

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

Área Académica de Biología

Licenciatura en Biología

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

TESIS

Para obtener el título de:
Licenciada en Biología

Presenta:
Mariana Alvarado Baca

Director: Dr. Tomás Eduardo Fernández Martínez

Mineral de la Reforma, 2012.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
 INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
 Área Académica de Biología



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

P R E S E N T E

Por este conducto le comunico que el Jurado asignado a la pasante de Licenciatura en Biología **Mariana Alvarado Baca**, con número de cuenta 197574, quien presenta el trabajo recepcional de tesis intitulado **“Evaluación del efecto hepatoprotector del extracto hexánico de la inflorescencia de *Cirsium ehrenbergii* (Asteraceae), en un modelo de cirrosis experimental en rata”**, después de revisarlo en reunión de sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

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

PRESIDENTE: Quím. Blanca Estela Pérez Escandón

PRIMER VOCAL: M. en Mario Segura Almaraz

SEGUNDO VOCAL: Dr. Mario Isidoro Ortiz Ramírez

TERCER VOCAL: Dr. Tomás Eduardo Fernández Martínez

SECRETARIO: Dr. Miguel Ángel Villavicencio Nieto

PRIMER SUPLENTE: Dr. Héctor Antonio Ponce Monter

SEGUNDO SUPLENTE: M. en C. María del Carmen González Rodríguez

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

A T E N T A M E N T E
“AMOR, ORDEN Y PROGRESO”
 Mineral de la Reforma, Hidalgo a 23 de julio de 2012

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

c.c.p. Archivo



COORDINACIÓN ADJUNTA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA
 Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Ciudad del Conocimiento
 Col. Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México C.P. 42184
 Tel. +52 771 7172000 exts. 6600 y 6654 Fax: +52 771 7172112
M. en C. Miguel Angel Cabral Perdomo
 cabralma@uach.edu.mx mcabralperdomo@gmail.com



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

AGRADECIMIENTOS.

AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS.

Al Dr. Eduardo Fernández Martínez, por la confianza y el apoyo otorgado durante la realización de esta Tesis, por su comprensión en momentos difíciles y por las enseñanzas para la vida, por exigirme el máximo para no conformarme con el mínimo muchas gracias Doctor.

Al Doctor Héctor Antonio Ponce Monter, por haberme recibido en el laboratorio y por su confianza, gracias por sus enseñanzas y por las explicaciones que me dio gracias por permitirme ser también su alumna.

Al Doctor Luis Enrique Soria Jasso, le agradezco mucho su apoyo en el segundo sacrificio y por su aprecio muchas gracias.

A la Dra. Mineko Shibayama Salas, por su colaboración en el procesamiento de las muestras de histología en el Laboratorio de Patología Experimental, perteneciente al CINVESTAV en la ciudad de México.

A mis sinodales: Quím. Blanca E. Pérez Escandón, Dr. Miguel Ángel Villavicencio Nieto por ser mi sinodal y por su atribución al impartirme el curso de plantas medicinales, M en C. Mario Segura Almaraz, por su tiempo, paciencia y colaboración sobre todo en la histología de mi trabajo, muchas gracias, Dr. Mario Ortiz Ramírez, como ya había mencionado al Dr. Héctor Antonio Ponce Monter, M en C. María del Carmen González Rodríguez, a todos por su tiempo y aportaciones para la terminación de esta tesis muchas Gracias.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a Dios Todopoderoso y a su Hijo Jesucristo el haberme permitido llegar hasta aquí, por darme la vida, la salud y la ayuda para terminar mi carrera, por nunca soltar mi mano y por todas sus bendiciones “Gracias”.

Mil Gracias a mí a Familia, a mis Padres que me trajeron al mundo sobre todo a mi Madre Ma. Del Rosario Baca Ruiz que es todo para mí por estar siempre a mi lado y a mi Tía Paula Ruiz Rodríguez que es también mi Madre y también es mi vida y que sin su amor, apoyo, cariño y comprensión no sería nada de mi vida, por desvelarse conmigo y por mí, mil gracias por la oportunidad que me dieron de estudiar lo que decidí por todo empeño para que las tres lográramos esto juntas, las amo a las dos.

A mi Hermano César por ser siempre mi Súper Héroe y por sus aportaciones de toda índole para terminar mi carrera en especial su aportación afectiva y su apoyo moral aun estando lejos. Muchas Gracias.

Gracias Angélica por ser un ser y traer un Ángel a nuestras vidas me refiero a la Pequeña Paola las quiero muchísimo a las dos y gracias por todo el apoyo en todo el sentido y la extensión de la palabra y por su cariño y por estar siempre juntas aunque estemos separadas je je je.

Ahora a mis Amigas Per, Pau, Viri, Karo y Eli sin olvidar a Corazón de Pollo Fernando Barrios que fueron siempre una extensión de mi familia les agradezco que hayan soportado mis berrinches, mis maldades, mis ataques de ira, pánico y todo lo que les pudo causar alguna afectación je je je. Por todos los trabajos en equipo que hicimos desde 1er semestre y hasta el final, los quiero mucho mucho porque siempre estuvieron conmigo en las buenas, en las malas y en las peores por todos esos momentos de felicidad que me dieron y que me hicieron el honor de compartir con ustedes, siempre van a estar conmigo en un lugar súper especial en mi corazón. A toda la generación 2007-2011, en especial al Grupo 1, y a compañeros como Jorge Pratt, por todas las

veces que trabajamos en equipo je je creo que formamos un buen equipo y en general a todo el grupo.

A ti Pedro Gracias por todo, porque sin ti no hubiera escrito mi Tesis ¿Con que Libros? Je je je. En verdad gracias por ser una pieza fundamental en mi vida, lo sabes bien y a pesar de todo, repito todo lo que ha pasado, el haberte conocido es y será una de las mejores cosas que me han pasado, te quiero y te querré siempre.

Mi más sinceras y cariñosas Gracias a la Dra. y al Dr. Franco que me nos han apoyado a mi Madre a mi Tía y a mí porque a veces sin que nos una un parentesco los lazos que se crean con el trato y el tiempo son muy fuertes, gracias también a Varinka por honrarme con su aprecio. Mil gracias por todo.

Gracias a Ali Rodríguez por apoyarme en la última mitad de mi trabajo, por la oportunidad que me diste de conocerte, y por todo el tiempo que me apoyaste en el laboratorio, por tu dedicación, por las veces que deshice tus planes para ayudarme, por todo tu apoyo y cariño mil gracias.

Gracias a Lari Vega por ser una gran amiga y compañera de laboratorio siempre presta a ayudar y escuchar uno que otro consejo sabes que te quiero mucho y que Viri, tú y tu familia son magnificas personas a las que tuve la oportunidad de conocer. Gracias.

Gracias a todos mis maestros porque de cada uno me llevo más que una clase o una lección, una enseñanza para mi vida, gracias en especial a la Maestra Ma. Del Carmen González Rodríguez porque de alguna manera por ella realice esta Tesis y porque es para mí un ejemplo a seguir en muchos aspectos.

DEDICATORIAS.

A Dios y a su Hijo Jesús.

A mi Pequeña Gran Familia...

Muy en especial a mi Tío Francisco Vicente Ruiz Rodríguez, por decir siempre que era una niña inteligente. Mil Gracias. Siempre te querré y te llevare en mi memoria Tío. (1943-2011) D.E.P.



Con Sabiduría se edifica la casa, con prudencia se afirma y con ciencia se llenan las cámaras de todo bien preciado y agradable. Proverbios. 24, 3 y 4.SB.

Haz del Mañana un Buen Día.

"L" Lawliet.

ÍNDICE.

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Anatomía y fisiología hepática.....	2
1.2. Enfermedades hepáticas.....	10
1.3. Modelos experimentales de daño hepático.....	15
1.4. Marcadores de daño y funcionalidad hepáticos.....	17
1.5. Plantas medicinales y herbolaria tradicional.....	21
1.6. Especies de plantas utilizadas en enfermedades hepáticas.....	22
2. ANTECEDENTES.....	25
3. JUSTIFICACIÓN.....	30
4. HIPÓTESIS.....	31
5. OBJETIVOS.....	32
5.1. Objetivo general.....	32
5.2. Objetivos particulares.....	32
6. METODOLOGÍA.....	33
6.1. Colecta y preparación del extracto de <i>Cirsium ehrenbergii</i>	33
6.2. Administración a los grupos experimentales.....	34
6.3. Determinación de marcadores bioquímicos.....	35
6.3.1 Determinación de la actividad enzimática de FA.....	38
6.3.2. Determinación de la actividad enzimática de GGTP.....	38

6.3.3. Determinación de concentración de bilirrubinas totales.....	39
6.3.4. Determinación de actividad enzimática de ALT	39
6.3.5. Determinación de proteínas por el método de Bradford	39
6.3.6. Determinación del grado de peroxidación lipídica	40
6.3.7. Determinación de cantidad de glucógeno hepático	41
6.3.8. Determinación de hidroxiprolina	41
6.3.9. Determinación de citocinas en plasma	43
6.3.10. Histología.....	43
6.4. Pruebas estadísticas	45
7. RESULTADOS	46
8. DISCUSIÓN.....	58
9. CONCLUSIONES.....	68
10. GLOSARIO.....	69
REFERENCIAS	74

ÍNDICE DE FIGURAS.

Fig. 1. Ubicación anatómica del hígado humano.....	2
Fig. 2. Irrigación sanguínea del hígado humano	3
Fig. 3. Representación esquemática del lobulillo clásico.....	4
Fig. 4. (A) Lobulillo de Kiernan, (B) ácino hepático.....	5
Fig. 5. Esquema del hepatocito	6
Fig. 6. Tipos celulares del sinusoides hepático	7
Fig. 7. Sistema hepatobiliar	9
Fig. 8. <i>Cirsium ehrenbergii</i>	28
Fig. 9. Esquema de extracción con Soxhlet	34
Fig.10. Metodología Experimental	37
Fig.11. Actividad enzimática de FA	46
Fig.12. Actividad enzimática de GGTP.....	47
Fig. 13. Concentración de Bilirrubinas totales	48
Fig. 14. Actividad enzimática de ALT	49
Fig.15. Grado de peroxidación lipídica	50
Fig.16. Cantidad de glucógeno hepático	51
Fig.17. Cantidad de colágena hepática	52
Fig.18. Niveles plasmáticos de TNF- α	53
Fig.19. Niveles plasmáticos de IL-10.....	54
Fig. 20. Panel de resultados histológicos tinción Hematoxilina/Eosina	56

Fig.21. Panel de resultados histológicos tinción Tricrómica de Masson.....	57
Cuadro 1. Especies de plantas usadas para tratar enfermedades hepáticas.....	22
Cuadro 2. Grupos experimentales.....	35
Cuadro 3. Resultados de los marcadores bioquímicos	55

LISTADO DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS.

ALT	Alanina aminotransferasa
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
AST	Aspartato aminotransferasa
BT	Bilirrubinas totales.
°C	Grados Celsius
cm	Centímetro
EX	Extracto de <i>Cirsium ehrenbergii</i> (300mg/kg)
FA	Fosfatasa alcalina
Fig.	Figura
g	Gramo
GGTP	Gamma-glutamil traspeptidasa
HE	Hematoxilina /Eosina
hr	Hora
IL-10	Interleucina-10
IFN-γ	Interferon-γ
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
kg	Kilogramo
M	Molaridad
MDA	Malondialdehído
mg	Miligramo

mL	Mililitro
μL	Microlitro
mM	Milimolar
m	Metros
mm	Milímetros
N	Normalidad
n	Tamaño de muestra
NK	Natural killers o linfocitos NK
nm	Nanómetro
pH	Potencial de iones hidronio
PL	Peroxidación Lipídica
rpm	Revoluciones por minuto
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TC	Tetracloruro de carbono (CCl ₄)
TGF-β	Factor de crecimiento transformante- β
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-α
TM	Tricrómica de Masson
U	Unidades
VEX	Aceite de oliva
VTC	Aceite mineral

RESUMEN.

La cirrosis es un problema de salud muy importante ya que se encuentra entre las causas de muerte principales, no sólo en nuestro país sino también en el mundo. Existen varios factores que causan la cirrosis como las infecciones bacterianas, los virus, diversos agentes tóxicos como el consumo elevado de alcohol, la obstrucción de los conductos biliares, el cáncer hepático, entre otros. Dada la importancia de dicha enfermedad se buscan nuevas alternativas para su prevención, alivio y/o cura ya que son pocos los fármacos para su tratamiento y mejorar la calidad de vida de los pacientes con cirrosis, por lo que se ha recurrido al uso y la búsqueda de fitofármacos con actividad biológica. Una planta medicinal es el *Cirsium ehrenbergii* o cardo rojo que se usa en la medicina tradicional hidalguesa para el dolor de pecho, hemorragia vaginal y tos. En el trabajo presente se evaluó el efecto hepatoprotector del extracto hexánico de la inflorescencia *Cirsium ehrenbergii* (Asteraceae), en un modelo de cirrosis experimental inducida con tetracloruro de carbono (CCl₄, TC). Se utilizaron ratas Wistar macho, para formar 4 grupos experimentales: VEX+VTC, EX+VTC, VEX+TC, EX+TC, que fueron administrados de acuerdo a un esquema de tratamiento previamente establecido de TC con una dosis de 400 mg/kg y extracto (EX) de 300 mg/kg. Se realizaron las determinaciones de marcadores de daño a partir de muestras de plasma (fosfatasa alcalina, gamma-glutamil transpeptidasa, alanina aminotransferasa, bilirrubinas totales y las citocinas TNF- α e IL-10) y de tejido hepático (grado de peroxidación lipídica, cuantificación de proteínas, glucógeno así como un análisis histológico). Los resultados se analizaron estadísticamente, mostrando una reducción significativa del daño en la mayoría de los marcadores bioquímicos evaluados y, por lo tanto, un efecto hepatoprotector del extracto hexánico de la inflorescencia de *C. ehrenbergii* sobre la cirrosis. Dicha actividad protectora frente al daño hepático crónico inducido mostró tener efectos anticolestáticos, antinecróticos, antioxidantes, antifibrogénicos, al igual que lograron disminuir el grado de estrés oxidativo y mantener la funcionalidad hepática, lo cual se podría atribuir a los compuestos fenólicos con posible capacidad atrapadora de radicales libres presentes en el extracto hexánico de la inflorescencia del *C. ehrenbergii*.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Anatomía y fisiología hepática.

El esbozo hepático humano en el embrión comienza a los 18 días de gestación, a partir de un engrosamiento del endodermo, que pronto se subdivide para formar el esbozo de la vesícula biliar. La yema hepática pronto origina los esbozos de los lóbulos hepáticos derecho e izquierdo (Herrerías *et al.*, 1996)

El hígado es el órgano más voluminoso del cuerpo, representa el 2% del peso corporal total, pesa alrededor de 1.5 a 2 kg en el humano adulto (Guyton y Hall, 2007). Es un órgano flexible pero sólido de color pardorrojizo situado en su mayor parte en la mitad derecha del cuerpo como se aprecia en la Fig. 1 (Basmajian, 1977). Ocupa gran parte del hipocondrio derecho. El hígado está rodeado por una cápsula fibroelástica denominada Cápsula de Glisson. El ligamento falciforme, que se extiende desde la superficie peritoneal de la pared abdominal anterior entre el ombligo y el diafragma, divide al hígado en dos lóbulos, un lóbulo derecho grande y un lóbulo izquierdo pequeño (Porth, 2006).

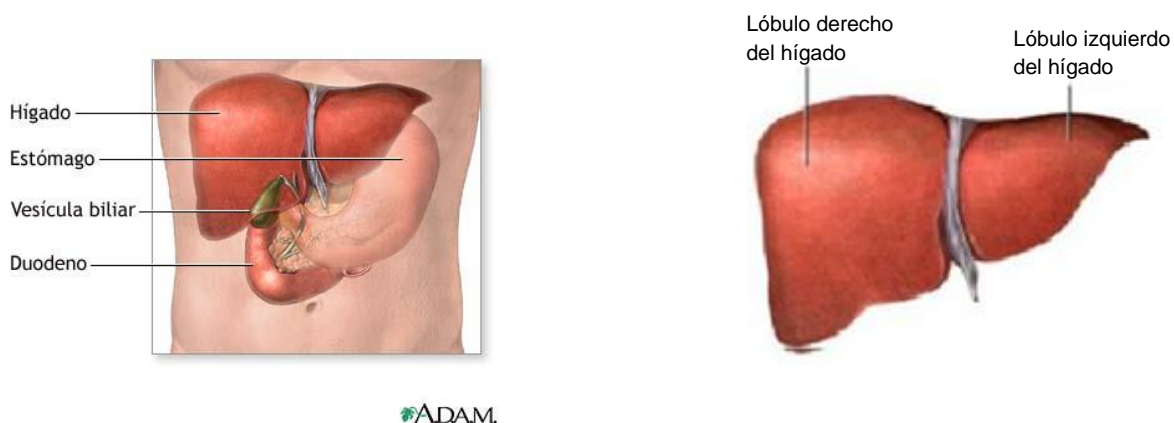


Fig. 1. Ubicación anatómica del hígado humano y detalle del lóbulo derecho o mayor y lóbulo izquierdo o menor en el hígado.

El hígado es el único órgano abdominal que tiene una doble irrigación sanguínea como se ve en la Fig. 2, la que proviene de la arteria hepática y la procedente de la vena porta. A través de la arteria hepática penetran en el hígado cerca de 300 mL de sangre por minuto; otros 1,050 mL/min penetran a través de la vena porta que transporta

sangre desde el estómago, el intestino delgado, el intestino grueso, el páncreas y el bazo. El flujo venoso que sale del hígado es transportado por las venas hepáticas que desembocan en la vena cava inferior (Porth, 2006).

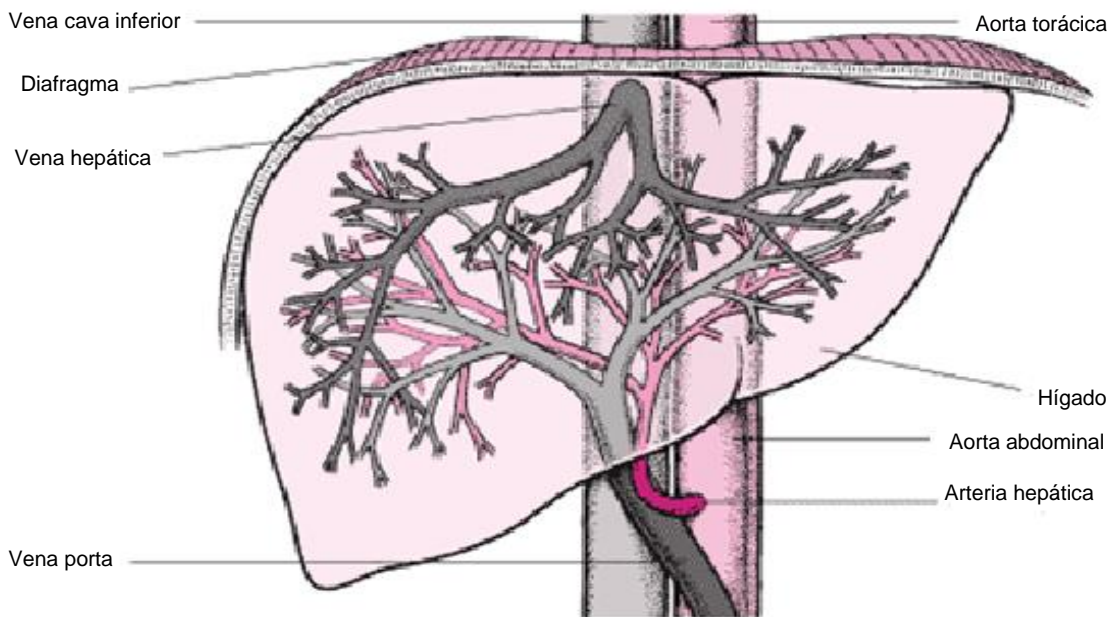


Fig. 2. Irrigación sanguínea del hígado humano.

En 1833, Kiernan describió la unidad estructural del hígado con base en la observación histológica, esta unidad es el lobulillo de Kiernan, llamado también lobulillo hepático clásico, una estructura cilíndrica hexagonal. Cada ángulo corresponde a un espacio porta y en la porción central se encuentra la vena centrolobulillar, delimitada por tejido conectivo y placas de hepatocitos dispuestos en cordones de forma radiada a manera de rayos de una rueda representado en la Fig. 3 (Méndez-Sánchez y Uribe, 2003).

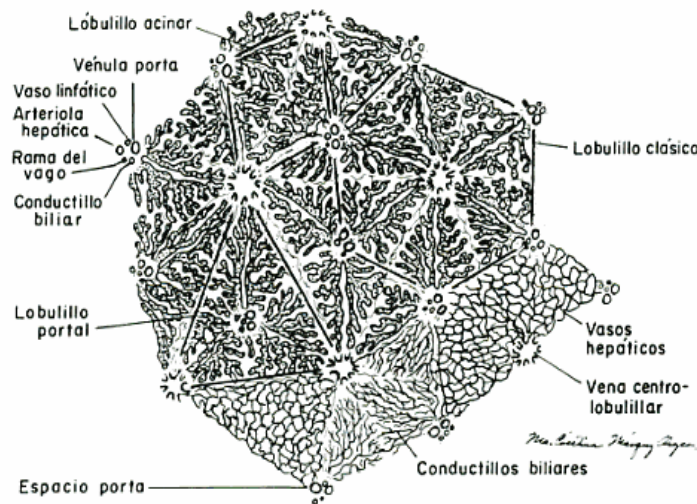


Fig. 3. Representación esquemática del lobulillo clásico y venas centrolobulillares, los componentes de los espacios porta.

En los últimos años se describieron otras unidades hepáticas como el ácino de Rappaport, que está constituido por pequeños segmentos de los lobulillos clásicos delimitados y dos venas hepáticas terminales (venas centrales del lobulillo clásico). Su forma es oval o romboidal. En el ácino las células se colocan concéntricamente alrededor de su eje conectivo de forma que las más próximas a éste recibirán la sangre con mayor concentración de oxígeno y de sustancias nutritivas (zona I) y, por el contrario, las más lejanas (las próximas a las venas terminales) (zona III) reciben sangre de menor calidad, entre estas dos zonas se encuentra una zona cuya sangre es de calidad intermedia (zona II). Esta forma de concebir el hígado y las diferencias en el gradiente de actividad metabólica en relación con la irrigación, ayudan a explicar procesos como el desarrollo de cirrosis y a esclarecer diferentes aspectos histológicos de la distribución de las bilis en diversas afecciones hepáticas (Herrerías *et al.*, 1996). Actualmente se han definido otras unidades funcionales, pero las más comunes son el lobulillo de Kiernan y el ácino de Rappaport; las cuales son utilizadas para describir alteraciones histológicas en el hígado; ambas unidades se muestran en la Fig. 4.

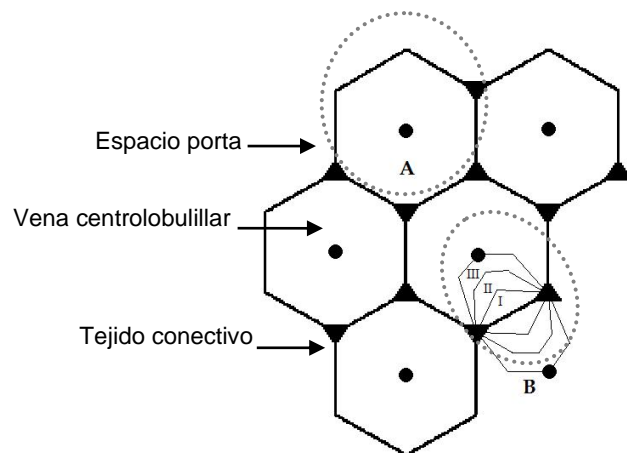


Fig. 4. (A) Lobulillo de Kiernan, (B) acino hepático.

Los hepatocitos representan alrededor del 80% de las células del hígado, tienen núcleos grandes y de localización central, el citoplasma presenta aspecto muy variable como consecuencia de las diferentes situaciones funcionales principalmente en el almacenamiento del glucógeno y grasas. Las mitocondrias son pequeñas pero numerosas, el aparato de Golgi puede estar cerca del núcleo o en la periferia. Los hepatocitos son células parenquimatosas de forma poligonal, con una membrana celular clara que se divide en tres compartimentos bien definidos; una superficie sinusoidal de absorción que tiene función secretora, una superficie canalicular también de función secretora y una zona adherente o superficie intercelular. Están dispuestos en una serie de láminas perforadas que se anastomosan o se ramifican, mismas que forman una especie de laberinto entre la que se encuentran los espacios sinusoidales. Pocas veces se encuentran mitosis en hepatocitos adultos pero en el periodo de regeneración después de lesión existen numerosas formas mitóticas, ver Fig.5. (Kuntz y Kuntz, 2006; Geneser, 2008).

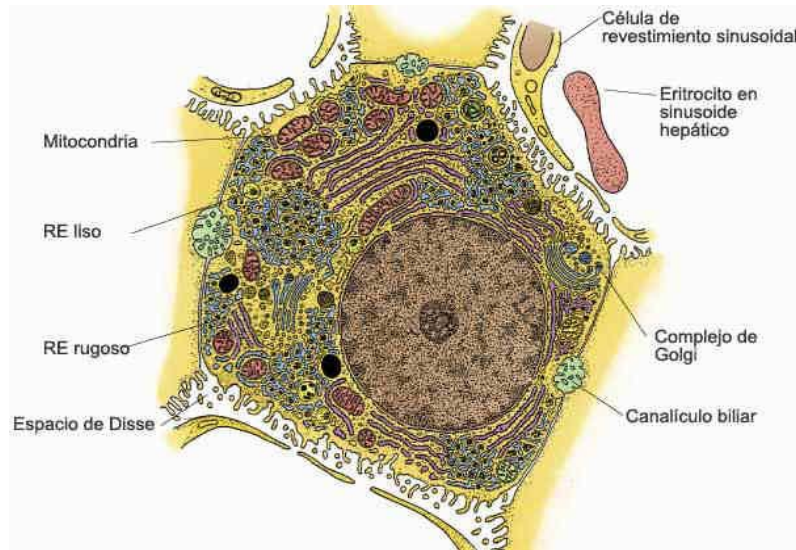


Fig.5. Esquema del hepatocito.

Los sinusoides venosos hepáticos están revestidos por dos tipos de células: las células endoteliales y las células de Kupffer (Geneser, 2008).

Existen varios tipos celulares importantes del sinusoides hepático, a continuación se describen a cada uno de estos tipos celulares y se representan esquemáticamente en la Fig.6.

Las células endoteliales, son planas, nucleadas y se encuentran formando un revestimiento continuo de los sinusoides, estas células desempeñan funciones de limpieza y regulación de diversos fluidos entre la sangre de los sinusoides y los hepatocitos. Además, son de gran importancia para el equilibrio de los lípidos, el colesterol y la vitamina A; las células endoteliales también forman y secretan citocinas como el TNF- α y diversos componentes de matriz extracelular como colágena y fibronectina (Kuntz y Kuntz, 2006).

Las células de Kupffer, son células nucleadas que tienen fagocitosis activa y son capaces de eliminar células sanguíneas viejas y defectuosas, bacterias y otras sustancias ajenas al cuerpo (Porth, 2006; Geneser, 2008). También descargan sustancias de señalización como las citocinas. La fagocitosis y la eliminación que llevan

a cabo las células de Kupffer se ve reducida por el consumo del alcohol y algunas drogas alucinógenas (Kuntz y Kuntz, 2006).

Las células de Ito, también llamadas células cebadas, igualmente conocidas como células estelares o lipocitos se encuentran en el espacio de Disse y contienen numerosas gotas de grasa y vitamina A (retinol), en su citoplasma sintetizan y secretan colágena de tipo I y III, por lo que desempeñan un importante papel en la fibrogénesis en presencia de daño con CCl_4 y etanol; se encargan de producir matriz extracelular, del control del tono vascular, llevan a cabo la cicatrización y regeneración como un proceso normal y también ante un proceso patológico (Kuntz y Kuntz, 2006).

Las células de Pit o linfocitos NK son linfocitos granulados, su ubicación en el hígado se encuentra en el sinusoides en el espacio de Disse; se denominan NK por ser Natural Killers o células asesinas naturales ya que se encargan de destruir las células tumorales y necrosadas para protección del órgano (Kuntz y Kuntz, 2006).

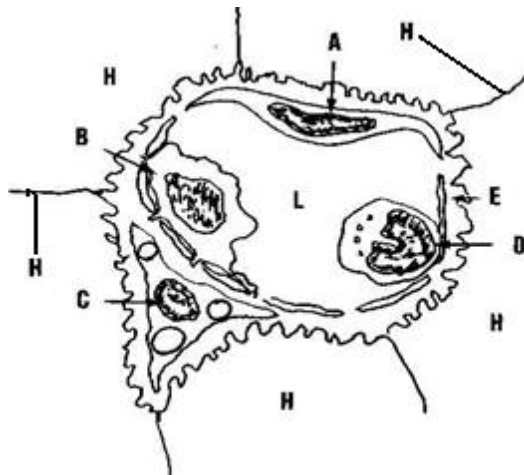


Fig. 6. Tipos celulares del sinusoides hepático. A) célula endotelial, B) célula de Kupffer, C) célula de Ito, D) célula de Pit, H) hepatocito, E) espacio de Disse, L) luz del sinusoides.

El denominado sistema hepatobiliar ilustrado en la Fig. 7 consiste en la vesícula biliar, los conductos hepáticos izquierdo y derecho (que se unen para formar el conducto hepaticocístico), el conducto cístico (que se extiende hasta la vesícula biliar) y el colédoco (formado por la unión del conducto hepaticocístico y el cístico). El colédoco

desciende por detrás de la primera porción del duodeno hasta unirse con el conducto pancreático principal (Porth, 2006).

La vesícula biliar es un saco muscular destensible con forma de pera ubicado sobre la superficie ventral del hígado. Su función es almacenar y concentrar la bilis. El estímulo principal para la contracción de la vesícula biliar es hormonal. En condiciones normales la vesícula biliar regula la presión del colédoco, es decir, cuando se halla relajada recibe y almacena bilis y la presión en el colédoco disminuye. Dos trastornos frecuentes del sistema biliar son la colelitiasis (cálculos biliares), la inflamación de vesícula biliar (colecistitis) o del colédoco (colangitis) (Porth, 2006). Los hepatocitos secretan continuamente bilis pero la mayor parte de ésta se almacena en la vesícula biliar hasta que el duodeno la necesita. (Guyton y Hall, 2007).

La bilis sirve como medio para la excreción de varios productos de desecho procedentes de la sangre como los ácidos biliares, las bilirrubinas y el colesterol. El hígado secreta bilis en dos fases: la primera la realiza el hepatocito que transporta bilis a los diminutos canalículos biliares situados entre los hepatocitos y la segunda fase consiste en el transporte biliar por los canalículos hacia los tabiques interlobulillares terminales, estos se unen a conductos progresivamente mayores hasta que acaban en el conducto hepático y el colédoco, desde este último la bilis se vierte directamente al duodeno. La bilis está compuesta en su mayoría de agua, sales biliares, bilirrubina, colesterol, ácidos grasos, lecitina y los principales electrolitos como Na^+ , K^+ , Ca^+ , Cl^- , HCO_3^- (Barret *et al.*, 2010).

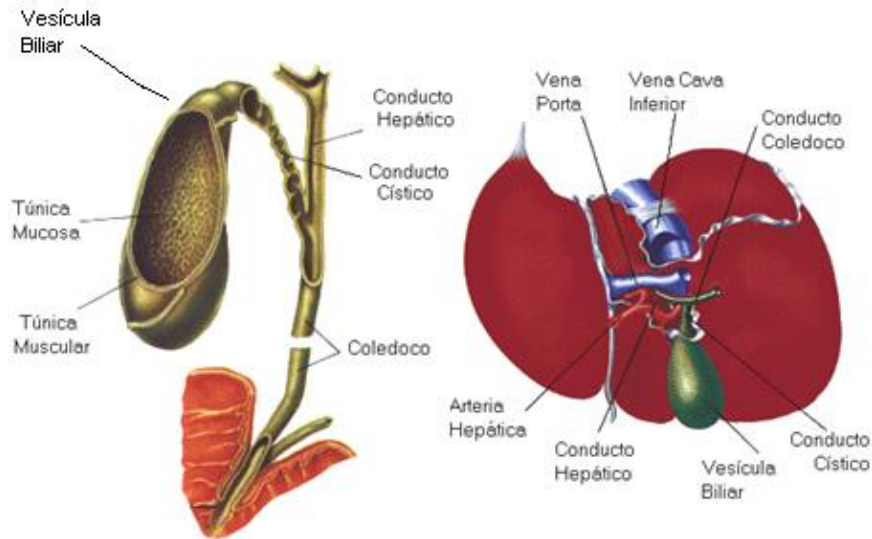


Fig. 7. Sistema hepatobiliar, conductos biliares y vesícula biliar.

Fisiología Hepática.

El hígado es una glándula mixta exocrina y endocrina, la función exocrina del hígado comprende a la producción de bilis, mientras que la función endocrina consiste en la regulación de los niveles de glucosa en la sangre, y en la síntesis de gran variedad de productos como la albumina, fibrinógeno, la mayor parte de las proteínas como los factores de la coagulación, lipoproteínas plasmáticas, etc. (Herrerias *et al*, 1996).

El hígado cumple muchas funciones, pero tiene también entidad propia. Muchas de sus funciones guardan relación entre sí, algunas de las funciones que el hígado desempeña son: la filtración y almacenamiento de la sangre, el metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas, grasas, hormonas y compuestos químicos extraños, la formación de bilis, el depósito de vitaminas y de hierro y la síntesis de los factores de la coagulación (Guyton y Hall, 2007).

El hígado es un órgano expandible y sus vasos pueden almacenar grandes cantidades de sangre. El volumen normal de sangre, es de 450 mL, es decir, casi un 10% del volumen sanguíneo total del organismo. Si la presión en la aurícula derecha aumenta y se transmite al hígado, éste se expande y aloja de 0.5 a 1 L más de sangre, esto

sucede en la insuficiencia cardiaca, por consiguiente el hígado es en efecto un órgano venoso grande y expansible que puede actuar como un depósito de sangre muy valioso (Porth, 2006; Guyton y Hall, 2007). El hígado almacena el exceso de glucosa como glucógeno y lo libera en la circulación cuando disminuyen los niveles de glucosa en sangre. El hígado también sintetiza glucosa a partir de aminoácidos, glicerol y ácido láctico como forma de mantener un nivel de glucosa en sangre en periodos de ayuno o en caso de aumento de los requerimientos. Además, el hígado convierte el exceso de hidratos de carbono en triglicéridos que son almacenados en el tejido adiposo. El hígado también realiza la conversión de la galactosa y la fructosa en glucosa (Guyton y Hall, 2007). El organismo no puede prescindir de la contribución del hígado al metabolismo de las proteínas, ya que el hígado sintetiza y libera proteínas en la circulación. Una proteína importante es la albúmina, la cual constituye en forma notoria la presión osmótica coloidal del plasma y a la unión y transporte de numerosas sustancias como hormonas, fármacos, ácidos grasos, bilirrubina y otros aniones. El hígado también produce otras proteínas importantes como el fibrinógeno y los factores de la coagulación de la sangre (Porth, 2006).

1.2. Enfermedades hepáticas.

El hígado es el órgano metabolizador de los fármacos y el destoxicador más importante del organismo y está expuesto a ser dañado por una enorme cantidad de fármacos y sustancias químicas ambientales. Muchos fármacos de uso amplio, como algunos productos naturales de venta libre que pueden producir daño hepático (Porth, 2006). Cuando existen alteraciones en algunas de las funciones del hígado se presentan manifestaciones de respuesta. Los trastornos inflamatorios del hígado dominan la práctica clínica de la hepatología. (Robbins *et al.*, 1995).

El término hepatitis se refiere a las infecciones hepáticas producidas por un grupo de virus que tienen afinidad por el hígado causándole inflamación como los virus de la hepatitis A (HAV), la hepatitis B (HBV), y la hepatitis E (HEV). La hepatitis puede ser causada por enfermedades autoinmunitarias o por reacciones a medicamentos, por toxinas, por enfermedades infecciosas como el paludismo, mononucleosis, salmonelosis y amibiasis (Pérez-Tamayo y López-Corella, 2007).

La colestasis es una disminución del flujo biliar a través de los canalículos intrahepáticos y una reducción de la secreción de agua, bilirrubina y ácidos biliares en los hepatocitos (Robbins *et al.*, 1995). Las causas de la colestasis pueden ser extrahepáticas, intrahepáticas o ambas. La colestasis extrahepática puede deberse a la obstrucción de los conductos biliares por cálculos, por algún proceso inflamatorio, como la colangitis. Las causas de colestasis intrahepática son los trastornos inflamatorios como sepsis, cirrosis biliar primaria (CBP), enfermedades infiltrativas como el linfoma de Hodgkin, toxicidad por fármacos, hepatitis; síndromes colestásicos genéticos, como la colestasis intrahepática benigna recurrente (Méndez-Sánchez y Uribe, 2003).

La ictericia es la acumulación anormal de bilirrubina en la sangre que provoca una coloración amarillenta de la piel y los tejidos profundos, se torna evidente cuando los niveles de bilirrubina en suero superan los 2 a 2.5 mg/dL (Porth, 2006).

La fibrosis es el aumento de la cantidad de colágena en el hígado, este trastorno constituye una de las características distintivas de diversos padecimientos hepáticos crónicos como la hepatitis crónica y la cirrosis (Méndez-Sánchez y Uribe, 2003). La fibrosis es el resultado del daño continuo del hígado, como la hepatitis viral, el abuso de alcohol, fármacos, enfermedades metabólicas que implican una sobrecarga de hierro o de cobre. La fibrosis se asocia con alteraciones importantes en la cantidad y la composición de la matriz extracelular, así como colágena de tipo I y III. La etapa final de la fibrosis es la cirrosis la cual se caracteriza por aumento de la deposición y la composición alterada de la matriz extracelular y la aparición de nódulos o tejido cicatrizal, acompañado por una insuficiencia hepática e hipertensión portal (Limuro y Brenner, 2008). La activación de las células estelares es muy importante en el desarrollo de la fibrosis hepática en comparación con el hígado normal. La activación de las células de Kupffer lleva a la secreción de múltiples citocinas, estas citocinas también pueden ser secretadas por las células endoteliales y las células inflamatorias que entran al hígado. Las células estelares activadas por citocinas pierden sus vesículas lipídicas y adquieren un estado miofibroblástico, la proliferación de células estelares es estimulada por el factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés). El depósito de la matriz extracelular (fibrogénesis) es estimulado especialmente por el factor de

crecimiento transformante β (TGF β , por sus siglas en inglés), el cual promueve la quimiotaxis de las células estelares activadas a las áreas de lesión, donde están los hepatocitos apoptóticos. Las células de Kupffer también constituyen una fuente de liberación de TNF en la circulación sistémica (Pérez-Tamayo y López-Corella, 2007).

La cirrosis representa el estadio final de una hepatopatía crónica en la cual gran parte del tejido hepático funcional ha sido reemplazado por tejido fibroso. Se caracteriza por la conversión de la arquitectura hepática normal en nódulos de estructura anormal. El tejido fibroso forma bandas constrictoras que interrumpen el flujo en los canales vasculares y las vías biliares hepáticas lo que predispone a la hipertensión portal y a su vez lleva a la insuficiencia hepática. Si bien la cirrosis se asocia con el alcoholismo, también puede desarrollarse en el curso de otros trastornos, como la hepatitis viral, reacciones tóxicas a fármacos y sustancias químicas y obstrucción biliar. Además, la cirrosis acompaña a otras enfermedades metabólicas que producen el depósito de minerales en el hígado, como la hemocromatosis (depósito de hierro) y la enfermedad de Wilson (depósito de cobre). Por lo general los signos y síntomas aparecen cuando la enfermedad ya está muy avanzada y estos son; la pérdida de peso, debilidad, anorexia, desnutrición, ascitis, hepatomegalia, ictericia y un fuerte dolor abdominal, por estiramiento de la cápsula de Glisson. Las manifestaciones tardías de la cirrosis se relacionan con la hipertensión portal, ascitis y derivaciones portosistémicas como varices esofágicas sangrantes (Porth, 2006).

La hipertensión portal causada por cirrosis se caracteriza por un aumento de la resistencia al flujo en el sistema venoso portal y una presión venosa portal sostenida por encima de los 12 mm de Hg cuando lo normal es de 5 a 10 mm de Hg, en el hígado (Pérez-Tamayo y López-Corella, 2007).

La ascitis se produce cuando aumenta la cantidad de líquido (15 L o más) en la cavidad peritoneal y es una manifestación tardía de cirrosis e hipertensión portal. Las personas con ascitis presentan dificultad para caminar o para manejarse independientemente. El tratamiento de la ascitis se centra en la restricción de la ingesta de sodio y agua en la dieta y en la administración de diuréticos. (Porth, 2006).

La cirrosis biliar primaria implica inflamación y cicatrización de los pequeños conductos biliares intrahepáticos, inflamación portal y cicatrización progresiva del tejido hepático. Esta afección se caracteriza por un comienzo insidioso, y destrucción progresiva del tejido hepático. El hígado se agranda y adquiere un matiz verdoso por acumulación de bilis. En la cirrosis biliar primaria existe una elevación de los niveles de fosfatasa alcalina en suero (Porth, 2006).

La colangitis es la inflamación de las vías biliares hepáticas. Es una enfermedad colestásica crónica de origen desconocido que produce destrucción y fibrosis de los conductos biliares intrahepáticos y extrahepáticos (Porth, 2006).

La cirrosis biliar secundaria se debe a una obstrucción prolongada del árbol biliar extrahepático. Algunas de sus causas son las neoplasias malignas del árbol biliar o de la cabeza del páncreas y las estrecheces del colédoco causadas por cirugías previas; los procedimientos quirúrgicos ayudan a aliviar la obstrucción y pueden mejorar la cirrosis biliar extrahepática (Pérez-Tamayo y López-Corella, 2007).

La única clasificación satisfactoria de cirrosis se basa en la etiología supuesta subyacente. Muchas formas de cirrosis (particularmente la cirrosis alcohólica) presenta micronódulos en sus etapas iniciales, mismos que tienen la tendencia a aumentar de tamaño con el tiempo aun en contra de las limitaciones que impone la fibrosis. La etiología de la cirrosis varía tanto geográfica como socialmente (Porth, 2006).

El hígado graso se caracteriza por la acumulación de grasa en los hepatocitos, en un trastorno conocido como esteatosis. El hígado adquiere un color amarillo y aumenta de tamaño debido a la acumulación excesiva de grasa. La patogenia del hígado graso no está del todo clara y es posible que dependa de la cantidad de alcohol consumida, del contenido de grasa de la dieta, de los depósitos corporales de grasa, de factores hormonales entre otros (Pérez-Tamayo y López-Corella, 2007).

La hepatopatía alcohólica presenta un espectro que incluye hígado graso, hepatitis alcohólica y cirrosis. La mayor parte de las muertes por cirrosis alcohólica se atribuyen a insuficiencia hepática, varices esofágicas sangrantes e insuficiencia renal. Se estima que del 10 al 15% de los alcohólicos crónicos desarrollan cirrosis, lo que sugiere que

hay otras causas como factores genéticos y ambientales que contribuyen a la aparición de esta enfermedad. El alcohol se absorbe con facilidad en el tracto gastrointestinal y es una de las pocas sustancias que se pueden absorber en el estómago. Entre el 80 y el 90% del alcohol que ingiere una persona se metaboliza en el hígado, el resto se excreta a través de los pulmones, los riñones y la piel. El metabolismo del alcohol se produce por tres vías simultáneas; el sistema del alcohol deshidrogenasa (ADH), ubicado en el citoplasma de los hepatocitos, el sistema de oxidación del etanol microsómico (MEOS), ubicado en el retículo endoplasmático y la vía de la catalasa, ubicada en los peroxisomas. Las vías de la ADH y del MEOS producen trastornos metabólicos y tóxicos específicos y las tres vías generan acetaldehído, un metabolito muy tóxico. El acetaldehído y los radicales libres causan una variedad de trastornos metabólicos que pueden provocar daño hepático. El acetaldehído tiene efectos tóxicos múltiples sobre las células hepáticas y la función del hígado; el sexo es un factor importante en el metabolismo del alcohol y en la producción de metabolitos tóxicos, ya que la testosterona deprime el sistema ADH, por eso las mujeres tienden a producir mayores cantidades de acetaldehído y son más propensas a sufrir daño hepático por alcohol que los hombres. La edad también influye pues conforme avanza se pierden, la capacidad hepática de metabolizar alcohol y la resistencia a los efectos hepatotóxicos. El metabolismo del alcohol requiere un cofactor, el dinucleótido de la nicotinamida y la adenina (NAD), que es necesario para muchos otros procesos metabólicos, entre ellos el metabolismo de los piruvatos, los uratos y los ácidos grasos. El alcohol compite por el uso preferencial de NAD y tiende a alterar otras funciones metabólicas del hígado. La ingestión excesiva de alcohol puede producir una hipoglucemia por depleción de los depósitos de glucógeno hepático, lo que puede tornarse un problema para el alcohólico que vomita y no come durante varios días. Si bien el mecanismo por el que el alcohol ejerce sus efectos tóxicos sobre las estructuras hepáticas es incierto, los cambios que se producen se puede dividir en tres estadios: degeneración grasa, hepatitis alcohólica y cirrosis (Porth, 2006).

La hepatitis alcohólica es la situación intermedia entre la degeneración grasa y la cirrosis, suele observarse luego de un aumento abrupto del consumo de alcohol y es frecuente en bebedores “de juerga”. La hepatitis alcohólica se caracteriza por

inflamación y necrosis de los hepatocitos. Esta afección es grave y puede ser fatal, en algunos casos, la enfermedad progresa con rapidez a insuficiencia hepática e incluso la muerte (Robbins *et al.*, 1995; Porth, 2006).

La cirrosis alcohólica es el resultado final de episodios repetidos de daño hepático relacionado con la bebida y marca el comienzo de una hepatopatía alcohólica terminal. En sus primeras etapas se observan nódulos uniformes sobre la superficie del hígado. En su etapa más avanzada los nódulos se agrandan y adquieren formas y tamaños más irregulares debido a los procesos regenerativos. Los nódulos pueden comprimir las venas hepáticas, lo que reduce el flujo de sangre hacia a fuera del hígado prosuciendo hipertensión portal, desviaciones portosistémicas extrahepáticas y colestasis (Porth, 2006).

1.3. Modelos experimentales de daño hepático.

Para el estudio de la fisiopatología hepática, se han utilizado diversos tipos de modelos experimentales en animales usando agentes hepatotóxicos químicos como el etanol en dosis de 200 mg/kg durante seis semanas (Park *et al.*, 2004). El p-acetaminofén o paracetamol puro también es un agente inductor de daño hepático, en una concentración de 200 mg/mL (Ochoa *et al.*, 2008). La tacrina en una dosis de 7.5 mg/kg y concanavalina- A también son agentes inductores de lesiones hepáticas así como la D-galactosamina en una dosis de 400 mg/kg actuando con un efecto hepatotóxico tanto *in vivo* como *in vitro* simulando una hepatitis viral (Ku *et al.*, 2008; Yoo *et al.*, 2008).

El tetracloruro de carbono CCl₄ (TC) ha sido conocido como un agente hepatotóxico potente, cuyo mecanismo principal es la peroxidación lipídica por radicales libres derivados del CCl₄, y se utiliza ampliamente en modelos animales para la investigación, sobre todo de daño hepático (Lee *et al.*, 2008). El CCl₄ es un agente que produce diferentes tipos de lesiones hepáticas, se ha utilizado en cientos de pruebas experimentales para explorar diferentes aspectos de la hepatopatía usando diferentes animales y vías de administración (Muriel, 1997). La mayoría de la literatura que reporta modelos de daño hepático agudo utiliza la vía de administración oral del CCl₄ con dosis

más altas, donde se desea un efecto rápido y se obliga al efecto del primer paso, es decir, a la absorción directa del tracto gastrointestinal hacia el hígado donde, como se explicará, el TC debe ser metabolizado para ejercer su efecto hepatotóxico; mientras que en los modelos de daño hepático crónico la vía de administración utilizada es la intraperitoneal en donde la dosis administrada es diez veces menor pero constante, ya que se administra 3 veces a la semana y donde el efecto del primer paso será sostenido y crónico (Álvarez-Amezcu, 1994).

El metabolismo del CCl_4 involucra una ruptura hemolítica del enlace C-Cl, que produce radicales libres en el retículo endoplasmático hepático a través de un sistema de transportadores de electrones. El radical triclorometilo $\cdot\text{CCl}_3$ junto con un radical libre puede enlazarse covalentemente a una serie de estructuras, particularmente a los lípidos, que son atacados en sus ácidos grasos y comenzar un proceso de peroxidación lipídica (Muriel, 1997). En los animales con cirrosis inducida con CCl_4 se presentan diversas manifestaciones en forma semejante a la cirrosis humana, mostrando un aumento en la actividad de la adenilato ciclasa, incrementando los niveles de monofosfato cíclico de adenosina o AMPc y se presenta una alteración generalizada de los tipos celulares y diversas enzimas hepáticas. La administración del CCl_4 tiene un efecto en el hígado, el cual conduce a una liberación masiva de catecolaminas que se traduce en una reducción del flujo sanguíneo hepático y en un incremento en la movilización de ácidos grasos, lo que ocasiona el hígado graso (Álvarez-Amezcu, 1994). La administración crónica de este agente desencadena una secuencia de acontecimientos de necrosis, por la liberación de $\cdot\text{CCl}_3$ que es altamente reactivo. Los hepatocitos intoxicados tienen una síntesis de proteínas deficiente, acumulan lípidos por infiltración y declina la actividad enzimática microsomal, así como el citocromo P450 (Muriel, 1997).

El sistema del citocromo P450 es una superfamilia universal de monooxigenasas que está presente en plantas y animales. El sistema del citocromo P450 es importante para la destoxicación de sustancias extrañas (compuestos xenobioticos), mediante un metabolismo oxidativo. Una de las funciones más relevantes del sistema del citocromo P450 en los seres humanos es su papel en el metabolismo de los fármacos. Fármacos como la cafeína y el ibuprofeno se metabolizan por oxidación gracias a estas

monoxigenasas. De hecho, la duración del efecto de muchos medicamentos depende de su velocidad de inactivación por el sistema P450. A pesar de su papel protector general en la eliminación de sustancias químicas extrañas, la acción del sistema P450 no siempre resulta beneficiosa. Algunos de los más poderosos cancerígenos se generan *in vivo* a partir de compuestos inocuos, por el sistema P450 en un proceso de activación metabólica (Stryer *et al.*, 2004). 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 ligadura de conducto 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 (Muriel, 2003). La ligadura del conducto biliar común en rata es una herramienta muy utilizada para comprender lo sucedido en la colestasis humana y es un buen modelo para la evaluación de fármacos benéficos para el hígado. En la rata, a los 28 días de haberse practicado la ligadura del conducto biliar común, se establece una cirrosis biliar secundaria semejante a la cirrosis humana donde se puede estudiar el desarrollo de esta enfermedad y su tratamiento farmacológico (Kountouras *et al.*, 1984; Muriel, 1997).

1.4. Marcadores de daño y funcionalidad hepáticos.

Los estudios diagnósticos ayudan a evaluar la magnitud de daño hepático y su funcionalidad. Para determinar la función hepática y confirmar el diagnóstico de hepatopatía se utilizan pruebas de laboratorio, éstas incluyen la determinación de los niveles de enzimas hepáticas en suero para evaluar el daño de las células hepáticas, la capacidad del hígado de sintetizar proteínas y sus funciones excretoras. Una elevación de las enzimas en suero indica daño hepático (Porth, 2006). Algunos marcadores o indicadores bioquímicos importantes así como las enzimas clave están descritos a continuación:

Alanina aminotransferasa (ALT), Las aminotransferasas catalizan la transferencia de un grupo α -amino desde un α -aminoácido a un α -cetoácido, son también llamadas transaminasas. Un aumento considerable de ALT se observa en casos de daño hepatocelular agudo, como en la hepatitis viral aguda, el daño tóxico (por hepatotóxicos como el CCl_4) y síndrome de Reye (Stryer *et al.*, 2004; Porth, 2006). 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).

Fosfatasa alcalina (FA). Isoenzima presente en suero que hidroliza mono-ésteres de fosfatos, la FA tiene su actividad con un pH óptimo alcalino, esta enzima se encuentra principalmente en hígado, hueso, riñón, intestino y placenta (Bhagavan, 1974). Es un indicador de colestasis ya que permite medir la función excretora del hígado. Se encuentra presente en las membranas entre las células hepáticas y el conducto biliar y se libera en presencia de enfermedades que lo afectan (Porth, 2006). 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).

Gamma-glutamil transpeptidasa (GGTP). Existen varios mecanismos para el transporte de aminoácidos, uno de ellos es el ciclo gamma-glutamil que es un ejemplo de ciclo de transporte (Bhagavan, 1974; Devlin, 2002). La GGTP cataliza la transferencia del grupo glutamil de péptidos a aminoácidos, está localizada en la membrana celular; es un indicador muy sensible de colestasis y de enfermedades hepatobiliares. El valor de la GGTP puede ser útil en el diagnóstico de la hepatopatía alcohólica (Porth, 2006). 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).

La bilirrubina es un pigmento derivado del metabolismo de la hemoglobina y de glóbulos rojos senescentes destruidos por las células fagocíticas del bazo, hígado y médula ósea. La oxidación del grupo hemo por la hem-oxigenasa produce biliverdina y la reducción de ésta por la biliverdina-reductasa origina la bilirrubina (Devlin, 2002). Las

bilirrubinas se dividen en dos tipos: bilirrubinas libres o no conjugadas, que son liposolubles y tóxicas, y bilirrubinas conjugadas, que no son tóxicas y son hidrosolubles lo que facilita su eliminación por la bilis (Bhagavan, 1974). El proceso de eliminación de las bilirrubinas ocurre en el hígado y si se altera disminuye su excreción y se origina regurgitación de la bilirrubina conjugada del hígado al torrente sanguíneo. 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). La determinación de los niveles de bilirrubina sérica, la gamma-glutamil traspeptidasa (GGTP) y la fosfatasa alcalina (FA), son los indicadores de colestasis por excelencia ya que permiten medir la función excretora del hígado (Porth, 2006).

Las proteínas reflejan la capacidad de síntesis del hígado, ya que lleva a cabo la síntesis de proteínas como la albúmina y factores de la coagulación como el factor V y factores dependientes de la vitamina K como los factores II, VII, IX y X. (Porth, 2006). Las proteínas son determinadas con el fin de calcular el grado de peroxidación lipídica.

La 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 CCl_4 o de otros agentes de daño hepático 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, por lo que es un parámetro que indica el daño en el hepatocito por estrés oxidativo (Kuntz y Kuntz, 2006). 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).

El glucógeno es una forma de almacenamiento de glucosa, es una reserva importante de combustible presente en hígado y músculo, las funciones del glucógeno son mantener los niveles de glucosa en sangre, es muy importante debido a que la glucosa es prácticamente el único combustible utilizado para suministrar glucosa al cerebro y en la actividad muscular (Stryer *et al.*, 2004). En las patologías hepáticas la cantidad de glucógeno presenta un decremento como consecuencia de cambios metabólicos, por

esta razón la medición de los niveles de glucógeno es un buen indicador de la funcionalidad y el estrés hepáticos (Bhagavan, 1974). 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).

La colágena es una clase heterogénea de proteínas con estructura y composición de aminoácidos particulares, existen distintos tipos de colágena, los más importantes son: el tipo I y III, y están viculadas con las células de Ito. En condiciones de fibrosis avanzada el contenido de colágena aumenta de 3 a 10 veces (Méndez- Sánchez y Uribe, 2003).

Las citocinas son proteínas solubles del sistema inmunitario semejantes a las hormonas que son producidas por una gran variedad de células dado un estímulo por un agente inductor. En el hígado se producen en células endoteliales, células estelares y en hepatocitos. Las citocinas se pueden clasificar por su estructura y función en interleucinas, factores de crecimiento, de necrosis tumoral, interferones y quimocinas (Simpson *et al.*, 1997).

Una de las citocinas más estudiadas en el ámbito de la farmacología es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), o caquectina; las fuentes celulares principales de TNF- α son los linfocitos T activados y las células de linaje monocítico al que pertenece un fenotipo como el de las células de Kupffer (DeCicco *et al.*, 1998). El TNF- α tiene impacto en diversos procesos biológicos en el hígado, interviniendo en la proliferación celular, la inflamación, la fibrosis, la necrosis y la apoptosis. En el humano se observa que al incrementar el TNF- α plasmático se ve un aumento en los niveles de ALT y bilirrubinas, indicando un papel citotóxico directo sobre los hepatocitos. Tiene también efectos sobre la producción de colágena, sobre todo en el tipo I, e induce la presencia de metaloproteasas (colagenasas intersticiales), por lo que es importante cuantificar sus niveles plasmáticos en un modelo de cirrosis experimental (Simpson *et al.*, 1997; Bradham, 1998).

La interleucina-10 (IL-10) es una citocina antiinflamatoria por excelencia y es quizás la más potente e importante. Sus funciones principales son limitar y terminar las

respuestas inflamatorias, bloquear la secreción de citocinas proinflamatorias y regular la diferenciación y proliferación de muchas células inmunológicas (Li y He, 2004). La IL-10 regula a la baja la producción de citocinas pro inflamatorias como TNF- α e IFN- γ , inhibe la acción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y además posee propiedades hepatoprotectoras (Thompson *et al.*, 1998; Nelson *et al.*, 2000).

1.5. Plantas medicinales y herbolaria tradicional.

El hombre desde su origen ha recurrido a la naturaleza como provisor a sus necesidades y han utilizado las plantas para satisfacer la mayoría de sus necesidades como lo son el alimento, la salud y el techo (Schultes y Von Reis, 1997; Zamora-Martínez y Barquín-López, 1997). Las plantas fueron la base para el desarrollo de los seres humanos, no sólo por proveer los alimentos para desarrollar nuestro organismo, sino también las vitaminas esenciales y muchos principios activos empleados en tratamiento de diversos padecimientos (Zamora-Martínez y Barquín-López, 1997).

Una planta medicinal es aquella especie a la que se le atribuyen propiedades curativas o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (Farnsworth y Soejarto, 1991). La investigación sobre el uso de las plantas medicinales forma parte de la Etnobotánica, la cual se encarga de estudiar la interrelación entre los humanos y las plantas (Holmstedt y Bruhn, 1997). Una gran mayoría de países desarrollados y en desarrollo siguen haciendo uso de ellas actualmente (Aguilar-Contreras *et al.*, 1998). Se sabe poco sobre el verdadero origen de la herbolaria, pero se dice que se remonta a Egipto en el año 1500 antes de Cristo, y su estudio fue prominente en civilizaciones antiguas como China, Grecia, India y el Tíbet y posteriormente culturas como la Árabe que comercializaron plantas medicinales procedentes de Asia (<http://www.bbcmundo.com>, 2012). En México se distingue una larga tradición herbolaria, se estima que las plantas medicinales usadas en el país ascienden a más de 3000. La efectividad de muchas de ellas se ha probado de manera empírica, con base en prueba y error. La historia de los pueblos indígenas está en estrecha relación con el ámbito que los rodea, jugando un papel importante en sus costumbres alimentarias, medicinales, religiosas etc. Durante la colonización de los españoles se inició un intercambio de especies, lo que enriqueció la herbolaria

medicinal de México, la cual incorporó a especies europeas y nativas (Linares *et al.*, 1999).

1.6. Especies de plantas utilizadas en enfermedades hepáticas.

Existe una importancia creciente del uso de plantas medicinales para tratar enfermedades y padecimientos, como lo es el caso de las enfermedades hepáticas o hepatopatías. A continuación en el Cuadro 1, se muestran diversas especies de plantas utilizadas para distintas afecciones hepáticas y para la hepatoprotección en el Estado de Hidalgo, México y en algunos otros países del mundo (Foster y Duke, 1999).

Cuadro 1. Especies de plantas usadas para tratar enfermedades hepáticas.

Nombre Científico y Común.	Partes utilizadas y forma de uso.	Hepatopatía para la que se usa.
<i>Alisma subcordatum</i> . Raf. Plántago acuática (*)	Hojas secas y raíz preparadas en té.	Hígado graso.
<i>Celastrus scandens</i> . L. Agridulce. (*)	Raíz sin corteza y frutos preparados en té.	Cirrosis y enfermedades crónicas del hígado.
<i>Chrysactinia mexicana</i> Gray Calanca (**)	Raíz se prepara en té.	Dolor de hígado
<i>Dichondra argentea</i> H. y B Oreja de ratón. (*)	Raíz se prepara en té.	Dolor de hígado y derramamiento de bilis
<i>Helianthemum glomeratum</i> Lag. Santa Martha. (**)	Ramas se preparan en té	Problemas de hígado y derramamiento de bilis
<i>Juniperus fláccida</i> . Schlenchtt Tláchcal (*)	Semillas se preparan en té.	Cirrosis.
<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) De Wit. Huachi. (*)	Ramas se preparan en té	Dolor de hígado y problemas con vesícula biliar
<i>Pueraria montana var. lobata</i> . Kudzu. (**)	Raíces, flores, semillas y tallos preparados en té.	Hepatoprotectora
<i>Rumex crispus</i> . Lengua de vaca o rizado. (*)	Hojas y raíz preparadas en té.	Cirrosis.

<i>Cynara scolymus</i> L. Alcachofa. (**)	Hojas preparadas en Té	Hepatoprotectora
<i>Solanun cervantesii</i> Lag. Hierba del Perro. (*)	Hojas y flores se preparan en té. Y también se colocan en la zona afectada.	Dolor de hígado
<i>Taraxacum officinale</i> Weber Diente de león. (**)	Hojas y flores se preparan en té.	Dolor de hígado y recoge la bilis.
<i>Valeriana officinalis</i> . L. Valeriana. (*)	Raíz preparada en té	Hepatoprotectora.
<i>Xanthorhiza simplicissima</i> . March. Raíz amarilla. (**)	Raíz preparada en té.	Cirrosis, la berberina que contiene estimula la secreción de bilis y bilirrubina.

Recopilado de Foster y Duke, 1999; Pérez-Escandón *et al.*, 2003; Villavicencio-Nieto y Pérez-Escandón, 2006. (*) Uso empírico o Tradicional, (**) Experimentación Preliminar en animales.

Se han realizado estudios farmacológicos de especies de plantas hepatoprotectoras, tal es el caso del “Cardo Mariano o Cardo de María” *Silybum marianum*, en Chiapas usan las semillas de esta planta para recoger la bilis de una persona. En estudios farmacológicos rigurosos se demostraron sus usos terapéuticos como antipalúdico, antipirético y cáustico sus frutos contienen los flavonoides aromadendrina, 4 ‘5-7-trihidroxi-3’-5’ dimetoxi-flavanona, quercetina, silibina, iso-dehidro-silibina, silibina A, silicristina, isosilicristina, silidianina, silimarina y taxifolina. Otros componentes aislados de la semilla incluyen el alcaloide de isoquinolcina tiramida, el esteroil beta-sistosterol y el alcohol fenilpropanoide de hidro-di-conitefrílico y de la planta completa los sequiterpenos cardonin 22, 35, 75 y 95. Como parte de los resultados de estudios farmacológicos se ha demostrado la actividad colerética ejercida por sus extractos en distintas partes de la planta probados en rata por vía intraduodenal y oral. En el hombre, se ha demostrado la actividad antihepatotóxica del extracto acuoso obtenido de la semilla por vía oral en dosis de 60 mg/g (Argueta-Villamar *et al.*, 1994).

Otro estudio farmacológico de compuestos extraídos de plantas fue el realizado con extracto acuoso de boldo (EAB) (*Peumus boldus*) en el daño hepático inducido por paracetamol. Entre las muchas cualidades medicinales que se le atribuye a las hojas de

boldo se incluyen propiedades coleréticas y colagogas, además de ser considerado como estimulante y protector hepático frente a diversos agentes nocivos. Dichas propiedades radican en los componentes químicos que forman parte de la planta, los cuales incluyen aceites esenciales ricos en hidrocarburos monoterpénicos (p-cimeno, a-pineno), monoterpenos oxigenados (ascaridol, cineol o eucaliptol, linalol, entre otros), y alcaloides isoquinoleínicos tipo aporfina (principalmente boldina). A esto se suma el porcentaje de flavonoides, catecina, cumarinas y resinas que también forman parte de los principios activos del boldo. El extracto acuoso de boldo basa su potencia antioxidante en compuestos importantes como flavonoides y catequinas que conserva pues ambos son solubles en agua. Como conclusión se determinó que el boldo tiene un efecto protector hepático en el daño inducido por paracetamol en ratas (Ochoa *et al.*, 2008).

La especie *Colchicum autumnale* o narciso de otoño ha sido estudiada ampliamente por la actividad antitumoral de sus componentes, los cuales tienen importancia farmacológica. La colchicina es un alcaloide obtenido de esta especie y tiene propiedades antimicóticas, antiinflamatorias y tiene una aplicación en la clínica para el tratamiento de la gota. En el tratamiento de la cirrosis presenta un efecto antifibrótico que se basa probablemente en una reducción en la secreción de colágena y un aumento en la actividad de la colagenasa (Kuntz y Kuntz, 2006). Los resultados obtenidos en el uso clínico de la colchicina son aún controversiales, pues presenta buenos resultados en la prevención de la cirrosis en la hepatitis B y en la hepatitis crónica pero existe la presencia de efectos secundarios, por lo que se han sintetizado y evaluado compuestos análogos de la colchicina sin efectos colaterales (Muriel, 2003).

Para ampliar la lista de fitofármacos para las hepatopatías este trabajo pretende evaluar el efecto hepatoprotector de extracto hexánico de la inflorescencia del *Cirsium ehrenbergii* (Asteraceae) en un modelo de cirrosis experimental en rata.

2. ANTECEDENTES.

Principalmente en países del continente Asiático, el género *Cirsium* ha sido estudiado ampliamente por sus propiedades y usos potenciales en el tratamiento de distintas enfermedades. Por ejemplo el *Cirsium japonicum*, es una hierba perenne silvestre que se distribuye en muchas áreas de China, Corea y Japón y es usado en la medicina tradicional como agente antihemorrágico. En la medicina popular se ha prescrito para el tratamiento de tumores y cáncer hepático, uterino y leucemia; por su alto contenido de flavonoides principalmente flavononas. En los últimos años varios investigadores se han interesado en los efectos de las flavonas en el tratamiento de cáncer, por ejemplo la Baicalina la cual podría inhibir la proliferación de células cancerígenas en próstata, la quercetina a la que se le atribuye la capacidad de fortalecer el anticuerpo monoclonal anti-CD95 y así promover su apoptosis, esto en un estudio realizado en un extracto etanólico de *C. japonicum* para corroborar farmacológicamente el uso tradicional de esta planta (Liu *et al.*,2008). El *C. japonicum* también es ampliamente utilizado para el tratamiento de la hipertensión arterial y la mala circulación sanguínea, esto se ha demostrado por los mecanismos vasorrelajantes posibles del extracto acuoso del *C. japonicum*, sobre todo en el tono vascular de la arteria aorta de la rata; los resultados sugirieron efectos protectores cardiovasculares, vasodilatadores y la estimulación de la contracción muscular, al igual que actividad antioxidante, la cual resulta benéfica en las enfermedades cardiovasculares (Kim *et al.*, 2008).

La administración en ratas diabéticas del extracto hexánico de *Cirsium pascuarense* dio lugar a una disminución significativa de niveles de glucosa en sangre, por lo que se le atribuyen propiedades hipoglucemiantes en ratas hiperglucémicas, arrojando resultados similares a los de la tolbutamida sobre la tolerancia a la glucosa; se piensa que esto es porque estimula una mayor actividad de células del páncreas, lo que resulta en la secreción de mayores cantidades de insulina hacia el torrente sanguíneo (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2001).

De los extractos metanólico, hexánico y butanólico de *Cirsium rhinoceros* se aislaron compuestos de interés médico como poliacetileno y flavonoides, descritos anteriormente, útiles como antihemorrágicos, así como en el tratamiento de múltiples

patologías entre ellas las hepáticas (Yim *et al.*, 2003). Un nuevo flavonoide denominado isocaempférido 7-O-d-(6-metilglucurónido) fue aislado de la inflorescencia de *Cirsium rivulare*, el cual tiene actividad antimicrobiana (Nazaruk y Jakoniuk, 2005). De *Cirsium setidens* Nakai se han aislado compuestos de las fracciones de cloruro de metileno, tales como terpenos, ácidos grasos, esteroides, entre otros que mostraron actividad citotóxica significativa frente a cinco líneas celulares de cáncer humano (Lee *et al.*, 2002). Extractos metanólicos y de acetato de etilo de las partes aéreas de *Cirsium tenoreanum*, han sido evaluados por sus componentes fitoquímicos y propiedades antibacterianas y citotóxicas, pues contienen flavonoides como la apigenina, quercetina-3-O-galactósido y kaempferol-3-O-ramnosido (Loizzo *et al.*, 2004).

Especies diversas del género *Cirsium* han sido utilizadas para la hepatoprotección en la medicina tradicional oriental, un ejemplo de esto es la realización de estudios farmacológicos rigurosos para evidenciar estas propiedades, tal como el realizado para evaluar el extracto metanólico de las partes aéreas de *Cirsium japonicum var ussuriense* el cual disminuyó el daño crónico inducido por etanol en rata mediante el incremento de su metabolismo y la disminución del estrés oxidativo, y del cual lograron aislar el compuesto hispidulin 7-O-neoesperidósido (Park *et al.*, 2004).

Los extractos butanólico y etanólico de raíz y hojas de *Cirsium setidens* tienen actividad antioxidante y hepatoprotectora en el daño agudo inducido por CCl₄ en rata, pues se elevaron los niveles de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa-1 (GPO1) (Lee *et al.*, 2008).

El extracto acuoso de raíces y hojas de *Cirsium arisanense* protegió a células Hep-3B y a ratones del daño hepático crónico por tacrina, también por sus efectos antioxidantes y antinecróticos (Ku *et al.*, 2008).

Los compuestos pectolarina y pectolaringenina aislados del *Cirsium setidens* redujeron la necrosis inducida con D-galactosamina en rata y elevaron los niveles de antioxidantes endógenos, lo que demuestra que tiene actividad hepatoprotectora (Yoo *et al.*, 2008).

En el Estado de Hidalgo podemos encontrar 6 especies del género *Cirsium*, (Calderón de Rzedowski y Rzedowski, 2001) estas especies son:

Cirsium durangense. Planta herbácea perenne erecta de hasta 1m de alto, con un tallo estriado blanquecino, hojas dentado-espinosas y corolas rosadas; esta especie es conocida en Durango y en Hidalgo y se tiene el registro de una colecta en el Valle de México (*op cit*).

Cirsium jorullense. Planta herbácea perenne erecta de hasta 2 m de alto, con un tallo estriado lanoso, hojas dentado-espinosas y corolas moradas a blanco rosadas.

Cirsium raphilepis. Planta herbácea perenne erecta de hasta 1 m de alto, con un tallo estriado, hojas dentado-espinosas y corolas amarillentas a blanquecinas.

Cirsium subuliforme. Planta herbácea perenne erecta de hasta 2 m de alto, con un tallo piloso, hojas dentado-espinosas y corolas blanquecinas a rosadas, su presencia para nuestro Estado se reporta en el municipio de Tepeapulco.

Cirsium vulgare. Planta herbácea bienal, erecta de hasta 1.5 m de alto, con un tallo ramificado, hojas espinosas y corolas de color lila (*op cit*).

En este trabajo utilizaremos al *Cirsium eherenbergii* encontrado en 7 de los 84 municipios del Estado de Hidalgo (Pérez-Escandón *et al.*, 2003), para nuestro estudio y sus características son las siguientes: Planta herbácea perenne erecta de hasta 1.5 m de alto, con un tallo erecto, por lo general sin ramificarse en las partes inferiores, estriado, densamente lanoso-tomentoso; hojas basales y caulinares inferiores elípticas en contorno general de hasta 60 cm de largo, más o menos claramente pecioladas, profundamente pinnatipartidas con un margen espinoso-dentado con espinas y esparcidamente aracnoideas en el haz, por lo general densamente blanco-tomentosas en el envés y más reducidas en la base, sus brácteas son de 200 a 300 y son graduadas, las exteriores más cortas, las íntimas lineares y también provistas de espinas, rojizas en su parte superior, su receptáculo es plano o convexo, tiene corolas rosadas a rojizas de 3.5 a 6 cm de largo con antera de 8 a 15mm de ancho también rosado-rojizas en la parte superior pero se tornan blanquecinas con el tiempo,

filamentos pubescentes, estilos rojizos, aquenios oblongo-oblanceolados, de 7 a 8 mm de largo, glabros de color beige con cerdas aplanadas. El *C. ehrenbergii* también es llamado cardo rojo, cardo de montaña, cardo santo, cuautlahizquilitl, mala mujer o rosa de las nieves, ubicado en las partes montañosas más húmedas del Valle de México. Se encuentra en Durango, Nuevo León, Jalisco, Hidalgo, Morelos y Veracruz; se emplea en la medicina tradicional para diversas afecciones (Calderón de Rzedowski y Rzedowski, 2001). El *C. ehrenbergii* fue colectado en el Mineral del Chico Hidalgo, el cual se encuentra ubicado entre las coordenadas 20°11' y 20° 12' latitud norte y 98° 41' a 98° 47' longitud oeste (Vargas, 1984). En donde predomina el bosque de pino y encino (Rzedowski, 1978), pero está conformada por seis comunidades vegetales: bosque de cedro, de oyamel, de oyamel-encino, de encino, de pino-encino y pastizal; y su clima es templado sub-húmedo (Zavala, 1995).



Fig.8. *Cirsium ehrenbergii*

El *Cirsium ehrenbergii* por su parte se clasifica dentro del REINO: Plantae, al DOMINIO: Magnoliophyta, a la CLASE: Magnoliopsida, en el ORDEN: Asterales, a la FAMILIA: Asteraceae del GÉNERO: *Cirsium* y ESPECIE: *ehrenbergii* (Calderon de Rzedowski y Rzedwski, 2001). El uso medicinal principal que recibe esta planta, sobre todo en el centro del país, es para problemas del sistema respiratorio, para ello se utilizan las flores en cocción o se hace una cocción con las cabezuelas del cardo, en casos de neumonía se utilizan los tallos. El uso de este género es muy variado ya que también lo utilizan cuando hay irritación en los ojos, también se emplea como antihemorrágico, para regular la presión arterial y para desinflamar golpes o heridas y en caso de dolor reumático (Argueta-Villamar *et al.*, 1994).

El *Cirsium ehrenbergii* o cardo rojo es utilizado en la medicina tradicional hidalguense para tratar el dolor de pecho, la hemorragia vaginal y la tos en 7 de sus 84 municipios en donde se encuentra localizado (Pérez-Escandón *et al.*, 2003).

En un estudio fitoquímico y biológico preliminar de *Cirsium ehrenbergii*, a partir de los extractos polares como lo son el metanólico y el acuoso y el no polar como lo es el hexánico, se observó que las fracciones hexánicas poseen una actividad antimicrobiana alta comparada con los extractos polares, que se atribuyó 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 tuvieron efectos biológicos significativos comparados con los obtenidos con los extractos hexánicos, que mostraron poseer capacidades antimicrobianas y relajantes (Fernández-Martínez *et al.*, 2007).

Como antecedente más reciente y directo se encuentra el estudio en los extractos hexánicos de las inflorescencias de *Cirsium ehrenbergii* y de *Cirsium vulgare* administrados a los animales de acuerdo a un esquema de tratamiento previamente establecido con dos dosis de extractos (250 mg/kg y 500 mg/kg), los dos mostraron tener actividad hepatoprotectora frente al daño agudo inducido con CCl₄ en rata, esto se podría atribuir a concentraciones altas de compuestos fenólicos con capacidad atrapadora de radicales libres (Jiménez-Santana, 2010).

3. JUSTIFICACIÓN.

Las enfermedades hepáticas ocupan el 4º lugar entre las causas principales de mortalidad nacional y mundial, así como el 2º entre las causas de muerte principales en edad productiva, es decir, de 25 a 64 años. (www.sinais.salud.gob.mx, 2008).

La cirrosis hepática es una enfermedad cuya incidencia de mortalidad está en la población en edad productiva de todo el mundo, una vez establecido el padecimiento difícilmente pueden funcionar los escasos tratamientos existentes, ya que hay una carencia de fármacos para tratar patologías hepáticas en comparación con los que existen para el tratamiento de otros padecimientos (Álvarez-Amezcuca, 1994; Muriel y Rivera-Espinoza, 2008).

La importancia del hígado en el organismo es una justificación para la realización de estudios que busquen alternativas para la hepatoprotección, ya que este órgano lleva a cabo más de 500 funciones metabólicas, entre las que resaltan el metabolismo de los carbohidratos, el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno, la formación de la mayor parte de las lipoproteínas y fosfolípidos, el metabolismo de las proteínas, la formación de bilis y produce dos proteínas muy importantes para el proceso de coagulación de la sangre como lo son el fibrinógeno y la protrombina, así como ser el principal detoxificador de sustancias. El hígado es un órgano que sufre laceraciones con facilidad en el humano, ya que es un órgano muy vascularizado y vulnerable a daños principalmente por intoxicación o congestión del mismo (Porth, 2006).

Un agente etiológico importante en las hepatopatías es el alcoholismo. Las implicaciones sociales relacionadas al consumo y al abuso del alcohol son muchas y muy diversas desde hace años; en la actualidad, se presta cada vez más atención a las consecuencias que acarrea sobre la salud. La cirrosis hepática de los bebedores se debe principalmente a la ingesta excesiva de alcohol, pero también a las cantidades de alcohol pequeñas ingeridas con regularidad a través de los años. La dependencia al alcohol es un padecimiento que trae consigo complicaciones médicas, principalmente afectando al hígado (www.who.int/substance_abuse/expert_committee_alcohol, 2007).

Algunos fármacos empleados comúnmente como el paracetamol, los estrógenos, los esteroides, los anticonceptivos, el diclofenaco, el ketorolaco, el naproxeno y la penicilina tienen efectos nocivos sobre el hígado (Pérez-Tamayo y López-Corella, 2007).

Se calcula que en el mundo hay de 35,000 a 70,000 especies de plantas medicinales (Farnsworth y Soejarto, 1991). La Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que el 60% de la población mundial emplea a las plantas con fines medicinales y la cifra asciende al 80% en los países en vías de desarrollo. Solamente una fracción pequeña de plantas, que va del 5 al 15% ha sido estudiada fitoquímica y farmacológicamente, por lo que existe un vasto campo de trabajo para la investigación (Holmstedt y Bruhn, 1997). La flora es uno de los recursos naturales renovables más importantes en nuestro país, ya que dadas sus características climáticas y geográficas, permite el crecimiento y desarrollo de una gran variedad de especies vegetales que son utilizadas en la medicina popular y hasta la fecha no han sido completamente estudiadas para validar científicamente sus efectos. Es una prioridad encontrar tratamientos adecuados para mejorar e idealmente revertir enfermedades hepáticas, de ahí la importancia del estudio de los fitofármacos con el fin de obtener una alternativa terapéutica más para estas enfermedades (Álvarez-Amezcu, 1994).

Actualmente, se están utilizando los extractos de algunas plantas en la terapéutica de varias enfermedades del hígado, por lo que en este trabajo estudiaremos el efecto hepatoprotector de la inflorescencia *Cirsium ehrenbergii* en un modelo de cirrosis experimental inducida con CCl₄ en rata.

4. HIPÓTESIS.

Al evaluar el extracto hexánico de la inflorescencia del *Cirsium ehrenbergii*, (Asteraceae) podría tener un efecto hepatoprotector en un modelo de cirrosis experimental inducido con CCl₄ en rata.

5. OBJETIVOS.

5.1. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el efecto hepatoprotector del extracto hexánico de la inflorescencia de *Cirsium ehrenbergii* (Asteraceae) en un modelo experimental de cirrosis por tetracloruro de carbono en rata.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Reproducir el modelo de cirrosis hepática por CCl₄ en ratas.
- Administrar crónicamente el extracto hexánico de la inflorescencia de *Cirsium ehrenbergii* a ratas normales, para descartar efectos tóxicos del extracto *per se*.
- Evaluar el efecto hepatoprotector del extracto en ratas cirróticas mediante marcadores de daño hepático, para comprobar sus propiedades farmacológicas.
- Cuantificar los niveles plasmáticos de citocinas para evidenciar el efecto inmunomodulador del extracto y relacionarlo con la hepatoprotección.

6. METODOLOGÍA.

6.1. Colecta y preparación del extracto de *Cirsium ehrenbergii*.

Se realizó la colecta de *Cirsium ehrenbergii* en el Mineral del Chico Hidalgo, el *C. ehrenbergii* fue previamente identificado en el Herbario del Centro Médico Siglo XXI del IMSS, con número de voucher 15597IMSSM, colectando únicamente la inflorescencia, para proceder a su secado a temperatura ambiente. Las inflorescencias secas se molieron de forma manual, con ayuda de un molino de maíz y una vez molidas se llenaron cartuchos de papel filtro los cuales se colocaron en un Soxhlet para su extracción. La extracción Soxhlet se fundamenta en las siguientes etapas: 1) colocación del solvente en un matraz balón; 2) ebullición del solvente que se evapora hasta un condensador a reflujo; 3) el condensado cae sobre un recipiente que contiene un cartucho poroso, elaborado con papel filtro con la inflorescencia molida en su interior; 4) ascenso del nivel del solvente cubriendo el cartucho hasta un punto en que se produce el reflujo que vuelve el solvente con el material extraído al balón; 5) se vuelve a producir este proceso la cantidad de veces necesaria para que la muestra quede agotada. La cantidad de hexano como disolvente fue la suficiente para cubrir un volumen del 80% del cartucho y para que se realice el sifoneo sin que quedara seco el matraz balón (Núñez, 2007. <http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-ExtraccinconequipoSoxhlet.>, 2007).

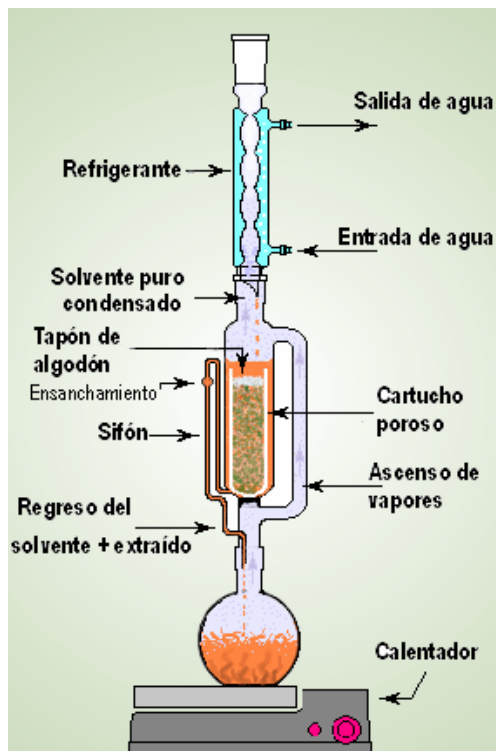


Fig. 9. Esquema de extracción con Soxhlet en el momento en que se produce el sifonamiento del solvente.

El extracto se concentró a sequedad con ayuda de un rotavapor y una vez obtenido el extracto concentrado, posteriormente se colocó en un baño María y se mantuvo a masa constante y se refrigeró hasta su utilización y administración a los animales por dos vías, la vía oral utilizando una cánula de acero inoxidable con punta roma y la vía intraperitoneal con una jeringa de tuberculina con aguja de 15x32. La metodología experimental se encuentra representada en la Fig.10.

6.2. Administración a los grupos experimentales.

Para los cuatro grupos experimentales se utilizaron ratas Wistar macho de entre 60 y 80 g de masa, y de aproximadamente dos semanas de nacidos después de su destete. Los animales permanecieron en cajas plásticas a temperatura constante de 21°C, bajo ciclos de luz/obscuridad de 12 horas cada uno y tuvieron acceso libre al agua purificada de marca comercial y alimento (dieta estándar Purina Chow). Las ratas recibieron trato ético 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. Los grupos experimentales se encuentran representados en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Grupos experimentales.

Grupo 1. Control de controles.	Grupo 2. Control de Extracto.	Grupo 3. Control Dañado.	Grupo 4. Reto.
<p>VEX= Aceite de oliva, (0.5mL), vía oral. Diariamente.</p> <p>VTC= Aceite mineral, (400 mg/kg), vía intraperitoneal. Tres veces por semana.</p> <p>n = 8</p> <p>(VEX+VTC)</p>	<p>EX= Extracto de <i>Cirsium ehrenbergii</i> (300 mg/kg), vía oral. Diariamente.</p> <p>VTC= Aceite mineral, (400 mg/kg), vía intraperitoneal. Tres veces por semana.</p> <p>n= 10</p> <p>(EX+VTC)</p>	<p>VEX= Aceite de oliva, (0.5 mL), vía oral. Diariamente.</p> <p>TC= CCl₄, (400 mg/kg), vía intraperitoneal. Tres veces por semana.</p> <p>n= 16</p> <p>(VEX+TC)</p>	<p>EX= Extracto de <i>Cirsium ehrenbergii</i> (300 mg/kg), vía oral. Diariamente.</p> <p>TC= CCl₄ (400 mg/kg), vía intraperitoneal. Tres veces por semana.</p> <p>n=16</p> <p>(EX+TC)</p>

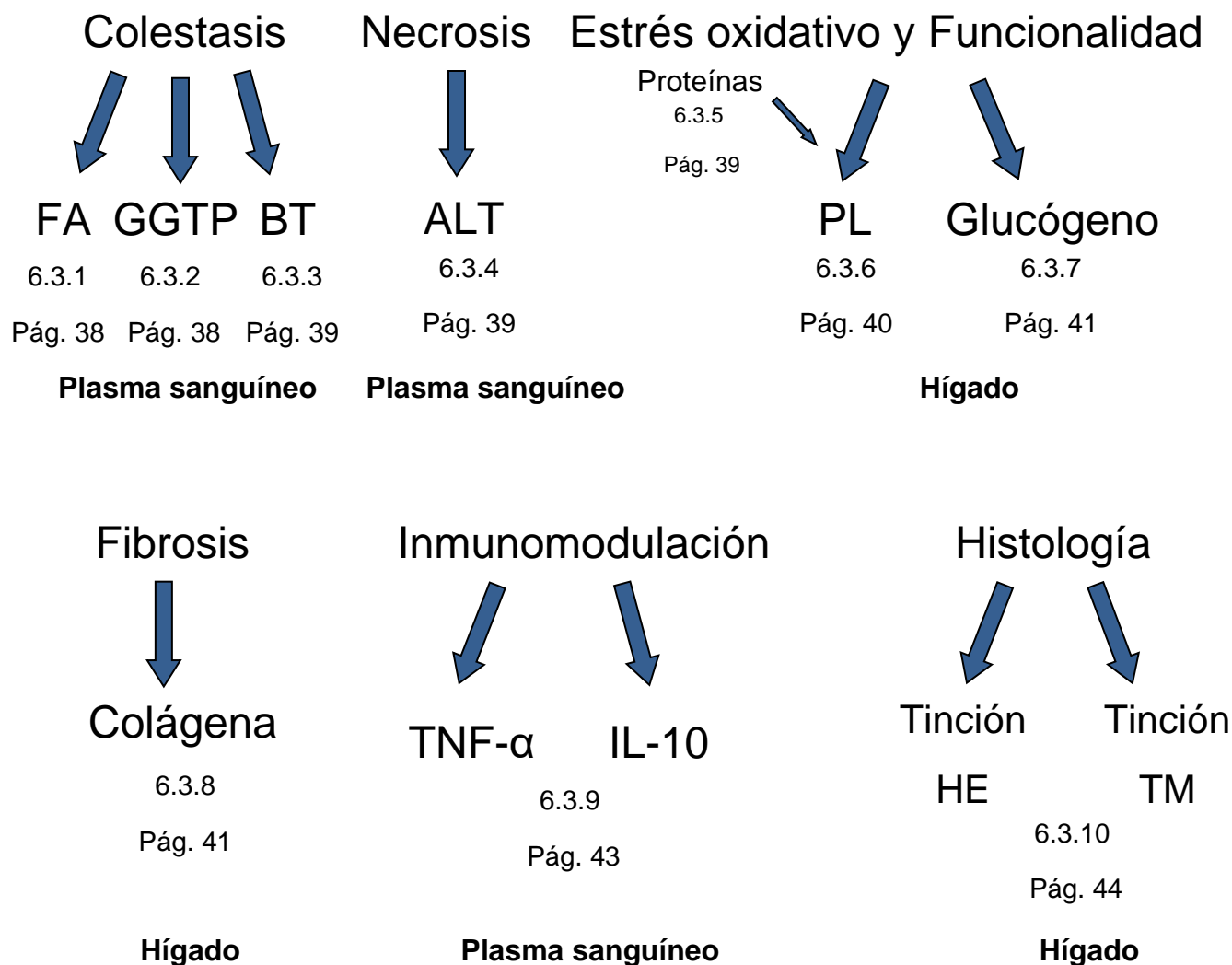
El motivo por el cual el tamaño de las n, no es uniforme es porque en los grupos controles todos los animales sobreviven hasta el final del tratamiento, mientras que en el grupo dañado la n, es más robusta porque algunos ejemplares mueren al no tolerar el daño dejando una población más pequeña, lo que podría implicar un aumento del error estándar en las pruebas estadísticas.

6.3. Determinación de marcadores bioquímicos.

Después de transcurridas las 8 semanas de tratamiento se sacrificaron las ratas de todos los grupos experimentales por exanguinación bajo anestesia leve de éter, la sangre fue recolectada por punción cardiaca utilizando una jeringa conteniendo

heparina sódica como anticoagulante (1000 U/mL). Se removió al hígado y se enjuagó en solución salina, posteriormente las muestras se mantuvieron en hielo.

Una vez sacrificados los animales se realizaron las determinaciones bioquímicas en plasma y en hígado de los marcadores de daño y funcionalidad hepáticos, la cuantificación de citocinas, así como la toma de muestras para análisis histológico. El plasma se obtuvo de la sangre colectada y centrifugada a 3,000 rpm por 10 minutos. Los marcadores fueron los siguientes:

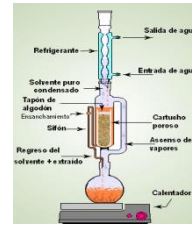


Colecta de *C. ehrenbergii*



Solo la Inflorescencia.

Molienda y elaboración del extracto



Determinación de los Marcadores Bioquímicos de Daño y Funcionalidad Hepáticos, en plasma y en hígado

Sacrificios de los grupos experimentales

Administración a los grupos experimentales



F.A
GGTP
ALT
BT
TNF- α e IL-10



Peroxidación Lipídica
Glucógeno.
Colágena.
Histología

Vía oral y vía intraperitoneal.

Fig. 10. Metodología experimental.

6.3.1. Determinación de la actividad enzimática de FA.

Este método se basa en la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato por la FA, para producir fosfato inorgánico y p-nitrofenol, el que se lee a 410 nm (Berger y Rudolph, 1963; Bergmeyer *et al.*, 1983).

En tubos de ensaye de 13x100 mm la mezcla de reacción se preparó colocando: 0.25 mL de amortiguador de glicina 0.1M, con MgCl₂ 1mM pH= 10.5 y 0.25 mL de substrato de p-nitrofenilfosfato (preparado con 100 mg de p-nitrofenifosfato disódico en 25 mL de agua). La mezcla se incubó en baño María a 37 °C durante 5 minutos, la reacción se disparó al añadir 50 µL de la muestra plasmática, después se mezcló suavemente y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo al adicionar 5 mL de NaOH 0.02 N, se agitó y se leyó a 410 nm en un espectrofotómetro.

El blanco fue idéntico a lo descrito, sólo que en vez de muestra plasmática se adicionaron 50 µL de agua y se llevó a cabo su lectura correspondiente. La actividad enzimática se determinó al interpolar el valor en una curva estándar de p-nitrofenol y se reportó en µmol de substrato hidrolizado por litro de plasma por minuto.

6.3.2. Determinación de la actividad enzimática de GGTP.

En este método se utilizó como substrato 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 la glicil-glicina, produjo la γ -glutamilglicina y p-nitroanilina que pudo cuantificarse con un espectrofotómetro a 410 nm (Glossman y Neville, 1972).

En un tubo de ensaye de vidrio de 13x100 mm se agregaron los siguientes reactantes: 400 µL de tris-HCl 200 mM a pH= 8.2, 100 µL de MgCl₂ 200 mM, 100 µL de glicil-glicina 40 mM pH= 8.2 y 200 µL de γ -glutamyl-p-nitroanilida 10 mM. La mezcla de reacción se incubó en baño María a 37 °C durante 10 minutos y se inició la reacción al agregar 200 µL de plasma. Se agitó e incubó a 37 °C durante 30 minutos, la reacción enzimática se detuvo con 2 mL de ácido acético 1.5 M. Se leyó a 410 nm en el espectrofotómetro. La actividad enzimática se determinó interpolando el valor de la muestra en una curva

estándar de p-nitroanilina y se reportó en μmol de sustrato hidrolizado por litro de plasma por minuto. No se requirió de blanco.

6.3.3. Determinación de concentración de bilirrubinas totales.

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.

6.3.4. Determinación de la actividad enzimática de ALT.

Se siguió la técnica que a continuación se describe (Reitman y Frankel, 1957):

Se rotularon los tubos de ensaye de vidrio de 13X100 mm para la muestra problema y el blanco. Se agregó 0.25 mL de solución de sustrato para todos los tubos y se agregó también 0.05 mL de suero problema (muestra plasmática) únicamente a los tubos de muestra problema; se mezclan y agitan suavemente y se procedió a incubar en baño María a 37 °C durante 60 min a todos los tubos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se agregaron 0.25 mL de reactante de cromógeno a todos los tubos, posteriormente se añadió 0.05 mL de suero problema únicamente a los tubos blancos, se llevaron nuevamente a incubar a 37 °C durante 15 min, a todos los tubos, por último, se agregaron 2.5 mL de NaOH al 0.4 N y se realizó la lectura en un espectrofotómetro a 515 nm.

6.3.5. Determinación de proteínas por el método de Bradford.

Realizadas bajo la técnica de Bradford (Bradford, 1976) la cual tiene el procedimiento siguiente:

Se tomaron 100 μL del homogenado utilizado en la determinación de grado de peroxidación lipídica y se llevaron a 1,000 μL en agua bidestilada, se tomaron alícuotas para proteínas y se llevaron a 100 μL con agua (20 μL de la dilución anterior + 80 μL de

agua bidestilada). El blanco se preparó con 100 μL de agua. Se añadieron 2.4 mL de reactante de Bradford (previamente preparado con: 100 mL de ácido fosfórico al 85%, 50 mL de alcohol etílico y 100 mg de azul de Coomasie G-250 aforado a 1 L con agua). Por último se realizó la lectura a 595 nm.

6.3.6. Determinación del grado de peroxidación lipídica.

Esta técnica es colorimétrica y se basa en el método del ácido tiobarbitúrico (TBA) (Buege y Austin, 1978).

Se pesaron 0.5 g de hígado y se homogenizaron en 5 mL de agua bidestilada. Se colocaron en un tubo de ensaye de 13X100mm 300 μL del homogenado y se agregó 700 μL de Tris-HCl 150 mM para completar 1 mL, los tubos se incubaron en baño María a 37 °C por 30 minutos y mientras se encontraban en incubación se agregaron 2 mL de TBA al 0.375% disuelto en TCA al 15%, posteriormente se pusieron a ebullición por 45 minutos. Se centrifugaron a 3,000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se leyó a 532 nm. Al finalizar este procedimiento se realizaron los cálculos siguientes:

$$C = A / \xi \quad L = A \times 19.2308$$

Donde:

C es la cantidad de nmoles de MDA en la muestra final

A Es la absorbencia de la muestra

L Es la longitud de la celda (1 cm)

ξ Es el coeficiente de extinción del malondialdehído (MDA)= $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$

Considerando que 19.2308 es el factor final para calcular las nmoles de MDA en la muestra de hígado en los volúmenes y diluciones trabajados a la absorbencia determinada.

6.3.7. Determinación de cantidad de glucógeno hepático.

Se realizó la cuantificación del glucógeno con la técnica de la antrona (Seifter *et al.*, 1950).

Se pesaron 0.5 g de hígado en tubos de tapón esmerilado, se adicionaron 1.5 mL de KOH al 30%, se taparon e hirvieron en baño de agua durante 30 minutos. Después de enfriarse se pasó el contenido cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL, se aforó con agua agitando muy bien. Del matraz anterior se tomaron de 40 a 160 μ L con pipeta volumétrica, se llevaron a 1 mL en tubos de 13 x 100 mm esmerilados, por duplicado, se preparó además un tubo blanco que contuvo 1 mL de H₂O y otros 2 estándares con 20 μ L de una solución de glucosa estándar (1 mg/mL) y se llevaron a 1 mL con agua. Se preparó una solución de antrona 0.2% en H₂SO₄ concentrado. Se añadieron (con ayuda de una bureta) 2 mL a cada tubo agitando suavemente y enfriando sobre hielo, se taparon los tubos fríos y pusieron en un baño de agua hirviendo por 15 min, una vez que se enfriaron sobre agua con hielo, se realizó la lectura a 620 nm.

Se realizaron los cálculos siguientes:

$$20 \times A_m / 1.11 \times A_e = \mu\text{g de glucógeno en la alícuota}$$

A_m = Absorbencia de la muestra.

A_e = Absorbencia del estándar.

Los resultados se expresaron como gramos de glucógeno por 100 g de hígado

6.3.8. Determinación de hidroxiprolina.

La técnica utilizada se basa en la descrita por Rojkind y González (1974).

Se pesó 0.1 g de hígado de rata previamente seco con papel filtro y se colocó en una ampolleta y se agregaron 2 mL de HCl 6N y se sellaron con el mechero o soplete, posteriormente se colocaron a 100 °C en el horno durante 24 h. Una vez hidrolizada la muestra, se destaparon las ampolletas y se colocaron nuevamente en el horno a

temperatura de 60 °C aproximadamente 24 h o hasta que se secaron. Las muestras ya secas se resuspendieron con 1 mL de solución amortiguadora (Sol. 1); se agitaron vigorosamente en el vortex y se vaciaron en tubos de ensaye, las ampollitas se lavaron con 1 mL de la misma solución. Se centrifugaron a 3,000 rpm durante 15 min. En un tubo conteniendo una pequeña porción de anorita (carbón activado) se depositó el sobrenadante, se agitó durante 1 min, se centrifugó a 3,000 rpm por 15 min, si se observaba que el sobrenadante no quedaba claro se repetía este paso. Se tomó 1 mL del sobrenadante más 1 mL de H₂O y 1 mL de cloramina T (Sol. 2). Se dejó reposar exactamente 20 min a temperatura ambiente. Se hizo un blanco sólo con 2 mL de H₂O, es decir en vez del mL del sobrenadante. Transcurridos los 20 min, se adicionaron 0.5 mL de tiosulfato de sodio 2 M, 1 mL de NaOH 1N y aproximadamente 2 g de NaCl . Se agitaron inmediatamente para detener la reacción. A cada tubo se agregaron 6 mL de tolueno y se agitaron 1 min justamente. Se extrajo la capa de tolueno y se desechó. La porción acuosa se cubrió y se colocó en un baño de agua hirviendo durante 20 min. Los tubos se enfriaron 15 min preferentemente en refrigerador. Ya fríos se les adicionaron 6 mL de tolueno y se agitaron durante 1 min. De la fase de tolueno se tomaron alícuotas por duplicado de 1 mL y se les agregaron 4 mL del reactivo de Ehrlich (Sol. 3), se agitaron fuertemente. Se dejaron reposar durante 30 min para que se llevara a cabo la reacción colorida. Pasados los mismos, se leyeron a 560 nm.

La preparación de reactantes consistió en lo siguiente:

Solución 1. Amortiguadora de acetato de sodio – ácido cítrico, pH = 6. (Relación para un litro): 50 g de ácido cítrico, 120 g de acetato de sodio (3H₂O), 34 g de hidróxido de sodio, 15 mL de ácido acético glacial; esta solución amortiguadora se mantiene en refrigeración y es estable por meses.

Solución 2. Solución de cloramina T. (Relación para 10 mL): 0.141 g de cloramina–T se mezclaron con 2 mL de agua destilada, 3 mL de etilenglicol y 5 mL de solución amortiguadora. Esta solución se debe preparar en el momento de usarse.

Solución 3. Reactante de Ehrlich: Se tomaron 27.4 mL de H₂SO₄ concentrado y se agregaron lentamente a 200 mL de alcohol etílico absoluto en un vaso sobre hielo

(Mezcla. a). Se pesaron 120 g de p-dimetilaminobenzaldehído y se disolvieron en 200 mL de alcohol etílico absoluto (Mezcla b). La mezcla a, de ácido-etanol se agregó lentamente y con agitación a la mezcla b en hielo, el recipiente se cubrió con papel aluminio (solución fotolábil). Se agitó durante 15 minutos y se sacó del hielo, se siguió agitando hasta que se disolvió. La solución se puede almacenar en el refrigerador por varias semanas. Los cristales que precipitaron por el enfriamiento se disolvieron calentando en baño María la solución y agitándola.

6.3.9. Determinación de citocinas en plasma.

Se utilizaron kits para cuantificación de citocinas por anticuerpos monoclonales recombinantes de rata (r)-TNF- α , e IL-10 por el método de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, por sus siglas en inglés y Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas, en español), marca Biosource Internacional Inc. E.E.U.U. La técnica se siguió tal cual está descrita por el proveedor y se llevaron a cabo las diluciones adecuadas cuando fue requerido que en nuestro caso fue de una dilución 1:4.

6.3.10. Histología.

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Patología Experimental, perteneciente al CINVESTAV en la ciudad de México, además se contó con la colaboración de la Dra. Mineko Shibayama Salas.

Las técnicas utilizadas fueron la tinción de rutina de Hematoxilina/Eosina (HE) para evidenciar el núcleo en color azul y el citoplasma de los hepatocitos teñido de color rosa y la segunda tinción fue la tricrómica de Masson (TM) donde se busca teñir en hígado a las bandas de colágena en color azul, el núcleo celular en color negro y el citoplasma de color rojo. Se llevó a cabo el siguiente procedimiento común para ambas tinciones:

Los cortes de hígado se depositaron en un vial de plástico conteniendo una solución fijadora de formaldehído (formol) al 10% en PBS, el tiempo mínimo de fijación fue de 24 horas. Los cortes se lavaron con agua corriente, se deshidrataron en alcoholes y embebieron en parafina. Se hicieron cortes de 6-7 micras de grosor y se cubrieron y se realizó lo siguiente:

1) Tinción de Hematoxilina/Eosina. Las rebanadas se desparafinaron y rehidrataron con xileno, alcohol absoluto y alcohol al 95%. Se aplicó la hematoxilina de Harris durante 15 min. Se enjuagaron en agua corriente por 2 minutos. Se diferenciaron en alcohol ácido con 3 a 10 inmersiones se verificó la diferenciación con microscopio, los núcleos se distinguieron y el fondo fue de color muy tenue o incoloro después se lavaron en agua corriente brevemente. Una vez lavadas se sumergieron en agua amoniacal o saturada de carbonato de litio hasta que las secciones fueron de color azul brillante, nuevamente se lavaron en agua corriente de 10 a 20 min. Se tiñeron con eosina de 15 s a 20 min dependiendo de la edad de la eosina y el grado de contraste deseado (contrateñido). Se lavaron ahora con alcohol al 95% y también se lavaron con alcohol absoluto, al menos dos cambios. Se lavaron con xileno también dos cambios. Se montaron en el polímero Permout o bálsamo.

2) Tinción Tricrómica de Masson, descrita por Masson en 1948: Las rebanadas se desparafinaron y rehidrataron con xileno, alcohol absoluto y alcohol al 95%. Se enjuagaron en agua destilada. Se sumergieron en el fijador de Bouin por 1 h a 56 °C, o toda la noche a temperatura ambiente, se dejaron enfriar y se lavaron con agua corriente hasta que el color amarillo desapareció. Se enjuagaron con agua destilada, se sumergieron en la solución de hematoxilina de hierro de Weigert por 10 min. Se enjuagaron con agua corriente el mismo tiempo. Se enjuagaron con agua destilada. Se sumergieron en la solución de fucsina ácido-escarlata de Biebrich por 15 min. Se recuperó la solución. Se enjuagaron con agua destilada. Se colocaron en solución de ácido fosfomolibdico/ácido fosfotungstínico por 10 a 15 min antes de la solución de anilina azul. En ácido fosfotungstínico acuoso al 5% por 15 min antes del contraste verde claro. Se desechó la solución. Se colocaron en la solución de anilina azul por 5 a 10 min o con la solución verde claro por 1 min. Se recuperó la solución. Se enjuagaron con agua destilada. Se lavaron con agua acética al 1% por 3 a 5 min. Se desechó la solución. Se lavaron con alcohol al 95%. Se lavaron con alcohol absoluto, dos cambios. Se lavaron con xileno, dos cambios. Se montaron en el polímero Permout o bálsamo.

6.4. Pruebas estadísticas.

Las pruebas estadísticas aplicadas a los datos de cada grupo experimental de ambos modelos animales de la parte biológica fueron análisis de varianza (ANOVA) de una vía, para la comparación de todos los grupos contra todos, es la llamada comparación múltiple pareada total del método de Student-Newman-Keuls; esta prueba proporciona la diferencia estadísticamente significativa con una $P < 0.05$. La prueba se corrió en un paquete de Sigma-Stat versión 10.0 (Systat Software, E.E.U.U.).

7. RESULTADOS.

La cantidad de extracto hexánico de la inflorescencia de *C.ehrenbergii*, fue la suficiente para terminar el esquema de tratamiento de ocho semanas obteniendo un rendimiento del 4.25% (2.54 kg de materia orgánica seca para 107.94 g de extracto). Los resultados para cada uno de los marcadores bioquímicos de daño hepático se describen a continuación. Los valores promedio de cada grupo experimental se representan por medio de gráficas de barras \pm error estándar (EE).

La actividad enzimática de FA (Fig. 11), la cual es un marcador de colestasis, tuvo un incremento significativo en el grupo dañado (VEX+TC) en comparación con el grupo control de controles (VEX+VTC), pero el tratamiento con extracto del grupo EX+TC indujo una disminución apreciable ($P<0.05$) en este marcador, presentando un valor similar al observado en los grupos controles, lo que nos indica un efecto anticoléstatco del extracto.

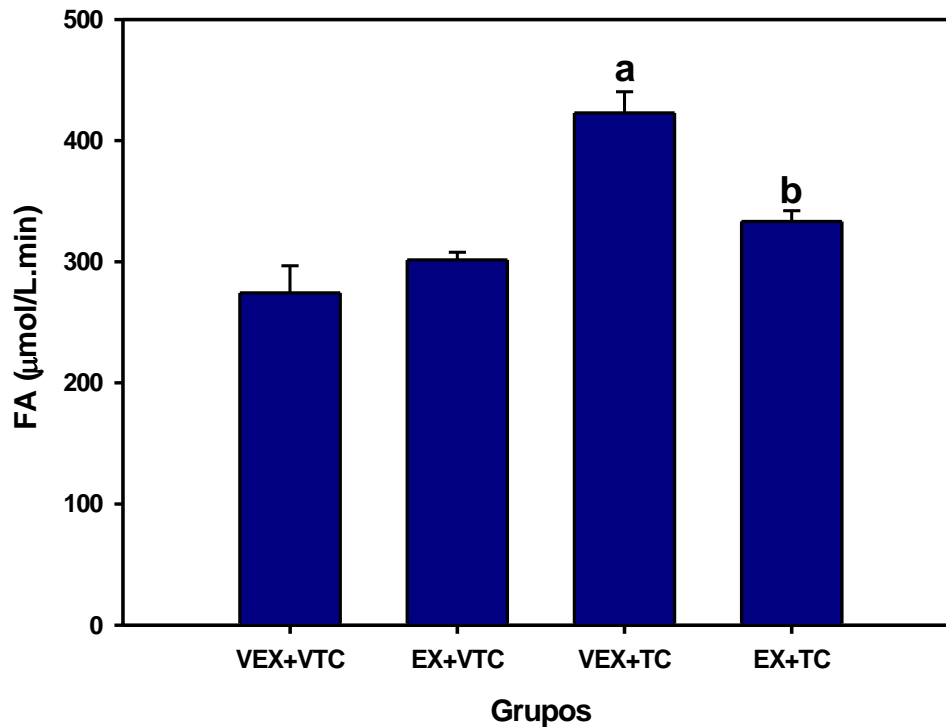


Fig. 11. Actividad enzimática de FA, cada barra representa el promedio de cada grupo experimental \pm EE, con una n que va de 8 a 16 animales, (a) representa la diferencia con

respecto al grupo VEX+VTC y **(b)** la diferencia respecto al grupo VEX+TC. $P<0.05$. ANOVA, Student-Newman-Keuls.

En la Fig. 12 se presentan los resultados obtenidos en la medición de la actividad enzimática plasmática de GGTP que es el marcador de colestasis más sensible. Esta actividad enzimática se encontró elevada en forma significativa en el grupo dañado (VEX+TC), con respecto a la observada en el grupo control de controles (VEX+VTC). El valor del grupo control del extracto EX+VTC no mostró una diferencia al compararse con el grupo control, mientras que la administración del extracto (EX+TC) abolió la elevación de dicha actividad como en el grupo dañado ($P<0.05$). Estos datos sugieren una prevención del daño hepático colestático en la administración del CCl_4 .

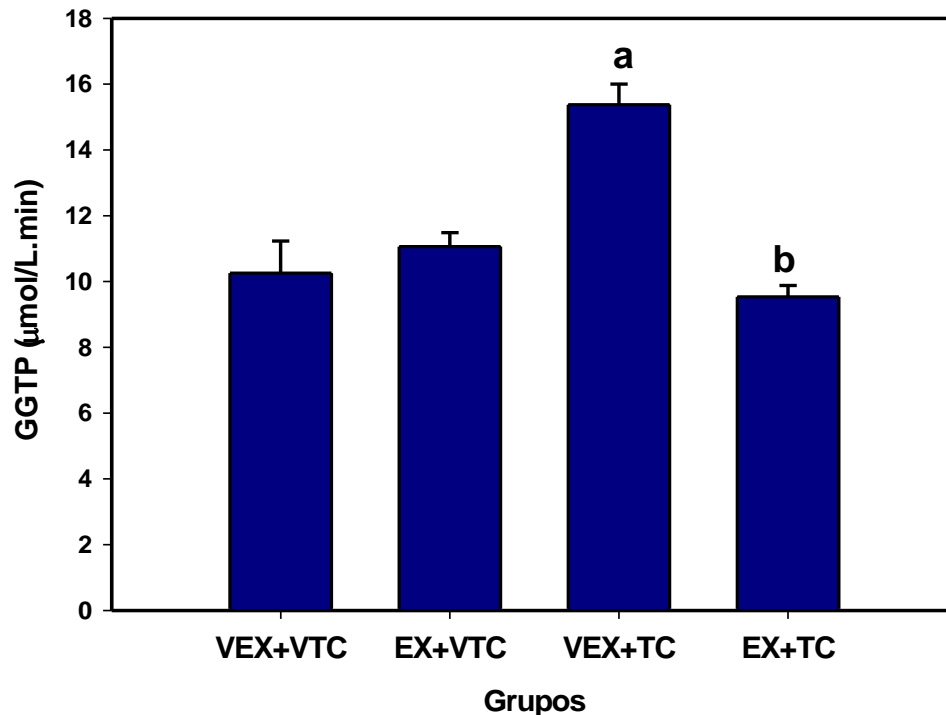


Fig. 12. Actividad enzimática de GGTP, cada barra representa el promedio de cada grupo experimental \pm EE, con una n que va de 8 a 16 animales, **(a)** representa la diferencia con respecto al grupo VEX+VTC y **(b)** la diferencia respecto al grupo VEX+TC. $P<0.05$. ANOVA, Student-Newman-Keuls.

La concentración plasmática de bilirrubinas se incrementó en las ratas cirróticas por la administración de TC ($P<0.05$), mientras que el tratamiento con el extracto de *C. ehrenbergii* (EX+TC) previno significativamente tal elevación ($P<0.05$). El grupo control de extracto (EX+VTC) no induce *per se* algún cambio significativo en la concentración de bilirrubinas, ver Fig. 13. Este resultado confirma el efecto antiolestático del extracto y mantiene la funcionalidad hepática.

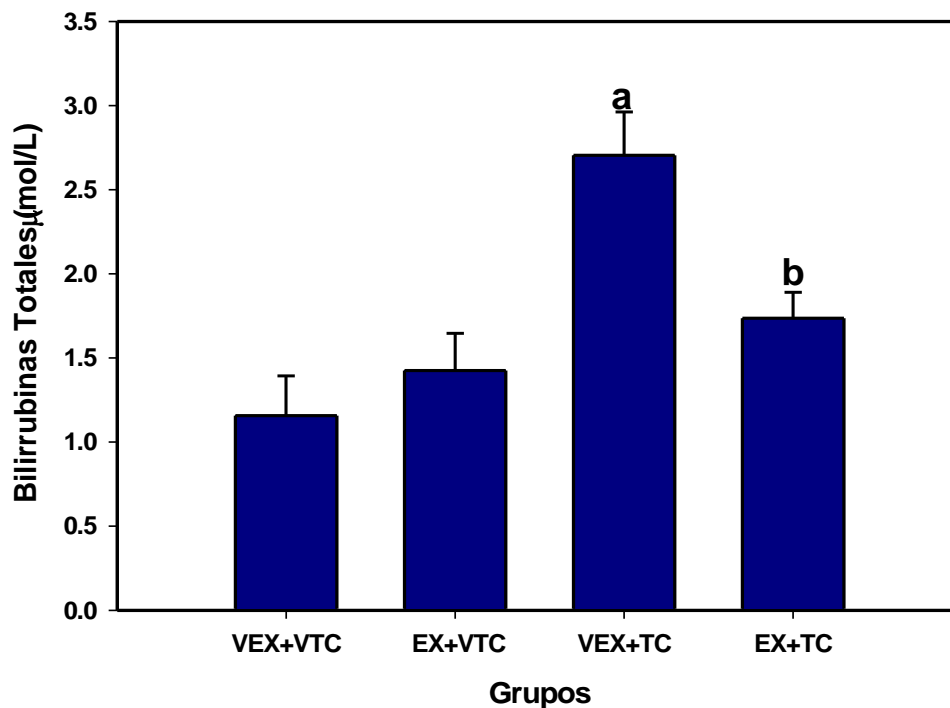


Fig. 13. Concentración de bilirrubinas totales, cada barra representa el promedio de cada grupo experimental \pm EE, con una n que va de 8 a 16 animales (**a**) representa la diferencia con respecto al grupo VEX+VTC y (**b**) la diferencia respecto al grupo VEX+TC. $P<0.05$. ANOVA, Student-Newman-Keuls.

La actividad enzimática de la ALT (marcador de necrosis) indica el estado patológico del grupo dañado VEX+TC ya que tiene una elevación marcada ($P<0.05$) con respecto al grupo control de controles (VEX+VTC); el grupo tratado (EX+TC) mostró un valor

muy similar al grupo control del extracto EX+VTC, y se observa un decremento importante respecto al grupo dañado, lo que indica el efecto antinecrótico preventivo del extracto, ver Fig 14.

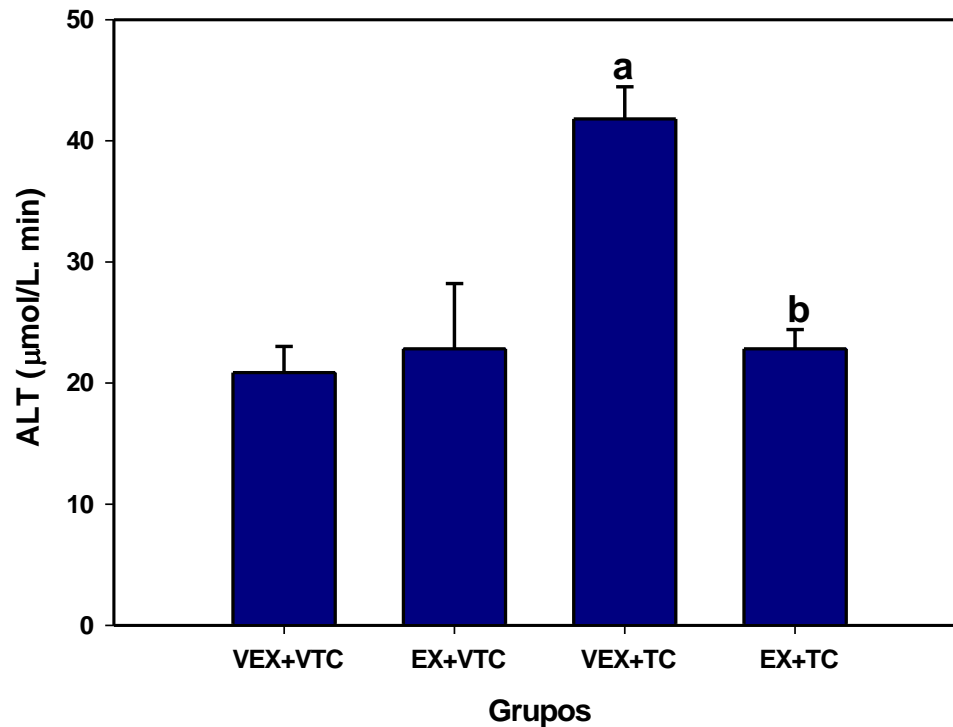


Fig. 14. Actividad enzimática de ALT, cada barra representa el promedio de cada grupo experimental \pm EE, con una n que va de 8 a 16 animales (**a**) Representa la diferencia con respecto al grupo VEX+VTC y (**b**) la diferencia respecto al grupo VEX+TC. $P < 0.05$. ANOVA, Student-Newman-Keuls.

El grado de peroxidación lipídica es un indicador de estrés oxidativo. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 15, en donde el grupo dañado (VEX+TC) se encuentra con una elevación de 5 veces más respecto al grupo control de controles (VEX+VTC), mientras que el grupo administrado con EX y TC es muy similar al grupo control del extracto (EX+VTC); por lo tanto, existe una disminución importante del estrés oxidativo en el grupo tratado con el extracto de la inflorescencia de *C.ehrenbergii*.

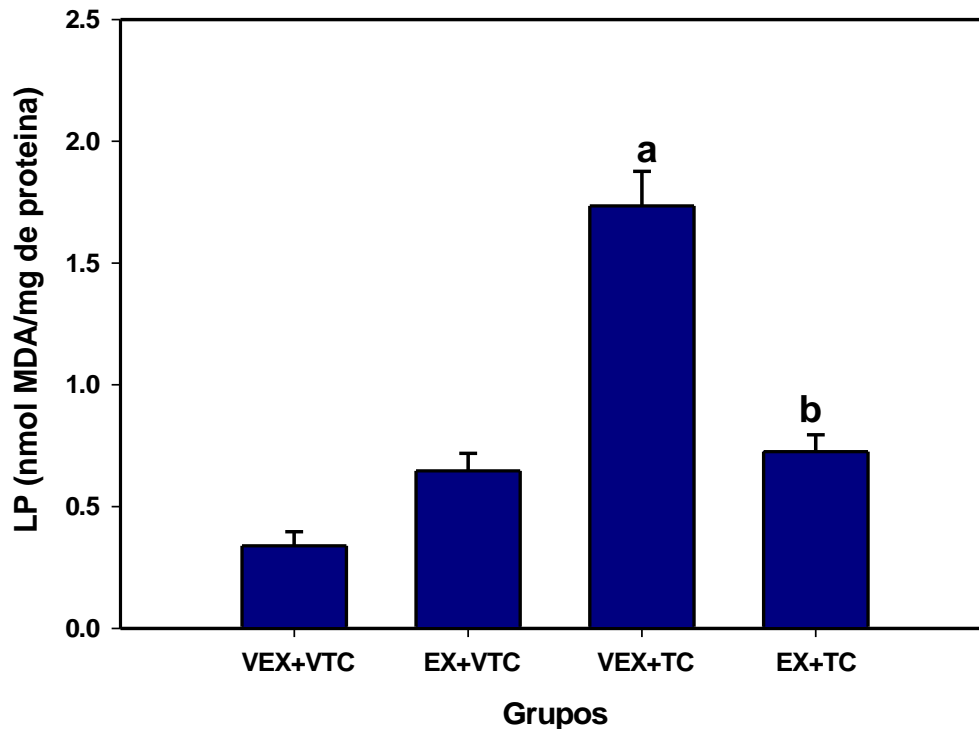


Fig. 15. Grado de lipoperoxidación, cada barra representa el promedio de cada grupo experimental \pm EE, con una n que va de 8 a 16 animales (**a**) representa la diferencia con respecto al grupo VEX+VTC y (**b**) la diferencia respecto al grupo VEX+TC. $P < 0.05$. ANOVA, Student-Newman-Keuls.

En la cirrosis experimental existe una disminución marcada en la cantidad de glucógeno hepático, como se observa en el grupo dañado VEX+TC comparado contra el grupo control de controles (VEX+VTC) ($P < 0.05$). Además, el extracto (EX+VTC) no modifica significativamente la cantidad de glucógeno hepático respecto al grupo control de controles, mientras que el grupo reto administrado con extracto y TC mantuvo parcial pero significativamente el contenido de glucógeno, como lo muestra la Fig. 16; esto sugiere que el extracto protege el almacén de glucógeno de la depleción por TC.

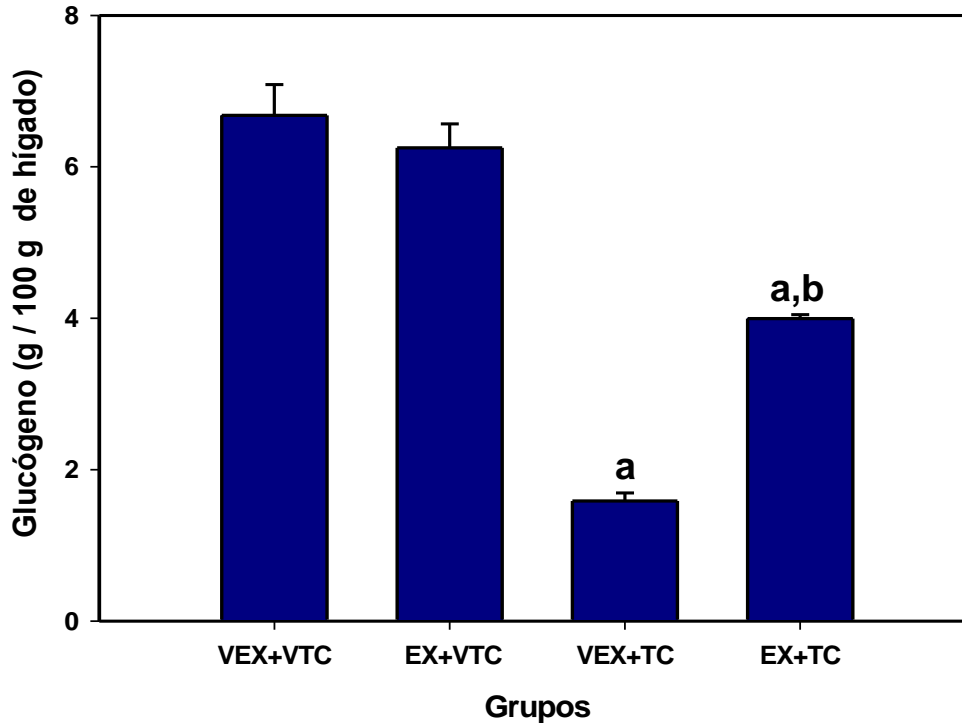


Fig. 16. Cantidad de glucógeno hepático, cada barra representa el promedio de cada grupo experimental \pm EE, con una n que va de 8 a 16 animales, (a) representa la diferencia con respecto al grupo VEX+VTC y (b) la diferencia respecto al grupo VEX+TC. $P < 0.05$. ANOVA, Student-Newman-Keuls.

El daño crónico induce un incremento de 3 a 4 veces de colágena hepática para generar cirrosis, en el grupo dañado (VEX+TC) se observó el incremento de casi 4 veces más al ser comparado con el grupo control de controles (VEX+VTC); en cuanto a los grupos control extracto (EX+VTC) y reto (EX+TC) los valores promedio se semejan al grupo control, lo cual sugiere un efecto antifibrótico del extracto durante el daño hepático, impidiendo un depósito fibroso como el encontrado en el grupo dañado ($P < 0.05$), Fig.17.

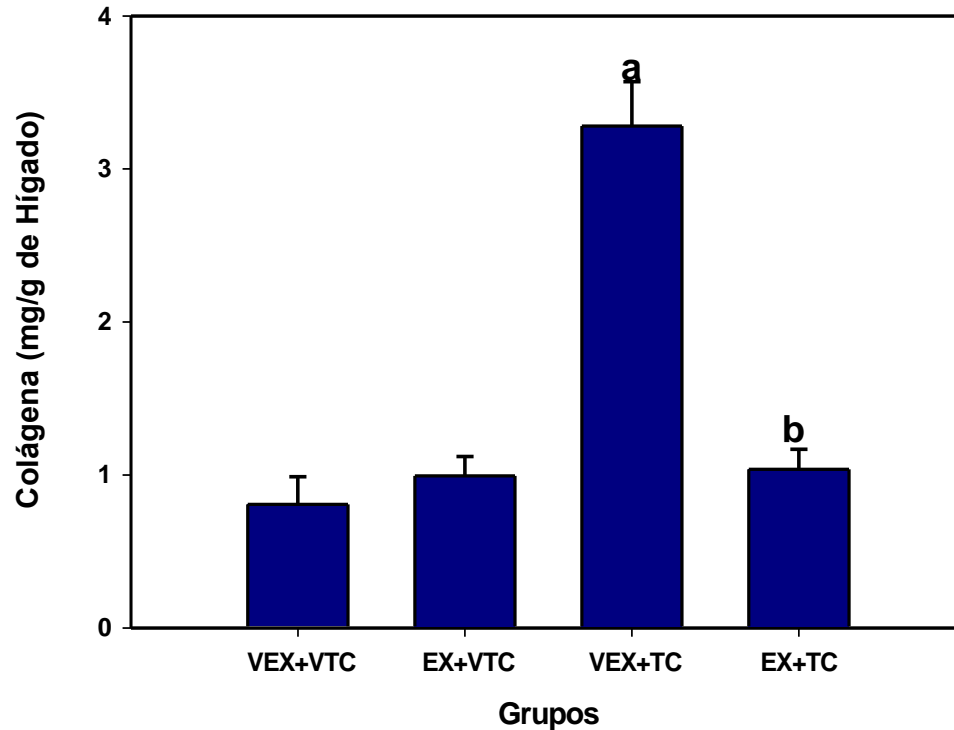


Fig. 17. Cantidad de colágena hepática, cada barra representa el promedio de cada grupo experimental \pm EE, con una n que va de 8 a 16 animales, (a) representa la diferencia con respecto al grupo VEX+VTC y (b) la diferencia respecto al grupo VEX+TC. $P < 0.05$. ANOVA, Student-Newman-Keuls.

Las citocinas están involucradas en el daño hepático y en la cirrosis, y sus niveles elevados indican la evolución de dicha enfermedad. Las concentraciones de la citocina proinflamatoria TNF- α , (Fig.18), no presentaron ninguna diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre los grupos experimentales, es decir, que ni el daño con TC, ni la administración del extracto modificaron importantemente los niveles plasmáticos de esta proteína.

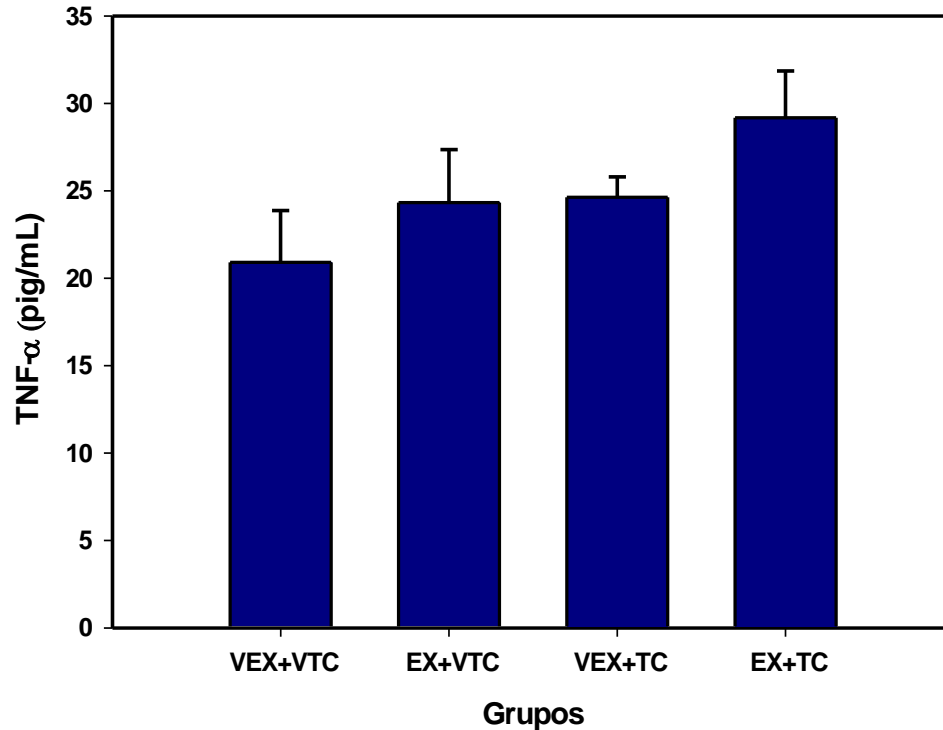


Fig. 18. Niveles plasmáticos de TNF- α , cada barra representa el promedio de cada grupo experimental \pm EE, con una n que va de 8 a 16 animales. No se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. $P < 0.05$. ANOVA, Student-Newman-Keuls.

Como se observa en el Fig. 19, los niveles plasmáticos de la citocina antiinflamatoria IL-10, no mostraron cambios significativos con la mayoría de los diferentes tratamientos, sin embargo, hubo una disminución ligera pero significativa de esta citocina en el grupo control de extracto (EX+VTC); por lo tanto, no se evidenció alguna alteración inducida por el daño (EX+TC) sobre el nivel de la IL-10.

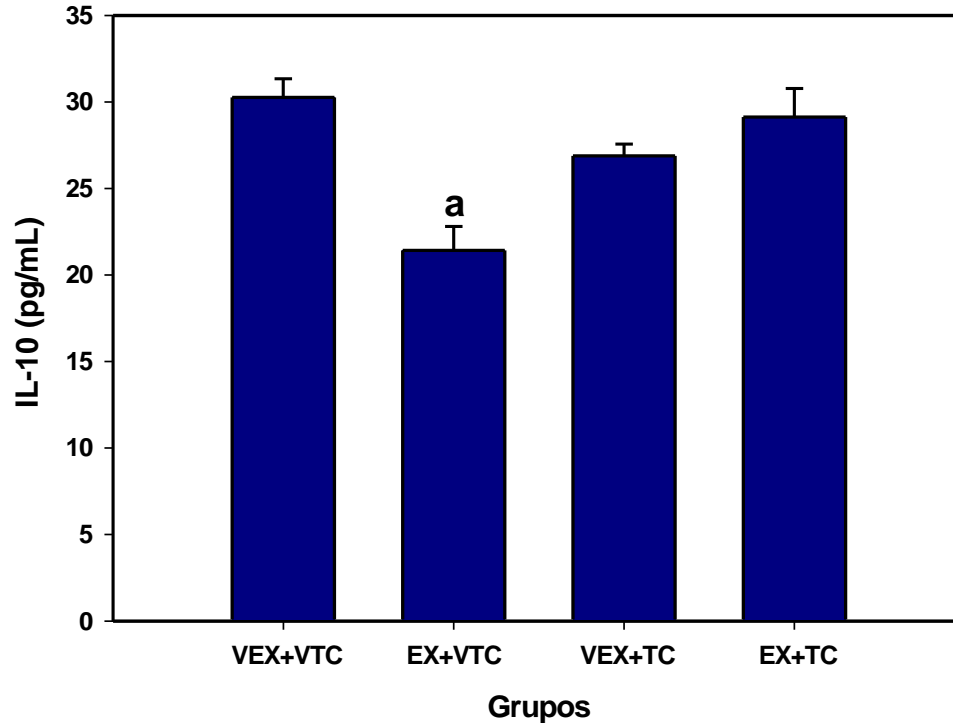


Fig. 19. Niveles plasmáticos de IL-10, cada barra representa el promedio de cada grupo experimental \pm EE, con una n que va de 8 a 16 animales (a) Representa la diferencia con respecto al grupo VEX+VTC. $P < 0.05$. ANOVA, Student-Newman-Keuls.

Cabe mencionar, que en los grupos control de controles, control extracto y grupo reto no murió ningún animal, durante el tratamiento de ocho semanas; en donde se presentó la muerte de ejemplares fue en el grupo dañado con el agente hepatotóxico CCl_4 , lo que descarta un efecto tóxico suficiente para matar al animal del extracto *per se*. Al igual que se reprodujo la cirrosis experimental al observar los aumentos existentes en el grupo dañado en los marcadores y la depleción de glucógeno hepático.

La tinción de hematoxilina/eosina, mostró cambios encontrados entre los grupos experimentales, en el grupo control de controles (VEX+VTC), se observa el tejido uniforme alrededor de la vena central (VC) y visiblemente sano. El grupo control extracto (EX+VTC), muestra el tejido homogéneo y una estructura normal de los hepatocitos. Sin embargo el grupo dañado (VEX+TC), presenta degeneración balonizante y, como consecuencia muerte celular o necrosis balonizante, así como

zonas con vacuolización importante y zonas con tumefacción y picnosis nuclear; mientras que en el grupo tratado (EX+TC), se observa una protección respecto a la necrosis y la vacuolización, aunque se observan algunos hepatocitos con vacuolas dentro de ellos, con ligera extracción citoplasmática de una pequeña porción de los hepatocitos, la zona que rodea a la vena central se encuentra uniforme y aparentemente sana (Fig. 20).

Los cambios en los grupos experimentales que resultaron al realizar la tinción tricrómica de Masson, se observan en la Fig. 21, en donde el grupo control de controles (VEX+VTC), presenta una zona homogénea alrededor de la vena central, en el grupo control de extracto se ve el tejido uniforme con pequeñas vacuolas dentro de algunos hepatocitos; sin embargo, en el grupo dañado (VEX+TC), se observa degeneración balonizante y como consecuencia necrosis balonizante también alrededor de la vena central y una acumulación de colágena notable que se presenta en un tono oscuro negro azulado, así como zonas de vacuolización e inflamación y picnosis nuclear. En el grupo reto (EX+TC), también se observa una deposición de colágena ligera y evidentemente mucho menor a la que presenta el grupo dañado, al igual que una leve necrosis alrededor de la vena central y ligera extracción citoplasmática, pero el resto del tejido se aprecia uniforme, lo cual indica protección del tejido.

En el Cuadro 3, se resumen los resultados de los marcadores bioquímicos de daño y funcionalidad hepáticos obtenidos en este estudio.

Cuadro 3. Resultados de los marcadores bioquímicos.

	VEX+VTC	EX+VTC	VEX+TC	EX+TC
FA ($\mu\text{mol/L.min}$)	274.273	301.517	422.850	333.259
GGTP ($\mu\text{mol/L.min}$)	10.254	11.060	15.377	9.532
BT ($\mu\text{mol/L}$)	1.156	1.424	2.704	1.736
ALT ($\mu\text{mol/L.min}$)	20.860	22.831	41.808	22.823
Peroxidación Lipídica (nmolMDA/g de prot.)	0.338	0.646	1.734	0.725
Glucógeno (g/100 de Híg.)	6.680	6.252	1.587	3.995
Colágena (mg/g de Híg)	0.808	0.993	3.28	1.037
TNF-α (pig/mL)	20.909	24.326	24.636	29.175
IL-10 (pig/mL)	30.265	21.420	26.889	29.122

8. DISCUSIÓN.

En el trabajo presente, fueron examinadas diversas pruebas hepáticas, como indicadores de daño y funcionalidad del hígado que se utilizaron como parámetros para evaluar la respuesta al tratamiento con el extracto hexánico de la inflorescencia de *C.ehrenbergii* (Asteraceae), durante el desarrollo de la cirrosis inducida con CCl₄ en rata y cuyos resultados obtenidos coinciden con la mayoría de los antecedentes descritos, ya que se observó la disminución de dichos indicadores de daño y funcionalidad, así como también se mantuvo parcialmente la cantidad de glucógeno hepático, mismos que se discutirán más adelante.

Varias especies del género *Cirsium* se utilizan como hepatoprotectores en la medicina tradicional Oriental y se han realizado estudios farmacológicos para comprobar estas propiedades, con distintos modelos animales experimentales de daño; por ejemplo, el extracto metanólico de *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* del cual aislaron el compuesto hispidulin 7-O-neoesperidósido, mostró tener efecto hepatoprotector ante el daño hepático crónico inducido con etanol, en rata (Park *et al.*, 2004). Los extractos alcohólicos de la raíz y la hojas de *Cirsium setidens* protegieron del daño agudo inducido con TC en rata (Lee *et al.*, 2008). El extracto acuoso de raíces y hojas de *Cirsium arisanense* protegió a células Hep-3B y a ratones del daño hepático crónico por tacrina (Ku *et al.*, 2008). Los compuestos aislados de *Cirsium setidens*, redujeron la necrosis por D-galactosamina en un modelo de daño hepático agudo en rata (Yoo *et al.*, 2008). Por lo que se decidió estudiar a otra especie del mismo género encontrada en el Estado de Hidalgo, tal es el caso del *Cirsium ehrenbergii* el cual es usado en la medicina tradicional del centro del país para el tratamiento de enfermedades de sistema respiratorio y circulatorio, en el caso de la hipertensión e incluso como antihemorrágico (Argueta-Villamar *et al.*, 1994), y del cual Jimenez-Santana (2010), dio como antecedente directo el efecto hepatoprotector de los extractos hexánicos de las inflorescencias de *Cirsium ehrenbergii* y *vulgare* en un modelo de daño hepático agudo inducido con CCl₄ en rata.

En el caso de los marcadores de colestasis, como lo son la determinación de la actividad enzimática de FA y GGTP, así como la concentración de bilirrubinas totales; la

actividad enzimática en ambos marcadores, tuvo un resultado similar ya que en las dos se redujo notablemente dicha actividad en el grupo tratado con extracto en comparación al grupo dañado y en el caso de la concentración de bilirrubinas totales se apreció un efecto parecido por lo cual se corroboró el efecto anticoléstatco del extracto. En otros trabajos en los cuales también se presentó un efecto anticoléstatco se usaron diversos modelos experimentales de daño; por ejemplo, Jiménez-Santana (2010), en un modelo de daño hepático agudo inducido con CCl_4 obtuvo resultados similares en estos marcadores, ya que la actividad enzimática de FA y GGTP disminuyeron en los grupos tratados con los extractos no polares (hexánicos) de *C. ehrenbergii* y *C. vulgare* en dosis de 250 y 500 mg/kg en comparación al grupo dañado con TC, trabajo en el cual se usa el mismo agente hepatotóxico, con la variante del tiempo y la dosis de administración que en el caso del presente trabajo fue un modelo crónico y una dosis de 400mg/kg. En estudios realizados también usando extractos vegetales obtenidos de las hojas del boldo (*Peumus boldus*) se evidenciaron sus propiedades coleréticas y colagogas en el daño agudo inducido con paracetamol en rata; el boldo además se considera como un estimulante y protector hepático frente a diversos agentes potencialmente nocivos; sus propiedades radican en los componentes químicos, los cuales incluyen aceites esenciales ricos en monoterpenos oxigenados como ascaridol, cineol o eucaliptol, linalol, entre otros, y alcaloides isoquinoleínicos como aporfina y principalmente boldina (Ochoa *et al.*, 2008). Lo que lleva a pensar que posiblemente en el *C.ehrenbergii*, se encuentren propiedades coleréticas y colagogas que estimulan la secreción biliar, debido a que puede contener compuestos como los alcaloides encontrados en las hojas del boldo y a los cuales esta planta le debe sus propiedades. En un modelo de daño hepático agudo inducido con TC y cuyo tratamiento consistió en la administración del extracto metanólico de *Trichosanthes cucumericna var cucumerina* L. (*Cucurbitaceae*) también se comprobó el efecto anticoléstatco de este extracto al observar la disminución de FA y GGTP en los grupos administrados con 2 dosis de extracto (250 mg/kg y otra de 500 mg/kg) con respecto al grupo dañado (Sathesh-Kumar *et al.*, 2009). Resultados similares se obtuvieron en el trabajo presente en el que se evidenció un descenso significativo de los valores promedio de la actividad

enzimática de ambas enzimas (FA y GGTP), por lo que los compuestos encontrados en la inflorescencia *C. erhenbergii*, puedan poseer un efecto anticolestático.

Otro indicador de colestasis importante es la concentración de bilirrubinas totales, que también expresan la funcionalidad hepática, ya que un incremento de éstas señala la sobreproducción, regurgitación y alteraciones en su capacidad de excreción. Durante el daño hepático una concentración alta de TNF- α inhibe a los transportadores biliares de la membrana canalicular de los hepatocitos, disminuyendo el intercambio de materiales entre los conductos biliares y el plasma (Green *et al.*, 1996; Moseley *et al.*, 1996), lo que desarrolla la colestasis intrahepática. El compuesto vegetal kutkina, extraído de *Picrorhiza kurroa* ha sido investigado ampliamente por su actividad hepatoprotectora al presentar efectos anticolestáticos y antioxidantes, así como actividad inmunomoduladora. Esto debido a sus componentes entre los que se encuentran la apocinina, la cucurbitacina y diversos glucósidos, por lo que *Picrorhiza kurroa*, posee un efecto anticolestático ya que sus compuestos tienen mecanismos de acción colerética, propician el aumento de sales biliares y el flujo de ácidos biliares, incluso aún más potentes que los de la silimarina (Monografía, 2001), y cuya estructura, puede presentar similitudes a los compuestos que se encuentran en algunas especies del género *Cirsium*, como el hispidulin 7-O-neohesperidósido del *C.japonicum*, compuestos similares posiblemente puedan encontrarse en el *C.ehrenbergii*.

ALT es una enzima encontrada en el citosol de los hepatocitos y un aumento de esta enzima en el plasma sanguíneo refleja una mayor permeabilidad de la membrana plasmática, asociada con muerte celular (Muriel, 1998), además de permitir la salida de esta enzima hacia la sangre (Álvarez-Amezcu, 2004). En varias enfermedades hepáticas se observa un incremento de esta enzima (Porth, 2006). En un estudio realizado con romero (*Rosmarinus officinalis*) se observó que la actividad enzimática de ALT en animales cirróticos con CCl₄ se elevó considerablemente, mientras que los que recibieron el tratamiento con romero tuvieron una recuperación de alteraciones observadas en la cirrosis, sugiriendo además una participación en la integridad membranal del hepatocito (Álvarez-Amezcu, 1994), en la evaluación de ALT en el trabajo presente, su actividad enzimática incrementó en el grupo dañado con CCl₄ y

disminuyó en el grupo tratado con lo que nos indica un efecto antinecrótico del *C. ehrenbergii*, similar al que presentó el extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* en el que utilizaron el mismo agente hepatotóxico. El efecto hepatoprotector del extracto de *C. ehrenbergii* podría inhibir el exceso de radicales libres, inflamación y daño colestático lo que pudo tal vez detener la necrosis crónicamente al igual que el *Cirsium setidens* Nakai sobre el daño agudo inducido con TC, por lo que se siguen atribuyendo propiedades hepatoprotectoras antinecróticas al género *Cirsium* (Lee *et al.*, 2008) y del mismo *C. setidens*, los compuestos aislados pectolarina y pectolaringenina al ser evaluados presentaron una disminución significativa de ALT en comparación con el grupo dañado con D-galactosamina (Yoo *et al.*, 2008).

La cuantificación de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico es un indicador del grado de peroxidación lipídica celular hepática. La peroxidación lipídica es el proceso por el cual las membranas son destruidas por radicales libres reactivos, lo cual es una de las consecuencias más evidentes en modelos de daño con TC, que también permite valorar el grado de estrés oxidativo presente (Recknagel *et al.*, 1989). Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que probablemente los compuestos del extracto hexánico de la inflorescencia de *C. ehrenbergii* tengan capacidad atrapadora de radicales libres y por lo tanto un efecto antioxidante. En el estudio realizado por Yoo y colaboradores (2008), en el que aislaron los compuestos pectolarina y pectolaringenina de los extractos metanólico y butanólico de *Cirsium setidens* y que evaluaron en un modelo de daño hepático agudo inducido con D-galactosamina, al medir el grado de lipoperoxidación este mostró una reducción significativa en los grupos administrados con ambos extractos. Otro estudio realizado por Park y colaboradores (2004), en el cual se evaluaron los efectos del extracto metanólico de *Cirsium japonicum var ussuriense* en el metabolismo del alcohol, se obtuvo una elevación en la peroxidación lipídica por el tratamiento con etanol, mientras que la ingestión oral del extracto, protegió al hígado contra la peroxidación. Esto se debe especialmente por su compuesto hispidulin-7-O-neoheperidósido con efectos benéficos antioxidantes (Park *et al.*, 2004). Lo cual se asemeja a los resultados obtenidos, corroborando una acción antioxidante del extracto hexánico floral de *C. ehrenbergii*, que podría contener ese tipo

de flavonoides; los flavonoides son compuestos atrapadores de radicales libres y, por lo tanto, antioxidantes (Argueta-Villamar *et al.*, 1994).

Como se sabe el glucógeno es una fuente muy importante de energía en el organismo y es crucial para regular el nivel de glucosa en el plasma sanguíneo. Se ha reportado que la administración crónica de TC induce alteraciones en las membranas de los hepatocitos, por lo cual aumenta el contenido de colesterol y el contenido de AMPc y esto a su vez produce un descenso en el contenido de glucógeno hepático (Muriel, 1998). En la cirrosis experimental existe una disminución en el contenido de glucógeno hepático, lo cual es evidente al observar las diferencias entre los distintos grupos experimentales, los resultados muestran niveles parecidos en el grupo control de controles y en el control de extracto, mientras que en el grupo cirrótico se observa una disminución significativa, en contraste, en el grupo reto se ve una mejor conservación de la cantidad de glucógeno hepático en comparación con el dañado. Por lo que el extracto de la inflorescencia de *C. ehrenbergii* podría actuar en los procesos bioquímicos que participan en la estabilización de esta función metabólica. De acuerdo con Jiménez-Santana (2010), en un modelo de daño hepático agudo inducido con TC, se determinó que la disminución del glucógeno se interpreta como la existencia de un padecimiento hepático y estrés, ya que en el grupo dañado los niveles de glucógeno fueron casi depletados en comparación con las condiciones normales, lo que confirma que, efectivamente, durante la existencia de algún tipo de daño al hígado el glucógeno decae debido al desgaste de energía. Lo que lleva a apoyar la idea de que los metabolitos secundarios menos polares del extracto hexánico de la inflorescencia de *C. ehrenbergii* pudieron haber prevenido el descenso en la cantidad del glucógeno en el estudio realizado.

Las lesiones crónicas en el hígado conducen a la fibrosis, algunos agentes etiológicos de estas lesiones son la hepatitis viral, el abuso en el consumo del alcohol, los fármacos y algunas enfermedades metabólicas en las que existe un incremento de hierro o de cobre o anomalías congénitas. Como ya se mencionó en la Introducción, la fibrosis se presenta como una antesala de la cirrosis hepática y es causada principalmente por el exceso de matriz extracelular y colágena (Friedman, 2000).

Debido a que la colágena es el componente principal en la fibrosis, en este estudio se evaluó como parámetro para determinar el grado de fibrosis hepática. Los resultados obtenidos fueron favorables, ya que el extracto hexánico de la inflorescencia de *C. ehrenbergii*, logró abolir el incremento de fibrosis del grupo reto presentando un valor similar al del grupo control de controles y control extracto, lo que indica un efecto antifibrótico del extracto, resultados similares se obtuvieron en el estudio de Álvarez-Amezcuca (1994), en el que se evaluó la modificación del curso de la cirrosis experimental con extractos acuosos de romero (*Rosmarinus officinalis*) en donde la colágena presentó un incremento del 267% en el grupo dañado con CCl₄ comparada con el valor del grupo control, mientras que el grupo tratado con romero, incrementó en 114% respecto al grupo control lo que mostró una protección parcial del daño, impidiendo un depósito fibroso de la magnitud encontrada en los animales cirróticos. Por lo que se podría pensar que algunos compuestos encontrados en *Rosmarinus officinalis* y que le dan la capacidad antifibrótica, podrían también estar presentes en el extracto hexánico de la inflorescencia de *C. ehrenbergii*. Componentes de la matriz extracelular del hígado regulan la proliferación celular y la producción de la matriz extracelular, cuando algún mecanismo de regulación se altera, el organismo intenta mantener la homeostasis y produce una variedad de factores y citocinas, las citocinas circulantes inducen la producción y liberación de más citocinas y factores de crecimiento hepáticos y células inflamatorias (Fernández-Martínez, 2004). Durante el daño inducido con TC una consideración importante es que cuando el daño es masivo y agudo existe destrucción de un gran número de hepatocitos, esta pérdida súbita del parénquima funcional estimula la regeneración hepática, dicho proceso es coordinado e incluye regeneración celular y degradación de colágena, dando lugar a una remodelación del tejido, en estos casos, no es común encontrar tejido cicatricial en el hígado lo que indica que ha predominado el proceso de regeneración. Cuando el daño se presenta de manera crónica, ya sea por la presencia del agente inductor o porque se estimulen mecanismos inmunológicos en donde se involucran las citocinas que perpetúan la enfermedad, el proceso cicatricial continúa, produciéndose primero fibrosis y posteriormente cirrosis hepática. En estas condiciones y a pesar de haberse iniciado un fenómeno de regeneración hepática, esta última es mínima o inexistente y el

fenómeno cicatricial es el predominante (Álvarez-Amezcuá, 1994). Dentro de la cascada de mecanismos involucrados en el daño hepático se encuentra el daño a los hepatocitos, en el cual podemos distinguir como causas principales la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que causan la peroxidación lipídica y provocan un aumento en el estrés oxidativo, al igual que en la necrosis. Debido a la generación de las ROS se da la activación de células de Kupffer que a su vez producen un incremento de ROS y de citocinas proinflamatorias que producen aún más peroxidación lipídica; en consecuencia, las citocinas liberadas activan a las células estelares hepáticas que una vez activas causan la deposición de colágena en exceso y si este proceso se vuelve crónico se desarrolla la fibrosis hepática (Friedman, 2000)

En los seres humanos, las citocinas son una pieza clave en la fisiología hepática de dos procesos opuestos: el establecimiento y la progresión de lesiones que conducen a la fase final de la cirrosis, así como el curso de la regeneración (Simpson *et al.*, 1997; Bradham *et al.*, 1998). Existe un desequilibrio entre las citocinas pro y antiinflamatorias y pro y antifibróticas en las hepatopatías, las concentraciones séricas del TNF- α , IL-6 y 1β e INF- γ , se encuentran elevados en pacientes con enfermedades hepáticas crónicas (Tilg *et al.*, 1992). La expresión génica de las citocinas proinflamatorias como TNF- α aumenta en el tejido hepático y esto depende de la enfermedad crónica de los pacientes cirróticos y no cirróticos (Llorente *et al.*, 1996). El daño hepático progresivo de la infección crónica por hepatitis C se correlaciona con la expresión intrahepática elevada del IFN- γ y la disminución de la expresión de la citocina antiinflamatoria y antifibrótica IL-10 (Napoli *et al.*, 1996).

El TNF- α es un péptido mediador liberado por los monocitos y macrófagos en respuesta a varios estímulos y la citocina que actúa como su antagónica es IL-10, la cual específicamente en roedores regula a la baja la síntesis de citocinas proinflamatorias como TNF- α (Fernández-Martínez, 2004). Los resultados obtenidos en este estudio no evidenciaron un efecto inmunomodulador del extracto hexánico de la inflorescencia de *C. ehrenbergii* pues en el caso de la citocina TNF- α no se observó diferencia estadísticamente significativa entre ninguno de los grupos experimentales, mientras que

en la citocina IL-10, se observó una disminución ligera pero significativa en los niveles plasmáticos del grupo control de extracto y ninguna diferencia entre los grupos experimentales restantes. En un modelo de daño crónico con ratones inducido por CCl₄ los fueron incapaces de producir IL-10, probablemente por el estado disfuncional del órgano, al valorar la expresión génica mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), al mismo tiempo existió un aumento importante en la producción de TNF- α en el daño con CCl₄ (Thompson *et al.*, 1998).

Hsieh y colaboradores (2011), realizaron un trabajo, para estudiar los cambios en los niveles de citocinas y la progresión del daño hepático durante 10 semanas, en ratas con ligadura de conducto biliar común (LCBC), para el cual determinaron la concentración de las citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10 y TGF- β en suero y en hígado. Los niveles en suero de TNF- α , en el grupo con LCBC, aumentaron gradualmente llegando a su máximo en la semana 6 y luego descendieron hasta el nivel basal hacia las últimas semanas, los niveles de IL-10 aumentaron progresivamente después de la LCBC mientras que en la semana 8 comenzaron a decrecer estos niveles, lo que indica que posterior al aumento de TNF- α , surge un incremento de IL-10, para contrarrestar el daño, antes de la semana 8. En el estudio de Hsieh *et al.*, los niveles plasmáticos de las citocinas, se observaron en cada semana, durante las 10 semanas que duró el estudio, mientras que para el trabajo presente se tomó una única muestra a las 8 semanas, cuando terminó el tratamiento, por lo que pudo haber existido un aumento de TNF- α en el grupo dañado y una disminución en el grupo tratado y viceversa, lo que impidió ver si existió una inmunomodulación con el extracto en un curso temporal, y no se observaron las fluctuaciones presentes en el estudio de Hsieh en el que tomaron una muestra cada semana. Se sugiere que al no presentarse la inmunomodulación, predominarían los mecanismos antioxidantes propios del género *Cirsium* antes mencionados.

DeCicco y colaboradores (1998) realizaron otro estudio en el que se les administró a las ratas una dosis única de CCl₄ (0.2 ml/kg), y en el que los animales de experimentación fueron sacrificados al tiempo 0, a las 2, 4, 12 y 24 h, donde se observó que las citocinas proinflamatorias de respuesta temprana pueden activar otras células hepáticas como las células endoteliales, y las células estelares en solo unas horas. El TNF- α puede

inducir la necrosis y la apoptosis de los hepatocitos, el daño celular también puede ser mediado por mecanismos de radicales libres. Respecto a lo observado por DeCicco y colaboradores, en el que se ven los resultados del daño por CCl₄ después de pocas horas de su administración, los resultados que se obtuvieron en el trabajo presente, el grupo en el que se administró CCl₄ de manera crónica presentó; una elevación en la enzimas hepáticas, en las bilirrubinas totales, en la colágena, y en la peroxidación lipídica, así como la depleción en la cantidad de glucógeno hepático, por lo que se puede decir que si se estableció un daño hepático crónico, el cual emula la cirrosis hepática.

En los animales con cirrosis inducida con TC se presentan diversas manifestaciones en forma semejante a la cirrosis humana. La hiperactividad adrenérgica presente podría ser responsable de muchos efectos, algunos resultantes de la estimulación de la adenilato ciclasa, lo cual incrementa los niveles de monofosfato cíclico de adenosina o AMPc (Álvarez- Amezcua, 1994). Los mecanismos de hepatotoxicidad inducida por CCl₄ se han investigado extensamente, principalmente por la bioactivación de intermediarios reactivos, que actúan en el metabolismo reductivo por el sistema del citocromo P450, esto lo hace que el radical triclorometilo genere una variedad de metabolitos secundarios incluyendo el radical peróxido altamente reactivo, este se produce en presencia de oxígeno y da lugar a la peroxidación lipídica. También existe una iniciación del proceso inflamatorio por la activación de las células de Kupffer las cuales son capaces de liberar una serie de mediadores inflamatorios incluyendo las citocinas de respuesta temprana como TNF- α , que pueden activar otras células hepáticas como las células endoteliales, y las células estelares (DeCicco *et al.*, 1998).

La tinción de hematoxilina/eosina permite observar el núcleo de los hepatocitos en color azul y el citoplasma en color rosa (Geneser, 2008), esta tinción apoya los resultados de los indicadores bioquímicos ya que se observó la necrosis y vacuolización en el grupo dañado y como se presentó un menor daño en el grupo tratado con extracto. La tinción tricrómica de Masson, es una técnica para la coloración de fibras colágenas y elásticas. Se observan tres colores distintos; tejido conjuntivo de verde, tejido muscular de verde pardo, eritrocitos en un tono rojizo, núcleos azul negro y citoplasma y fibras musculares

de color rosa pardo, esta técnica se usa para identificar incrementos en la colágena hepática en enfermedades como la cirrosis (Álvarez-Amezcu, 1994). Al observar los resultados de esta tinción, en el grupo dañado se observa la acumulación de colágena, aunque no en forma de bandas, se aprecian manchones considerables de un tono oscuro negro azulado, y la degeneración balonizante que no se presenta en los demás grupos experimentales, de manera que estos resultados histológicos sirven como apoyo a los resultados bioquímicos, los cuales indican hepatoprotección del extracto hexánico floral del *C. erhenbergii* en un modelo de cirrosis experimental en rata. Esto se podría atribuir a los compuestos fenólicos con posible capacidad atrapadora de radicales libres presentes en el extracto hexánico floral del *C. erhenbergii*. Tales compuestos a pesar de su polaridad media podrían haber sido extraídos en el reflujo hexánico por el tiempo de extracción (9 h) y la materia orgánica con un tamaño de partícula reducido a la temperatura de 60 °C. Esto se sugiere ya que a pesar que en otros estudios se realizaron extractos muy polares y se obtuvieron gliconas (flavonoides glicosilados), en éste tal vez se extrajeron agliconas de menor polaridad pero con actividad antioxidante.

9. CONCLUSIONES.

Al término de este trabajo se evidenció el efecto hepatoprotector del extracto hexánico de la inflorescencia de *Cirsium ehrenbergii* en un modelo de cirrosis experimental por CCl₄, en rata.

Se reprodujo el modelo de cirrosis hepática por CCl₄ en ratas, al observar una elevación estadísticamente significativa ($P < 0.05$), en las enzimas hepáticas, las bilirrubinas totales, el grado de peroxidación lipídica y la colágena, así como, la depleción en la cantidad de glucógeno hepático en el grupo dañado con CCl₄.

Con la administración crónica del extracto hexánico de la inflorescencia de *C. ehrenbergii* a ratas normales se halló que éste no genera efectos adversos *per se*, y en ratas cirróticas se observó una disminución de los marcadores bioquímicos de daño hepático de colestasis, necrosis, estrés oxidativo y fibrosis, así como el incremento del glucógeno hepático.

No se evidenció un efecto inmunomodulador del extracto ya que los niveles plasmáticos de la citocina proinflamatoria TNF- α , no presentaron ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. En el caso de la citocina antiinflamatoria IL-10, hubo una disminución ligera pero significativa en el grupo control del extracto, con respecto a los demás grupos experimentales. Por lo que se sugiere que el mecanismo de acción del extracto es netamente antioxidante.

En general los resultados muestran el efecto benéfico del extracto hexánico de la inflorescencia de *C. ehrenbergii*, en el tratamiento de la cirrosis hepática ya que se observó la prevención del daño hepático con la mayoría de los marcadores bioquímicos, siendo este estudio una aportación al conocimiento etnobotánico, evidenciando las propiedades de una planta de uso tradicional mediante su estudio farmacológico; por lo que la continuidad en este tipo de investigaciones podría propiciar una mejoría en la calidad de vida de los pacientes con cirrosis en un futuro.

10. GLOSARIO.

Actividad adrenérgica. Actividad del sistema nervioso simpático en todo el organismo.

Alcaloide. Son aquellos metabolitos secundarios de las plantas sintetizados, generalmente a partir de aminoácidos, que tienen en común su hidrosolubilidad a pH ácido y su solubilidad en solventes orgánicos a pH alcalino. Los alcaloides verdaderos derivan de un aminoácido y todos contienen nitrógeno.

α -Cetoácido. Es un tipo de cetoácido que contiene un grupo funcional cetona adyacente al carbono de un grupo funcional carboxilo. El ácido alfa-ceto más característico es el ácido pirúvico, producto de la reacción de la glucólisis. Otro ejemplo es el α -cetoglutarato, un compuesto del ciclo de Krebs. El nombre de 'alfa' proviene de la nomenclatura según la cual el carbono del grupo carboxilo se toma como referencia. El carbono adyacente se denomina carbono α , el siguiente carbono β , y así sucesivamente. En los ácidos alfa-ceto, el grupo cetona está en el carbono α , el segundo carbono si contamos el del carboxilo.

Catecolaminas (también llamadas neurohormonas o aminohormonas). Son neurotransmisores que se vierten al torrente sanguíneo (en lugar de las hendiduras sinápticas, como corresponde normalmente a los neurotransmisores). Son un grupo de sustancias que incluyen la adrenalina, la noradrenalina y la dopamina, las cuales son sintetizadas a partir del aminoácido tirosina. Contienen un grupo catecol y un grupo amino.

Catequinas o catequinas. Son flavonoides que ayudan a proteger las células del daño causado por radicales libres y son principalmente estudiadas por sus propiedades antioxidantes y antitumorales.

Colagogo. Es un fármaco o extractos de plantas que facilitan la expulsión de la bilis retenida en la vesícula biliar y, casi siempre van acompañados de acción purgante intestinal.

Colerético. Sustancia que activa la producción de la bilis como función hepática.

Concentración. Es la proporción o relación que hay entre la cantidad de soluto en diversas unidades y la cantidad de disolvente en unidades de volumen, donde el soluto es la sustancia que se disuelve, el disolvente la sustancia que disuelve al soluto, y la disolución es el resultado de la mezcla homogénea de las dos anteriores. A menor proporción de soluto disuelto en el disolvente, menos concentrada está la disolución, y a mayor proporción más concentrada ésta.

Degeneración balonizante. Hepatocitos aumentados en volumen con tumefacción citoplasmática, palidez tintorial y aspecto homogéneo.

Disnea. Es la dificultad respiratoria o falta de aire. Es una sensación subjetiva de malestar ocasionado por la respiración que engloba sensaciones cualitativas distintas que varían en intensidad.

Droga alucinógena. Según la Organización Mundial de la Salud una droga alucinógena es toda sustancia que, introducida en el organismo por cualquier vía de administración, puede alterar de algún modo el sistema nervioso central del individuo que las consume.

Dosis. En farmacología es la cantidad de principio activo de un medicamento, expresado en unidades de volumen o masa por unidad de masa (kg) corporal, en función de la presentación, que se administrará.

ELISA. Inmunoensayo acoplado a enzima. Medio sensible de cuantificación de antígeno por la cubierta específica de anticuerpo acoplado a una enzima y puede sintetizarse fácilmente en un producto medible.

Endodermo. Es la capa de tejido más interna de las tres capas en las que se dividen los tejidos del embrión animal o humano.

Esteatosis. Es la acumulación anormal de grasa. Se presentan usualmente en forma de triglicéridos, en el citoplasma de células parenquimatosas, como los hepatocitos.

Flavonoides. (Del latín *flavus*, "amarillo") es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas y a los cuales se atribuyen propiedades gracias a su estructura química y a la capacidad de absorción del oxígeno como radical.

Hipocondrio. Región abdominal superior y lateral, a cada lado de la región epigástrica, sobre y debajo de las últimas costillas o costillas falsas.

Isoforma. Es una versión de una proteína con pequeñas diferencias de otra isoforma de la misma proteína. Se pueden producir diferentes formas de una proteína a partir de genes diferentes pero relacionados entre sí o pueden derivarse del mismo gen por splicing alternativo.

Leucotrienos. Son ácidos grasos derivados del metabolismo oxidativo del ácido araquidónico por la vía de la 5-lipooxigenasa. Deben su nombre al hecho de que originalmente fueron aislados a finales de los años 1970 a partir de los leucocitos y a que contienen tres enlaces dobles conjugados en su estructura hidrocarbonada.

Linfocito. Célula móvil perteneciente a la serie blanca con gran núcleo y escaso citoplasma, realiza múltiples funciones en los mecanismos de defensa inmunitaria se distinguen dos tipos: los T timodependientes y los B dependientes de la Bursa o médula ósea.

Macrófago. Leucocito mononuclear que interviene en la captación transformación y presentación del antígeno a los linfocitos inmunocompetentes y que posee capacidad fagocítica.

Malondialdehído. El malondialdehído se forma por la peroxidación lipídica de ácidos grasos insaturados y es un marcador de la degradación oxidativa de la membrana celular. Subproducto derivado del metabolismo de los lípidos (grasas) en el cuerpo.

Metaloproteinasas. Enzimas que degradan la matriz extracelular. Estas son reguladas por diferentes mecanismos como las TIMP's o proteínas inhibitoras de las metaloproteinasas, que permiten el control de su actividad degradativa extracelular.

Metástasis. Es el movimiento o diseminación de las células cancerosas de un órgano o tejido a otro, por lo general a través del torrente sanguíneo o del sistema linfático. Ya sea que las células cancerosas hagan metástasis o no a otras partes del cuerpo depende de muchos factores como: tipo de cáncer, etapa en la que se encuentra el cáncer y la localización original del cáncer.

Mol. Masa molecular en gramos de un compuesto.

Mononucleosis. Es una infección viral que causa fiebre, dolor de garganta e inflamación de los ganglios linfáticos, especialmente en el cuello. La mononucleosis generalmente está ligada al virus de Epstein-Barr (EBV), pero también puede ser ocasionada por otros microorganismos como el citomegalovirus (CMV).

Monooxigenasas. Son enzimas que incorporan un grupo hidroxilo en sustratos en muchas rutas metabólicas. En esta reacción, dos átomos de dioxígeno son reducidos a un grupo hidroxilo y a una molécula H_2O por la oxidación concomitante de la NAD(P)H.

Necrosis. Muerte celular patológica reconocible por los signos morfológicos como la cariólisis que es la disolución del núcleo; la cariorrexis que es una fragmentación del núcleo en trozos con cromatina condensada y la picnosis.

Necrosis balonizante. Producto de la degeneración balonizante, al cual se le agrega picnosis nuclear.

Picnosis Nuclear. (Del griego *pýknōsis*, “condensación”) es una transformación del núcleo de la célula que consiste en una condensación de la cromatina. El núcleo se vuelve homogéneo y se colorea uniformemente. Este fenómeno se debe a la muerte del núcleo.

Prostaglandinas. Son un conjunto de sustancias de carácter lipídico derivadas de los ácidos grasos de 20 carbonos (eicosanoides), que contienen un anillo ciclopentano y constituyen una familias de mediadores celulares, con efectos diversos, a menudo contrapuestos.

Proteína. Macromolécula compuesta por una o varias cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales tiene una secuencia característica de aminoácidos, unidos por enlaces peptídicos.

Proteoglicano. Proteína unida a un carbohidrato. Es un componente de la matriz extracelular y juega un papel importante en el proceso de la fibrosis.

Sepsis. Es la respuesta inflamatoria sistémica a la infección. El diagnóstico requiere por lo menos dos criterios de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica más un proceso infeccioso evidente.

Sinusoide hepático. La sangre de las ramas terminales de la vasculatura que sale del área portal a través de la placa limitante, irriga una red compleja en forma de espacio vascular llamado sinusoide hepático, los sinusoides hepáticos son capilares que se disponen entre las laminas de los hepatocitos y donde confluyen, desde la periferia de los lobulillos las ramas de la arteria hepática y de la vena porta, la sangre fluye desde las triadas hasta la vena central, circulando en forma centrípeta, la pared de los sinusoides está formada por una capa discontinua de células endoteliales fenestradas, que carecen de membrana basal. En los sinusoides confluyen la circulación hepática y la porta. Estos drenan su contenido a la vena hepática central, de esta a las venas hepáticas derecha e izquierda y finalmente a la vena cava inferior.

Tumefacción. Hinchazón o protuberancia blanda en el cuerpo.

REFERENCIAS.

- Aguilar-Contreras A., Camacho-Pulido J.R., Jacquez-Rios P., López-Villafranco M.E. 1998. Plantas medicinales del Herbario del IMSS, su distribución por enfermedades. Instituto Mexicano del Seguro Social. México. 9-11.
- Alvarez-Amezcuca M.C. 1994. Modificación del curso de la cirrosis experimental con extractos totales de Romero (*Rosmarinus officinalis*). Tesis de Maestría, Universidad de Colima. Colima. 100.
- Argueta- Villamar A., Cano-Asseleih L.M., Rodarte M.E. 1994. Atlas de las Plantas de la medicina tradicional mexicana. Tomo I. Instituto Nacional Indigenista. México. 583.
- Barret, K.E., Boitano S., Barman S.M., Brooks H.L. 2010. Ganong, Fisiología Médica. Vigésimo tercera Edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. 479-487.
- Basmajian J.V. 1977. Anatomía. Séptima Edición. Ed. Interamericana. México. 394.
- BBC, Mundo, Ciencia. Referencia en línea, http://news.bbc.co.uk/hi/spanish/science/newsid_4562000/4562839.stm. (2005, consultado en Enero 2012). Recuperado.
- Berger L., Rudolph G. N. 1963. Alkaline and acid phosphatase en Standard methods of clinical chemistry. (Vol. V): Meites Academic Press. New York. E.U.A. 5673.
- Bergmeyer H. U., Grabl M., Walter H. E. 1983. Capítulo: Enzymes, en: Methods of enzymatic analysis de Bergmeyer H. U y Grabl M., Ed. Verlag-chimie Weinheim, Alemania. 269-270.

- Bhagavan N.V. 1974. Biochemistry, a comprehensive review. Library of congress cataloging in Publication. E.U.A. 916-923.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*; 72: 248-254.
- Bradham C.A. 1998. Mechanisms of hepatic toxicity. En: TNF- α induced liver injury. *Am J Physiol*; 275 (Gastrointest. Liver physiol); 38:387-392.
- Buege J. A., Austin S. D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*; 52: 302-310.
- Calderon de Rzedowski, G., Rzedowski J. 2001. Flora fanerógamica del Valle de México. CONABIO. Instituto de Ecología A. C. Centro Regional del Bajío. Michoacán. México. 1340.
- De Cicco L.A., Rikans L. E., Tutor C.G., Hornbrook K.R. 1998. Serum and liver concentrations of tumor necrosis factor α and interleukin- 1β following administration of carbon tetrachloride to male rats. *Toxicol Lett*; 98:115-121.
- Devlin T.M. 2002. Textbook of Biochemistry with clinical correlations. Quinta edición. Wiley-Liss and John-Wiley and sons INC. publications. Canadá. 526, 527, 818, 819, 1071-1075.
- Farnsworth N.R., Soejarto D.D. 1991. Global importance of medicinal plants. En: Akereke, O., Heywood V.H., Syngé H. (Eds). The conservation of medicinal plants. Cambridge University Press. New York. 25-50.
- Fernández-Martínez T.E. 2004. Síntesis de Análogos de la Talidomida moduladores de citocinas y su evaluación en la cirrosis experimental. Tesis Doctoral. Centro de

- Investigaciones y de Estudios Superiores de Instituto Politecnico Nacional. Seccion Externa de Farmacologia Unidad Zacatenco. México. 143-163.
- Fernández-Martínez E., Díaz-Espinoza R., Villavicencio-Nieto M.A. *et al.*, 2007. Preliminary phytochemical and biological study of *Cirsium ehrenbergii*. Proc West Pharmacol Soc; 50:162-164.
- Foster S., Duke J.A. 1999. Medicinal plants and Herbs. Peterson Fiel Guides. E.U.A. 354.
- Friedman SL. 2000. Molecular regulation of hepatic fibrosis, and integrated cellular response to tissue injury. J Biol Chem; 275:2247-2250.
- Geneser F. 2008. Histología, sobre bases biomoleculares. Tercera edición. Ed. Médica Panamericana. Argentina. 757.
- Glossman M, Neville D. M. 1972. Glutamyl transferase in kidney brush border membranes. FEBS Lett; 19: 340-344.
- Green R.M., Beier M., Gollan J.L., 1996. Regulation of hepatic bile salt transporters by endotoxin and inflammatory cytokines in rodents. Gastroenterol; 111: 193-198.
- Guyton A.C., Hall J.E. 2007. Tratado de fisiología médica. Decimo primera Edición. Ed. Elsevier. España .859-864.
- Herrerías-Gutiérrez J.M., Díaz-Belmont A., Jiménez-Sáenz M. 1996. Tratado de Hepatología. Universidad de Sevilla. España. 1086.
- Holmstedt B.R., Bruhn J.G. 1997. Ethnopharmacology- A Challenge. En: Schultes, R.E. y S. Von Reis. 1997. Ethnobotany and evolution of a dicipline. Discorides Press. Oregon. E.U.A. 414.

- Hsie H.G., Huang H.C., Lee F.Y., Chan C.Y., Lee J.Y., Lee S.D. 2011. Kinetics of cytokine expression in cirrhotic rats. *J Chin Med Assoc*; 74: 385-393.
- limuro, Y., Brenner D.A. 2008. Matrix metalloproteinase gene delivery for liver fibrosis. *Pharm Res*; 25: 249-258.
- Jiménez-Santana M. 2010. Evaluación de las propiedades hepatoprotectoras de los extractos hexánicos florales de *Cirsium vulgare* y *Cirsium ehrenbergii* en un modelo de daño hepático agudo inducido con CCl₄ en rata. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Mineral de la Reforma. 71.
- 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.
- Kountouras J., Billing BH., Schever P.H. 1984. Prolonged bile duct obstruction a new experimental model for cirrhosis in the rats; *Br J Exp Pathol*; 65: 305- 31.
- 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*. Springer Medizin Verlag Heidelberg. Alemania. 906.
- Lee W. B., Kwon H. C., Cho O. R., Lee K. C., Cho 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.

- 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.
- Li M.C., He S.H. 2004. IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*; 10:620-625.
- Linares E., Bye R. R., Flores B. 1999. Plantas medicinales de México. Usos y remedios tradicionales. Universidad Nacional Autónoma de México. Mexico. D.F. 9-15.
- Liu S., Zhang J., Li D., Liu W., Luo X., Zhang R., Li L., Zhao J. 2008. 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.
- Llorente L., Richaud-Patin Y., Alcocer-Castillejos N., Ruiz-Soto R. 1996. Cytokine gene expression in cirrhotic and non-cirrhotic human liver. *J Hepatol*; 24:555-563.
- Méndez-Sánchez N., Guevara-Gonzalez L., Uribe-Ezquivel M. 2001. Capítulo 5: Pruebas de laboratorio e imagen en Gastroenterología y Hepatología de Méndez-Sánchez, N., Guevara-Gonzalez L., Uribe-Ezquivel M. Manual moderno México, D.F. 22-24.
- Méndez-Sánchez N., Uribe M. 2003. Conceptos Actuales en Hepatología. Editorial. Masson Doyma. Mexico D.F. 475.

- Moseley R.H., Wang W., Takeda H. *et al.* 1996. Effect of endotoxin on bile acid transport in rat liver. *Am J Physiol*; 34:137-146.
- Monografía. Sin autores. 2001. *Picrorhiza kurroa*. *Altern Med Rev*; 6:319-321.
- Muriel P. 1997. Capítulo 14: Peroxidation of lipids and liver damage en oxidants, antioxidants and free radicals en Baskin S.I., Salem H. Ed. Taylor and Francis, Pennsylvania.
- Muriel P. 1998. Nitric oxide protection of rat liver from lipid peroxidation, collagen accumulation, and liver damage induced by carbón tetrachloride. *Biol Pharm*; 56: 773-339.
- Muriel P. 2003. Capítulo 8: Farmacología hepática experimental en: Conceptos actuales en hepatología de Méndez-Sánchez N., Uribe M. Masson Doyma, México, D. F. 63-67.
- Muriel, P., Rivera-Espinoza. 2008. Beneficial drugs for liver diseases. *J App Toxicol*; 28: 93-103.
- Napoli J., Bishop G.A., Meguinness P.H., *et al.* 1996. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th 1-associated cytokines. *Hepato*; 24: 759-765.
- Nazaruk, J., Jaconiuk P. 2005. Flavonoid composition and antimicrobial activity of *Cirsium rivulare* (Jacq.) All. flowers. *J Ethnopharmacol*; 102: 208-212.
- Nelson D.R., Lauwers G.Y., Lau J.N., Davis G.L. 2000. Interleukin-10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders. *Gastroenterol*; 118:655-660.

- Núñez C.E. 2007. Etracciones con equipo Soxhelt. Referencia en línea, <http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-ExtraccinconequipoSoxhlet.pdf> (2007, consultado en Mayo del 2010). Recuperado.
- Ochoa C., C. Granda., M. Chapoñan., R. Borja., P. Borjar., J. Ortiz., G. Ugaz., E. Puerta. Y M. Pucutay. 2008. Efecto Protector de *Peumus boldus* en ratas con toxicidad hepática inducida por paracetamol. *Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana*; 13:20-25.
- OMS, Serie de informes técnicos. Referencia en línea, http://www.who.int/substance_abuse/expert_committee_alcohol_trs944_spanish.pdf (2007, consultado en Enero del 2012). Recuperado.
- Park J.C., Hur J. M., Park J. G., Kim S. C., Park J. R., Choi S. H., Choi J. W. 2004. Effects of methanol extract of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* and its principle, hispidulin-7-O-neohesperidoside on hepatic alcohol-metabolizing enzymes and lipid peroxidation in ethanol-treated rats. *Phytother Res*; 18:19-24.
- Pérez-Álvarez V. 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.). Masson Doyma. México, D. F. 53.
- Pérez-Escandón B.E., Villavicencio-Nieto M.A., Ramírez-Aguirre A. 2003. Lista de las plantas útiles del estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.133.
- Pérez-Gutiérrez R. M., Ramírez E., Vargas R. 2001. Effect of *Cirsium pascuarens* on blood glucose levels of normoglycaemic and Alloxan-diabetic mice. *Phytother Res*; 15: 552-554.

- Pérez-Tamayo R., López-Corella E. 2007. Principios de Patología. Cuarta Edición. Ed. Médica Panamericana. México. 206-220.
- Porth C.M. 2006. Fisiopatología, salud-enfermedad: un enfoque conceptual. Séptima Edición. Ed. Médica Panamericana. Argentina. 917-946.
- 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. A. 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. 3 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. 45-49.
- Robbins S.L., Cotran R., Kumar V. 1995. Patología estructural y funcional. Quinta Edición. Ed. Interamericana, McGraw-Hill. Madrid, España. 1486.
- Rojkind M., Gonzalez E. 1974. An improved method for determining special radioactivities of proline and hydroxyproline. *Anal Biochem*; 57:1-7.
- Rzedowski J. 1978. Vegetación de México. Editorial Limusa. México. 432.

- Sathesh-Kumar S., Ravi-Kumar B., Krishna-Mohan G. 2009. Hepatoprotective effect of *Trichosanthes cucumerina* Var *cucumerina* L on carbon tetrachloride induced liver damage in rats. *J Ethnopharmacol*; 123: 347-350.
- Schultes R.E., Von Reis S. 1997. *Ethnobotany and evolution of a dicipline*. Discorides Press. Oregon. E.U.A. 414.
- Seifter S., Dayton S., Novic B., Montwyler E. 1950. The estimation of glucogen with the anthrone reagent. *Arch Biochem*; 25: 191.-200.
- Simpson K.J., Lukacs N.W., Colleti L., Strieter R.M., Kunkel S.L. 1997. Cytokines and the liver. *J Hepatol*; 27:1120-1132.
- SINAIS. Referencia en linea, <http://www.sinais.salud.gob.mx/mortalidad/index.html> (2008, consultado en Mayo del 2010). Recuperado.
- Stryer L., Berg J.M., Tymoczko J.L. 2004. *Bioquimica*. Quinta edición. Ed. Reverte. Barcelona, España. 974.
- Thompson K.C., Trowern A., Fowel A., Marathe M., Haycock C., Arther M.J., Sheron N. 1998. Primary rat and mouse hepatic stellate cells expression, the macrophages inhibitor cytokine IL-10 during the course of activation *in vitro*. *Hepatol*; 28:1518-1524.
- Thompson K., Maltby J., Fallowfield A., McAulay M., Millward-Sandler H., Sheron N. 1998. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatol*; 28:1597-1606.
- Tilg H., Wilmer A., Vogel W., Herld M., Nölchen B., Judmaier G., Huber C. 1992. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterol*; 103: 264-274.

- Villavicencio-Nieto M.A., Pérez-Escandón B.E. 2006. Plantas útiles del estado de Hidalgo III. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México. 229.
- Vargas F.M. 1984. Parques Nacionales de México y reservas equivalentes. Instituto de Investigaciones Ecológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 198.
- 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 an antioxidant mechanism. Biol Pharm Bull; 31:4:760-764.
- Zamora-Martínez L. I., Barquín-López M.P. 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. México. 196.
- Zavala C.F. 1995. Encinos Hidalguenses. Dirección de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. México. 77-114.