Ramírez-Aguirre, A. (2002). *Plantas útiles del estado de Hidalgo II* (Primera ed.). Pachuca, Hidalgo: UAEH, pp. 45.

Williams, R.; Maddrey, W. C. (1987). *Gastroenterología 4. Hígado*. (Orizaga-Samperio, J. Trad.) México, D.F.: Manual moderno, pp. 106.

Yim, S. H.; Kim, H. J.; Lee, I. S. (2003). A polyacetylene and flavonoids from *Cirsium rhinoceros*. *Arch Pharm Res*; **26**: 128-131.

Yoo, Y.M.; Nam, J.H.; Kim, M.Y.; Choi, J.; Park, H.J. (2008). Pectolinarin and pectolinarigenin of *Cirsium setidens* prevent the hepatic injury in rats caused by D-galactosamine via and antioxidant mechanism. *Biol Pharm Bull*; **31**: 760-764.

Zamora-Martínez, L. I.; Barquín-López, M. D. (1997). *Estudio de la relación planta-hombre en los municipios de Mineral del Monte y Mineral del Chico, estado de Hidalgo*. Pachuca de Soto, Hidalgo: Biblioteca Hidalguense. Gobierno del estado de Hidalgo, pp. 54, 55, 58, 59, 63, 64 y 70.