

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**EVALUACIÓN DE AGENTES HEPATOPROTECTORES
EN EL DAÑO INDUCIDO POR TETRACLORURO DE CARBONO Y
ACETAMINOFEN Y SU APLICACIÓN EN LA EVALUACIÓN DE
UN EXTRACTO DE *Centaurea americana***

POR

M.C. LILIANA TORRES GONZÁLEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN QUÍMICA BIOMÉDICA**

ENERO, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN DE AGENTES HEPATOPROTECTORES
EN EL DAÑO INDUCIDO POR TETRACLORURO DE CARBONO Y
ACETAMINOFEN Y SU APLICACIÓN EN LA EVALUACIÓN DE
UN EXTRACTO DE *Centaurea americana***

Por:

M.C. LILIANA TORRES GONZÁLEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
con Orientación en Química Biomédica**

Enero, 2017

EVALUACIÓN DE AGENTES HEPATOPROTECTORES EN EL DAÑO
INDUCIDO POR TETRACLORURO DE CARBONO Y ACETAMINOFEN
Y SU APLICACIÓN EN LA EVALUACIÓN DE UN EXTRACTO
DE *Centaurea americana*

Aprobación de Tesis:



DRA.C. PAULA CORDERO PÉREZ
Directora de Tesis



DRA.C. NOEMI WAKSMAN DE TORRES
Co-Directora de Tesis



DR.C. JONATHAN PÉREZ MESEGUER
Comisión de Tesis



DRA. Ph.D. LINDA E. MINOZ ESPINOSA
Comisión de Tesis



DR.C. RICARDO SALAZAR ARANDA
Comisión de Tesis



DR. med. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ
Subdirector de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DE AGENTES HEPATOPROTECTORES EN EL DAÑO
INDUCIDO POR TETRACLORURO DE CARBONO Y ACETAMINOFEN
Y SU APLICACIÓN EN LA EVALUACIÓN DE UN EXTRACTO
DE *Centaurea americana*

Presentado por:

M.C. Liliانا Torres González

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina y en Unidad de Hígado, Servicio de Gastroenterología, Departamento de Medicina Interna, Hospital Universitario "Dr. José E. González", de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Paula Cordero Pérez y la Co-dirección de la Dra.C. Noemí Waksman de Torres.

DIRECTORA



DRA.C.PAULA CORDERO PÉREZ

CO-DIRECTORA



DRA.C. NOEMÍ WAKSMAN DE TORRES

RESUMEN

M.C. Liliana Torres González

Fecha de graduación: 2017

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título de estudio: EVALUACIÓN DE AGENTES HEPATOPROTECTORES EN EL DAÑO INDUCIDO POR TETRACLORURO DE CARBONO Y ACETAMINOFEN Y SU APLICACIÓN EN LA EVALUACIÓN DE UN EXTRACTO DE *Centaurea americana*

Número de páginas: 103

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Química Biomédica.

Área de estudio: Química Analítica y Unidad de Hígado

Propósito y Método del Estudio: Las enfermedades hepáticas son un importante problema de salud pública. Estudios en México predicen un incremento de estas, principalmente en población económicamente activa. En la patogénesis de la enfermedad hepática ha sido implicado el estrés oxidativo y los radicales libres que son causantes de este y pueden ser bloqueados por compuestos antioxidantes. Las plantas han mostrado ser una gran fuente de antioxidantes. La identificación de estas moléculas contenidas en una biomasa compleja requiere una cuidadosa selección y ejecución de bioensayos durante las etapas del proceso de investigación. Por lo anterior, se consideró importante evaluar agentes hepatoprotectores en un modelo *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* para aplicar dichos modelos en la evaluación de plantas con posible efecto hepatoprotector. En la primera y segunda etapa, se evaluaron los agentes inductores de daño: tetracloruro de carbono y acetaminofén *in vitro* y *ex vivo*, para seleccionar el mejor modelo de hepatotoxicidad, por utilizando el método de MTT (*in vitro*) y azul alamar (*ex vivo*), liberación al medio de cultivo de AST, ALT y LDH, así como indicadores de estrés oxidativo tales como malondialdehído, capacidad antioxidante total, superóxido dismutasa y glutatión reducido. Después se evaluó el agente hepatotóxico seleccionado *in vivo*. Por otro lado, se evaluó la actividad citotóxica y hepatoprotectora de un extracto de *C. americana* por el método MTT y la liberación al medio de cultivo de enzimas hepáticas.

Contribuciones y Conclusiones: El mejor agente hepatotóxico para utilizar en los modelos *in vitro* y *ex vivo* fue el CCl₄. El modelo de daño por CCl₄ en células HepG2 es un modelo sencillo que puede ser utilizado para la evaluación de productos con potencial acción hepatoprotectora. Con el modelo *ex vivo* se observó una gran similitud al daño tóxico inducido por CCl₄ *in vivo*, por lo cual este ensayo resultaría muy útil como una etapa previa a los ensayos *in vivo*; de esta manera se podría reducir el número de animales sometidos a los ensayos para evaluar hepatoprotección. Al evaluar un extracto de *C. americana*, se observó una disminución de las enzimas AST, LDH, MDA e incremento de GSH tras el daño inducido por CCl₄ en el modelo *in vitro* indicando un efecto hepatoprotector, el cual pudiera ser atribuido a su gran capacidad antioxidante demostrada por el ensayo de DPPH.



FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS
DRA.C. PAULA CORDERO PÉREZ

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Las enfermedades hepáticas.....	2
1.1.1 Epidemiología de las enfermedades hepáticas.....	2
1.1.1.1 Enfermedad hepática por alcohol.....	2
1.1.1.2 Enfermedad hepático por hígado graso no alcohólico.....	3
1.1.1.3 Enfermedad hepático por virus.....	4
1.1.2 Tratamiento de las enfermedades hepáticas.....	5
1.1.3 Tendencias de las enfermedades hepáticas en México.....	7
1.1.4 Patogénesis de las enfermedades hepáticas.....	7
1.2 Medicina herbolaria.....	10
1.2.1 Medicina herbolaria en el tratamiento de las enfermedades hepáticas...	11
1.2.1.1 Silimarina.....	12
1.2.2 Medicina herbolaria en el tratamiento de enfermedades hepáticas en México.....	14
1.2.2.1 <i>Centaurea americana</i>	15
1.3 Modelos para la evaluación hepatoprotectora de productos naturales.....	16
1.3.1 Líneas celulares	16
1.3.2 Cortes precisos de rebanas de hígado de rata.....	17
1.3.3 Animales.....	18
1.4 Agentes inductores de daño utilizados en los diversos modelos de	

evaluación hepatoprotectora de productos naturales.....	18
1.4.1 Tetracloruro de carbono.....	18
1.4.2 Acetaminofén.....	19
1.5 Justificación.....	20
1.6 Objetivo General.....	21
1.7 Objetivos Específicos.....	21
II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
2.1 Material y Equipo.....	22
2.1.1 Material General.....	22
2.1.2 Reactivos y Solventes.....	23
2.1.3 Equipo.....	24
2.1.4 Material Biológico.....	25
2.1.4.1 Línea parental de carcinoma hepatocelular humano	
HepG2.....	25
2.1.4.2 Ratas Wistar.....	25
2.1.5 Material vegetal.....	26
2.2 Métodos.....	26
2.2.1 Cultivo celular.....	26
2.2.1.1 Congelamiento de la línea celular HepG2.....	26
2.2.1.2 Mantenimiento de la línea celular HepG2.....	27
2.2.2 Plaqueo celular.....	28
2.2.3 Medición de viabilidad celular.....	29
2.2.4 Medición de enzimas hepáticas.....	30

2.2.5 Medición de peroxidación lipídica.....	31
2.2.6 Medición de capacidad antioxidante total.....	32
2.2.7 Medición de superóxido dismutasa.....	33
2.2.8 Medición de glutatión.....	34
2.2.9 Manejo de animales.....	35
2.2.10 Preparación de cortes precisos de rebanadas de hígado de rata.....	35
2.2.11 Análisis histológico.....	36
2.2.12 Evaluación de citotoxicidad.....	36
2.2.12.1 Evaluación de actividad citotóxica en la línea celular HepG2.....	36
2.2.12.2 Evaluación de actividad citotóxica en cortes precisos de rebanadas de hígado de rata.....	37
2.2.13 Efecto de tetracloruro de carbono.....	37
2.2.13.1 Efecto de tetracloruro en la línea celular HepG2.....	37
2.2.13.2 Efecto de tetracloruro en cortes precisos de rebanadas de hígado de rata.....	38
2.2.14 Efecto de acetaminofén.....	39
2.2.14.1 Efecto de acetaminofén en la línea celular HepG2.....	39
2.2.14.2 Efecto de acetaminofén en cortes precisos de rebanadas de hígado de rata.....	40
2.2.15 Evaluación de la actividad hepatoprotectora.....	40
2.2.15.1 Evaluación de la actividad hepatoprotectora en la línea celular HepG2.....	40

2.2.15.2 Evaluación de actividad hepatoprotectora en cortes precisos de rebanadas de hígado de rata.....	40
2.2.15.3 Evaluación de actividad hepatoprotectora en ratas Wistar.....	41
2.2.16 Obtención de extracto de <i>C. americana</i>	42
2.2.17 Medición de flavonoides totales.....	42
2.2.18 Medición cualitativa y cuantitativa de actividad antioxidante.....	43
2.2.19 Análisis estadístico.....	44
III. RESULTADOS	45
3.1 Efecto de tetracloruro de carbono en la línea celular HepG2.....	45
3.2 Efecto de acetaminofén en la línea celular HepG2.....	50
3.3 Evaluación de la actividad citotóxica de silimarina, silibinina y silifos en la línea celular HepG2.....	55
3.4 Evaluación de la actividad hepatoprotectora de silimarina, silibinina y silifos en la línea celular HepG2.....	58
3.5 Efecto de tetracloruro de carbono en cortes precisos de hígado de rata.....	60
3.6 Efecto de acetaminofén en cortes precisos de hígado de rata.....	63
3.7 Evaluación de la actividad citotóxica de silimarina, silibinina y silifos en los cortes precisos de hígado de rata.....	65
3.8 Evaluación de la actividad hepatoprotectora de silimarina, silibinina y silifos en los cortes precisos de hígado de rata.....	67
3.9 Efecto hepatoprotector de silimarina, silibinina y silifos en ratas Wistar.....	69
3.10 Material vegetal.....	71
3.11 Obtención de extracto metanólico de <i>C. americana</i>	71

3.12	Medición de flavonoides totales.....	71
3.13	Evaluación de la actividad citotóxica del extracto de <i>C. americana</i> en la línea celular HepG2.....	71
3.14	Evaluación de la actividad hepatoprotectora del extracto de <i>C. americana</i> en la línea celular HepG2.....	74
3.15	Evaluación cualitativa de la actividad antioxidante del extracto de <i>C. americana</i>	75
3.16	Evaluación cuantitativa de la actividad antioxidante del extracto de <i>C. americana</i>	76
IV.	DISCUSIÓN.....	77
V.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	85
5.1	Conclusiones.....	85
5.2	Perspectivas.....	86
VI.	BIBLIOGRAFÍA.....	87

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Cálculo del Rf de las manchas visualizadas bajo luz UV, 254 nm del extracto de <i>C. americana</i>	75
2	CI ₅₀ del extracto de <i>C. americana</i> y quercetina	76

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructuras químicas de los flavanolignanos que constituyen la silimarina y la estructura química de silifos.	13
2	Reducción de MTT	29
3	Efecto de CCl ₄ a concentración de 20, 30 y 40 mM por 1 h en la línea celular HepG2.	46
4	Efecto de CCl ₄ a concentración de 20, 30 y 40 mM por 1 h 30 min en la línea celular HepG2.	47
5	Efecto de CCl ₄ a concentración de 20, 30 y 40 mM por 2 h en la línea celular HepG2.	48
6	Efecto de CCl ₄ a concentración de 20, 30 y 40 mM por 3 h en la línea celular HepG2.	49
7	Efecto de Acet a concentración de 2, 4 y 8 mM por 12 h, en la línea celular HepG2.	51
8	Efecto de Acet a concentración de 2, 4 y 8 mM por 24 h en la línea celular HepG2	52
9	Efecto de Acet a concentración de 2, 4 y 8 mM por 48 h en la línea celular HepG2.	53
10	Efecto de Acet a concentración de 2, 4 y 8 mM por 72 h en la línea celular HepG2.	54
11	Efecto de SLB, SLM y SLF a concentraciones de 10, 100 y 150 ug/mL por 1 h en la línea celular HepG2	56

12	Efecto de SLB, SLM y SLF a concentraciones de 10, 100 y 150 ug/mL por 12 h en la línea celular HepG2	57
13	Efecto hepatoprotector de SLB, SLM y SLF en el daño inducido por CCl ₄ 40 mM por 1 h 30 min en la línea celular HepG2	59
14	Efecto del CCl ₄ en los cortes precisos de hígado de rata a concentraciones de 20, 30 y 40 mM durante 6, 12, 18 y 24 h.	60
15	Efecto de CCl ₄ a dosis de 1 mL/Kg de peso en los cortes precisos de hígado de rata.	62
16	Efecto de Acet en los cortes precisos de hígado de rata a los tiempos de 12, 24 y 48h.	64
17	Efecto de SLB, SLM y SLF a concentraciones de 10, 100 y 150 ug/mL en los CPHR a las 24h.	66
18	Efecto hepatoprotector de SLM, SLB y SLF a concentraciones de 10, 100 y 150 ug/mL en los CPHR a las 24 h.	68
19	Efecto hepatoprotector de SLM, SLB y SLF a dosis de 70mg/kg de peso en el daño inducido por CCl ₄ en ratas Wistar.	69
20	Histología hepática. A) Parénquima hepático control B) CCl ₄ , C) SLM+CCl ₄ , D) SLB+CCl ₄ , E) SLF+CCl ₄ . Tinción de hematoxilina y eosina a 10x.	70
21	Efecto del extracto de <i>C. americana</i> a concentraciones de 10,100 y 1000 ug/mL por 1 h en la línea celular HepG2.	72
22	Efecto del extracto de <i>C. americana</i> a concentraciones de 10, 100 y	73

	1000 ug/mL por 12 h en la línea celular HepG2.	
23	Efecto hepatoprotector de <i>C. americana</i> en el daño inducido por CCl ₄ 40 mM por 1 h 30 min en la línea celular HepG2.	74
24	Análisis cuantitativo de la actividad antioxidante del extracto de <i>C. americana</i>	75

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%	Porcentaje
40x	Aumento de ocular de microscopio de luz
ABTS	Sulfonato 2,2'-azino-di-3-etilbenziazolin
Acet	Acetaminofén
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AlCl₃	Tricloruro de aluminio
ALT	Alanino aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
ATP	Adenosin trifosfato
°C	Grados centígrados
CAO-T	Capacidad antioxidante total
CCF	Cromatografía en capa fina
CCl₄	Tetracloruro de carbono
CHC	Carcinoma hepatocelular
CI₅₀	Concentración inhibitoria 50
cm	Centímetros
cm²	Centímetros cuadrados
CO₂	Dióxido de carbono
D-MEM	Medio Dulbecco's Eagle's
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNTB	Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico

DPPH	1-1-Difenil-2-picrilhidrazilo
EHA	Enfermedad hepática por alcohol
EHGNA	Enfermedad de hígado graso no alcohólico
EHNA	Esteatohepatitis no alcohólica
ERO	Especies reactivas de oxígeno
Ext.	Extracto
FAO	Organización para la alimentación y la agricultura
FNT-a	Factor de necrosis tumoral alfa
g	Gramos
GC	Grupo Control
GSH	Glutación
H	Horas
HVB	Hepatitis por virus B
HVC	Hepatitis por virus C
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido Clorhídrico
HepG2	Línea celular de hepatoma humano
Huh7	Línea celular de hepatoma humano
i.p.	Intraperitoneal
JNK	C-jun-n-terminal
KB	Amortiguador de Krebs-bicarbonado
Kg	Kilogramo

LDH	Lactato deshidrogenasa
MDA	Malondialdehído
MeOH	Metanol
Mg	Miligramos
Min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
NAD⁺	Dinucleótido de adenina
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida de adenina
NAPQI	N-acetil-p-benzoquinoneimina
Nm	Nanómetros
O₂	Oxígeno molecular
O₂⁻	Radical superóxido
OMS	Organización mundial de la Salud
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
Rf	Factor de retardo
rpm	Revoluciones por minuto
RVS	Respuesta viral sostenida
SFB	Suero fetal bovino
SLB	Silibinina

SLF	Silifos
SLM	Silimarina
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzoico
ug	Microgramos
UI	Unidades Internacionales
ul	Microlitros
uM	Micromolar
UV	Ultra violeta
VHC	Virus de hepatitis C

Al jugar ajedrez entonces, podemos aprender: primero, previsión.....segundo, prudencia.....tercero, cautela....Y al final, aprendemos del ajedrez el hábito de no ser desanimados por las apariencias malas presentes en el estado de nuestros asuntos, el hábito de la esperanza por una oportunidad favorable y la perseveración de los secretos de los recursos.

Benjamin Franklin

DEDICATORIA

Dedico esta tesis con todo mi cariño

A mi madre
María Guadalupe González Infante (†)

A mi padre
Rafael Torres Villar

A mi hermano
Israel Torres González

A mi esposo
Miguel Puebla Blanco

AGRADECIMIENTOS

Dios Padre gracias por guiar mi camino y permitir que las cosas sucedan en mi vida a su debido tiempo. Gracias porque en tu soberanía he podido llegar hasta aquí. Que este trabajo y esfuerzo sea para Tu Gloria.

A la Dra. Paula Cordero Pérez

Es difícil expresar de manera completa mi gratitud y admiración. Gracias por ser guía en mi desarrollo en esta etapa. Por las innumerables enseñanzas y todo el tiempo que ha invertido en mí, para la realización del proyecto. Espero haber aprovechado cada oportunidad para aprender de usted.

Gracias por haber creído en mí y tomarme como su asesorada. Gracias por ayudarme a cumplir esta meta y haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo. Ha sido una parte fundamental en mi formación Doctoral y personal. Gracias por haber sido un gran soporte en tiempos de sufrimiento y haber estado también en los momentos de gran alegría durante estos años.

A la Dra. Noemí Waskman de Torres

Por ser parte fundamental durante mi desarrollo como estudiante de posgrado. Gracias por haberme dado la oportunidad de aprender de usted. Gracias por haberme brindado su confianza a lo largo de estos años y haber dedicado de su tiempo en dirigirme durante mi formación y haberme facilitado todos los recursos para la realización de este trabajo.

Al Dr. Ricardo Salazar Aranda

Por todas las enseñanzas que me ha dado y su apoyo en la realización de este trabajo. Gracias por haber tenido el tiempo de recibirme para organizar trabajo y resolver mis incertidumbres. Gracias por su paciencia y ayuda en cada momento que lo solicité.

Al Dr. Jonathan Pérez Meseguer

Por todo tu tiempo y dedicación para la realización de esta tesis. Gracias por haber dedicado tu tiempo en dirigirme durante mi formación y por todas las palabras de aliento positivas que siempre recibí. Gracias por la paciencia y los buenos consejos. Con toda mi estima y agradecimiento.

A la Dra. Linda E. Muñoz Espinosa

Gracias por ser parte importante en mi desarrollo como estudiante de posgrado y en mi formación personal. Por brindarme su confianza y apoyo a lo largo de estos años. Por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por darme esas enseñanzas que no vienen en el manual. De todo corazón, y con toda mi admiración.

A cada uno de mis profesores de postgrado, a quienes debo el conocimiento adquirido. Espero haber aprovechado todas sus experiencias.

Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo

Dra. Rosalba Ramírez Durón

Dra. María de la Luz Salazar Cavazos

Dr. C. Tannya Rocío Ibarra Rivera

A la T.L.C. Ivonne Carrera Rodriguez

Por ese apoyo arduo durante el tiempo de duro trabajo. Con todo mi aprecio y gratitud.

A M.C. Graciela Granados Guzmán

M.C. Magdalena Escobar Saucedo

M.C. Elda Madai Melchor Martínez

M.C. Cecilia Delgado Montemayor

Dr.C. Davir Arturo Silva Mares

Gracias a cada uno de ustedes por su compañerismo y hacer de estos años una experiencia de vida. Ustedes han sido un gran aliento durante este tiempo y he aprendido mucho de ustedes.

A la **Q.C.B. Lucila Catalina Treviño Lozano**

Gracias por todo tu apoyo y palabras de animo durante estos años. Gracias por tu amistad y compromiso de trabajo. Con todo mi cariño y agradecimiento.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

El hígado es el principal órgano de metabolismo y excreción del cuerpo humano, y es susceptible a un número diverso de patologías dentro de las más frecuentes están las hepatitis agudas, crónicas, cirrosis y hepatocarcinoma. El hígado puede ser afectado por virus (tales como virus de hepatitis C y B), parásitos, autoanticuerpos, y diversos xenobióticos tales como: alcohol, medicamentos, ácidos grasos, solventes clorhidratos, toxinas fúngicas, contaminantes industriales, entre otros, Sherlock S et al., 2008). Si esta afectación es persistente, se puede producir hepatitis, el cual es un estado inflamatorio agudo; si este estado es persistente, se produce entonces un proceso crónico reversible denominado fibrosis, el cual es caracterizado por la acumulación de matriz extracelular que sigue a las formas crónicas de las enfermedades hepáticas. El evento central de la fibrosis hepática, es la activación de las células estelares provocando una serie de cambios que incluyen la degradación de los componentes de matriz extracelular, contracción vascular y liberación de citocinas. Consecutivo a este estado se puede presentar cirrosis (Castañeda SR et al., 2007). Estos procesos pueden culminar en carcinoma hepatocelular (CHC), en el cual existe un crecimiento incontrolado de las células así como pérdida de la función normal de las células que constituyen este órgano. Actualmente la terapia más efectiva para los pacientes con enfermedad crónica avanzada es el trasplante hepático, sin embargo pocos son los pacientes que llegan a ser trasplantados.

1.1 Las enfermedades hepáticas.

1.1.1 Epidemiología de las enfermedades hepáticas.

Las enfermedades hepáticas son un importante problema de salud pública. Aproximadamente 1,4 millones de muertes/año alrededor del mundo están relacionadas a enfermedades hepáticas y 796,000 son directamente atribuibles a cirrosis (Mittal S et al., 2013). La epidemiología de la cirrosis hepática está caracterizada por marcadas diferencias de acuerdo al género, grupo étnico y región geográfica. La naturaleza, frecuencia y el tiempo de adquisición de los factores de riesgo para cirrosis como hepatitis por virus de C (HVC), hepatitis por virus B (HVB) y enfermedad hepática por alcohol (EHA) pudieran explicar estas variaciones (Méndez-Sánchez N et al., 2005).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades hepáticas representan el 6% del total de muertes en México y por ello ocupa el lugar 17 en el mundo en muertes por enfermedad hepática de acuerdo a la tasa de mortalidad ajustada por edad por cada 100,000 habitantes (OMS., 2015). Las causas más importantes de enfermedad hepática son las asociadas a alcohol, hígado graso no alcohólico (EHGNA) y HVC/HVB.

1.1.1.1 Enfermedad hepática por alcohol.

El alcohol es la principal causa de enfermedad hepática en todo el mundo. La EHA abarca un espectro de lesiones, que van desde la esteatosis en diversos estadios hasta la cirrosis con el riesgo subsecuente para CHC, la esteatohepatitis puede ocurrir en cualquier etapa de la enfermedad (Schwartz JM et al., 2012). Se estima que hasta un 80% de los pacientes con consumo excesivo alcohol desarrolla esteatosis, de estos un 10% desarrolla cirrosis. Los factores de riesgo asociados a evolución de esta enfermedad son cantidad de alcohol

ingerido, tipo de alcohol, género, obesidad, factores genéticos y polimorfismo de genes, entre otros (Schwartz JM et al., 2012).

En México el 38,3% de los adultos consume habitualmente bebidas alcohólicas, el doble de hombres (66,6%) que de mujeres (33,3%). En hombres de 15 a 34 años, uno de cada 10 se expone mensualmente a los riesgos de consumo excesivo y casi uno de cada 20 lo hace semanalmente (Gutiérrez JP et al., 2012).

1.1.1.2 Enfermedad de hígado graso no alcohólico.

La EHGNA representa, en la actualidad la enfermedad hepática más común en los países occidentales. Abarca esteatosis simple (hígado graso), esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y cirrosis (Vernon G et al., 2011). Los reportes de prevalencia varían debido al tipo de población de estudio y al criterio de diagnóstico utilizado, así se estima que en la población americana su prevalencia está entre un 10 a 35 % y en México de un 10 a 20% (Bellentani S et al., 2009). Está asociada con factores de riesgo tales como obesidad, resistencia a la insulina y síndrome metabólico (Diabetes Mellitus tipo 2, hiperlipidemia) (Chalasanani N et al., 2012).

La obesidad ha alcanzado proporciones epidémicas a nivel mundial. La Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) ha establecido que México es el país número uno en Obesidad adulta e infantil (FAO., 2015). En México en 2012, 26 millones de adultos presentaban sobrepeso y 22 millones, obesidad. Respecto de los datos en la población infantil, un 27,8% padecían obesidad o sobrepeso. Uno de cada 10 niños presentaba obesidad y dos de cada 10 sobrepeso, similar en ambos sexos (Gutiérrez JP et al., 2012).

1.1.1.3 Enfermedad hepática por virus.

Alrededor del mundo las hepatitis virales afectan aproximadamente a 500 millones de personas, más de 10 veces que el número de afectados por el virus de inmunodeficiencia humana. La OMS estima que dos billones de personas han sido infectadas de forma crónica con el virus de hepatitis B (VHB) y 170 millones con virus de hepatitis C (VHC) con un riesgo de desarrollar enfermedad hepática incluyendo cirrosis y cáncer hepático (OMS., 2012). De estas 600,000 y 350, 000 personas mueren cada año por HVB y HVC, respectivamente (Perz JF et al., 2006). La prevalencia de VHC se estima puede ser de un 10% a 20% en países como Egipto (Perz JF et al., 2006) y de 4.9% en Latinoamérica (Mohd Hanafiah K et al., 2013). Para HVB la prevalencia más alta se encuentra en las regiones del sur de Europa Central y Oriental. Además en Medio Oriente y el subcontinente de la India, se estima que es de un 5%, Europa Occidental y en América del Norte se estima es del 1% (OMS., 2012). En la ausencia de una vacuna para VHC, se estima que la incidencia continúe incrementado globalmente a una tasa de 4 millones de nuevas infecciones por año. La infección por VHC es una de las principales causas de enfermedad hepática terminal requiriendo el trasplante hepático. Los principales centros de trasplante reportan que aproximadamente del 25-30% de sus candidatos son pacientes infectados por VHC (Ahmed A., 2001). Cerca de 4 millones de americanos están infectados con el VHC y de un 20-30% de estos pacientes se puede esperar que progresen a cirrosis (Di Bisceglie AM et al., 2003). La morbilidad y mortalidad de la enfermedad varían, puede ocurrir en cualquier individuo entre 10 a 30 años a partir del inicio de la infección. Entre el 15 y el 30% de los pacientes infectados presentan recuperación espontánea, sin embargo del 70 al 85% presentan infección crónica (Di Bisceglie AM et al., 2003).

1.1.2 Tratamiento de las enfermedades hepáticas.

El tratamiento de las enfermedades hepáticas es diverso y es dependiente de la causa que produce la enfermedad hepática.

Actualmente las principales actividades que realizan los organismos de salud a fin de controlar la enfermedad hepática por alcohol, se basan en el desarrollo de políticas que reduzcan la prevalencia del consumo de alcohol (Mathurin P et al., 2015). Diversos tratamientos tales como la abstinencia, la terapia nutricional, terapia farmacológica, la psicoterapia y la cirugía están disponibles actualmente y el plan de tratamiento varía según la etapa de la enfermedad. Por ejemplo, para la hepatitis alcohólica severa, los corticosteroides o pentoxifilina son los fármacos recomendados por las guías internacionales. Además, las nuevas dianas terapéuticas tales como el gen de quimiocinas CXCL1 y la superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral, están en investigación (Suk KT et al., 2014).

En la actualidad, las opciones de tratamiento para la EHGNA son limitadas. Las estrategias terapéuticas se basan en cambios en el estilo de vida como perder peso y hacer ejercicio, tomar antioxidantes como la vitamina E y agentes sensibilizantes de la insulina como los tioglitazoles (Abd El-Kader SM et al., 2015), actualmente se estudian en protocolos controlados fase II-III diversos medicamentos que pudieran reducir el avance de la enfermedad, entre estos se encuentran la incretina y el anticuerpo monoclonal antifibrótico Simtuzumab, aramchol y otros (Ahmed M, 2015).

La terapia actual para la infección por VHC genotipo 1 ha progresado en los últimos años. Hace 15 años, solo se trataba con interferón-pegilado (IFN-alfa-2b, 1.5 ug/Kg de peso/semana o IFN-alfa-2a, 180 ug/Kg de peso/semana) y ribavirina (800 a 1200 mg/día) durante 48 semanas (NIH Consensus., 2002; Seeff et al., 2001). Desde el 2011, tras la

aprovación de antivirales de acción directa (AAD) como los inhibidores de proteasas de primera generación (Boceprevir y Telaprevir); han mejorando las tasas de respuesta viral sostenida (RVS), de un 50% a un 65% (Ubagó P et al., 2012). Sin embargo, la gran cantidad de efectos adversos con estos medicamentos, obligó a tener en corto tiempo otros AAD con mucho mejores tasas de respuesta, de manera que actualmente la RVS puede alcanzarse más de 95% de los casos con fármacos libres de interferón como el Sofosbuvir/Ledipasvir, Paritaprevir(ritonavir)/Ombitasvir/Dasabuvir, Daclatasvir, Asunaprevir, y otros que están en proceso de registro (Lawitz M et al., 2013; Manns M et al., 2014). Sin embargo aunque el costo es mucho menor que en EUA, aún es alto para nuestro país, siendo la principal limitante para su accesibilidad. Lo más importante que estos fármacos AAD son capaces de curar la infección por VHC.

Por otra parte, el tratamiento para HVB está dirigido principalmente a la supresión del virus de hepatitis B, reduciendo la actividad de la hepatitis y retardando la progresión de la lesión hepática e incluso revirtiendo la cirrosis, a diferencia del VHC, para el HVB aún no hay tratamientos curativos. Varios agentes farmacológicos incluyen el interferón pegilado, lamivudina, adefovir dipivoxil, telbivudina, entecavir y tenofovir disoproxil fumarato están disponibles (Russo FP et al., 2015). El interferón pegilado presenta varias desventajas, tales como diversos efectos adversos, vía de administración y duración de tratamiento. Con respecto a los nucleósidos/nucleótidos, el entecavir y tenofovir disoproxil fumarato son los fármacos de primera elección. Aunque estos se pueden administrar por vía oral, y deben ajustarse de acuerdo a la función renal, tienen muy pocos efectos adversos y deben ser administrados por un largo tiempo, de lo contrario el riesgo de recaída es alto (Tawada A et al., 2015).

1.1.3 Tendencia de enfermedades hepáticas en México.

Las enfermedades hepáticas en México representan la 5ª causa de muerte en población económicamente activa (Secretaría de Salud, 2010). Estudios de las tendencias y proyecciones epidemiológicas de las enfermedades hepáticas en México muestran un incremento de estas en los próximos años, debido a la baja tasa de respuesta a tratamiento que presentan la mayoría de estas afecciones hepáticas (Kershenovich D., 2011; Méndez-Sánchez N., 2003; Méndez-Sánchez N., 2005).

1.1.4 Patogénesis de las enfermedades hepáticas.

El estrés oxidativo ha sido reconocido como un factor fundamental en los cambios patológicos observados en varias enfermedades hepáticas. Especialmente el EHA, EHGNA y HVC, donde el estrés oxidativo representa un importante papel en los cambios fisiopatológicos que generan el progreso del hígado normal a cirrosis y finalmente CHC (Tanikawa K et al., 2006).

El estrés oxidativo es una condición en la cual los niveles celulares de las especies reactivas de oxígeno (ERO) exceden la capacidad neutralizante de los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Fuentes intracelulares que producen excesivas ERO activan o sobre expresan enzimas tales como NADPH oxidasa, miembros de la familia de citocromo P450 y xantina oxidasa. Además, durante el daño hepático, los hepatocitos son expuestos a altos niveles de ERO, lo que genera una depleción del principal antioxidante no-enzimático (Glutación: GSH) sensibilizando a los hepatocitos a la muerte. Proceso que es activado por producción de factor de necrosis tumoral alfa (FNT-alfa) generado por las células inflamatorias que se activaron durante el daño (Cichoż-Lach H et al., 2014).

Así, se ha reportado que diferentes mecanismos intervienen en la patogénesis de la infección por el VHC, estos incluyen daño hepático inmunológico, citotoxicidad directa mediada por diferentes productos virales y la inducción del estrés oxidativo (Levent G., 2006).

Investigaciones han mostrado que el VHC puede causar estrés oxidativo en las células infectadas como resultados de la alteración en la función de la mitocondria, sugiriendo que el efecto es directo sobre la proteína core o nuclear del virus y que está presente en pacientes con y sin cirrosis (Ivanov AV et al., 2013). Pacientes con hepatitis C crónica exhiben una incrementada producción de FNT-alfa, una citocina que puede producir estrés oxidativo por estimular la generación de ERO, tales como radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2). Las ERO pueden causar daño celular por incremento de la peroxidación lipídica, daño oxidativo al ADN y proteínas así como depleción en el ATP almacenado. En la presencia de metales como Fe^{+3} el O_2 puede reaccionar con H_2O_2 para generar radicales hidroxilo (HO^{\cdot}), los cuales pueden ser más reactivos y citotóxicos. A su vez, la peroxidación de los ácidos grasos poli-insaturados, que constituyen la membrana celular, produce metabolitos como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal. Estos metabolitos altamente citotóxicos producidos en gran cantidad, pueden difundir desde la membrana celular para atacar blancos distantes y formar enlaces covalentes con varias moléculas. Como efectos deletéreos de este proceso puede ocurrir fibrogénesis (Ivanov AV et al., 2013).

El daño hepático inducido por alcohol es un proceso multifactorial que involucra varios mecanismos (Cederbaum AI., 2001). Un factor central en los mecanismos de daño inducido por alcohol es la excesiva generación de radicales libres, los cuales pueden resultar en estrés oxidativo (Nordmann R et al., 1992). Las ERO incrementan la

peroxidación de lípidos, modificación de proteínas, disminución de las defensas antioxidantes celulares, particularmente los niveles de GSH, así como daño oxidativo del ADN. Una exposición aguda o crónica al alcohol entonces incrementa la producción de ERO que intensifican estos procesos, los cuales han sido reportados en una variedad de sistemas celulares y seres vivos incluyendo al humano (Bondy SC., 1992).

También, se han involucrado varios mecanismos en la patogénesis de la EHGNA, principalmente mediante endotoxinas/citocinas, estrés oxidativo e hiperinsulinemia planteándose dos hipótesis. La primer hipótesis describe que el sobre crecimiento bacteriano intestinal seguido por la endotoxemia portal crónica pueden ser responsables de la producción de FNT-alfa y que puede afectar la oxidación mitocondrial de ácidos grasos lo cual conduce a esteatosis y esteatohepatitis. La segunda hipótesis describe que el estrés oxidativo participa de forma central en la patogénesis por la oferta excesiva de lípidos en la mitocondria que podría promover la reducción de la beta-oxidación e incrementar la producción de ERO. Estas ERO, como se ha mencionado, causan la peroxidación lipídica seguido por la activación de la respuesta inflamatoria así como de la promoción de las células estelares a la fibrogénesis (Oliveira C., 2002). Así mismo, se ha reportado que la grasa acumulada en la obesidad está asociada al desarrollo de síndrome metabólico, ya que la desregulación de la producción de adipocinas y el incremento selectivo en la producción de ERO producido por la grasa acumulada, conduce a la elevación del estrés oxidativo sistémico (Furukawa S., 2004).

Debido a la constante presencia de ERO durante la patogénesis, podría anticiparse que compuestos con potente actividad antioxidante pueden ser benéficos para los pacientes con estas enfermedades hepáticas. Estos beneficios, se han reportado en la literatura e incluyen

el uso de una gran variedad de plantas, lo que ha permitido el desarrollo de diversos fitofármacos con dicha actividad.

1.2 Medicina Herbolaria.

La medicina herbolaria tuvo su origen en los pueblos primitivos y el uso de remedios herbales ha sido una costumbre ancestral por la población mundial. La OMS ha señalado que 80% de las personas que vive en los países en desarrollo utiliza la medicina herbolaria para resolver sus problemas de salud, con estos datos se puede calcular que 64% de la población mundial hace uso de las plantas medicinales en forma no industrializada, estimándose que el número de especies utilizadas varía entre 35,000 y 75,000 (Farnsworth et al., 1991; Romero et al., 2004). La OMS refiere que el uso de remedios herbales impulsó un mercado que se estimó en el 2003 en alrededor de 60 billones de dólares anuales y sigue creciendo de forma constante (OMS., 2003). En un estudio realizado en los Estados Unidos se reportó que del 20 a 30% de pacientes atendidos en Clínicas de Hígado utilizaba remedios herbales y el 21% de ellos empleaba preparaciones herbales principalmente para desórdenes hepáticos; el remedio herbal más utilizado fue la silimarina (Seeff et al., 2001; Fogden et al., 2003). En México existen pocos reportes sobre el uso de los remedios herbales en pacientes con enfermedades hepáticas. Una investigación realizada en la Unidad de Hígado del Hospital Universitario “José E. González”, considerado como un centro de referencia de la región Noreste de México para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades hepáticas, permitió reportar que el 64.5% de los pacientes con enfermedades hepáticas atendidos por primera vez referían el uso de medicina alternativa y complementaria. De estos, el 92.3% utilizó remedios herbales para enfermedades hepáticas,

siendo los más utilizados: silimarina, ginkgo biloba, aloe vera, ginseng, diente de león, ajo, *Morinda citrifolia* (noni), neem, boldo y gordolobo (Villalobos Anguiano CG et al., 2014).

El impacto de los productos naturales hacia la producción de un medicamento, se ve reflejado en la investigación de Cragg GM et al (2013), en el que se definió que el 79% de todos los nuevos medicamentos aprobados de 1981 a 2010 fueron obtenidos a partir de productos naturales o modificación de estos.

La obtención de nuevos compuestos con actividad biológica a partir de productos naturales se ha racionalizado mediante el fraccionamiento biodirigido, para lo cual se realiza una revisión etnofarmacológica y quimiotaxonómica de las plantas. La revisión etnofarmacológica involucra la consulta de los usos tradicionales que la población hace de las plantas medicinales y la revisión quimiotaxonómica requiere de la relación filogenética entre las plantas así como las rutas biosintéticas mediante las cuales son generados los metabolitos secundarios (Abreu et al., 2008). La identificación de metabolitos secundarios con actividad biológica de una biomasa compleja requiere una selección cuidadosa y una ejecución de bioensayos adecuada en las distintas etapas del proceso de investigación (Phillopson JD 2001).

1.2.1 Medicina herbolaria en el tratamiento de las enfermedades hepáticas.

Diversos estudios han descrito que agentes terapéuticos de plantas pueden poseer actividad anti-hepatitis o pueden actuar contra enfermedades asociadas al hígado. Una gran cantidad de plantas y fitofármacos a nivel mundial han sido empleadas con este fin, tales como: *Glycyrrhiza glabra*, *Silybum marianum*, *Picrorhiza kurroa*, Sho-saiko-to (TJ9), Ninjin-

yomei-to (TJ-108), LIV-52 (Luper, 1998; Luper, 1999; Torres-González L et al.,2014). De estos *Silybum marianum* es el más utilizado a nivel mundial (Zhang A et al., 2013).

1.2.1.1 Silimarina

La silimarina (SLM) es un extracto estandarizado de las semillas de *Silybum marianum* o también llamada “cardo mariano” o “milk thistle”. Es aprobado por las Monografías E de la comisión Alemana como un tratamiento de soporte para condiciones inflamatorias hepáticas tales como: hepatitis, cirrosis e infiltración de grasa resultante por alcohol y otras toxinas (Blumenthal M., 2000). *Silybum marianum* es nativa del área del Mediterráneo y crece en el sureste de Europa como un vegetal. La SLM, es una mezcla de flavanolignanos bien caracterizados que incluye: silibinina, silicristina y silidianina (figura 1). Esta mezcla comprende el 65-80% del extracto crudo y ha sido estandarizada (Zholobenko A et al., 2014). La silibinina (SLB), es el principal componente de la mezcla al cual se le atribuye la actividad farmacológica. La farmacocinética de varias preparaciones de silimarina ha sido estudiada y se ha reportado que es pobremente absorbida en intestino delgado y es poco soluble en agua (Blumenthal M., 2000). Sin embargo, esta característica fue mejorada al agregar una molécula de fosfatidilcolina, incrementando su biodisponibilidad y solubilidad. A esta molécula se le denomino Silifos (SLF) (figura 1) (Barzagli N et al., 1990;).

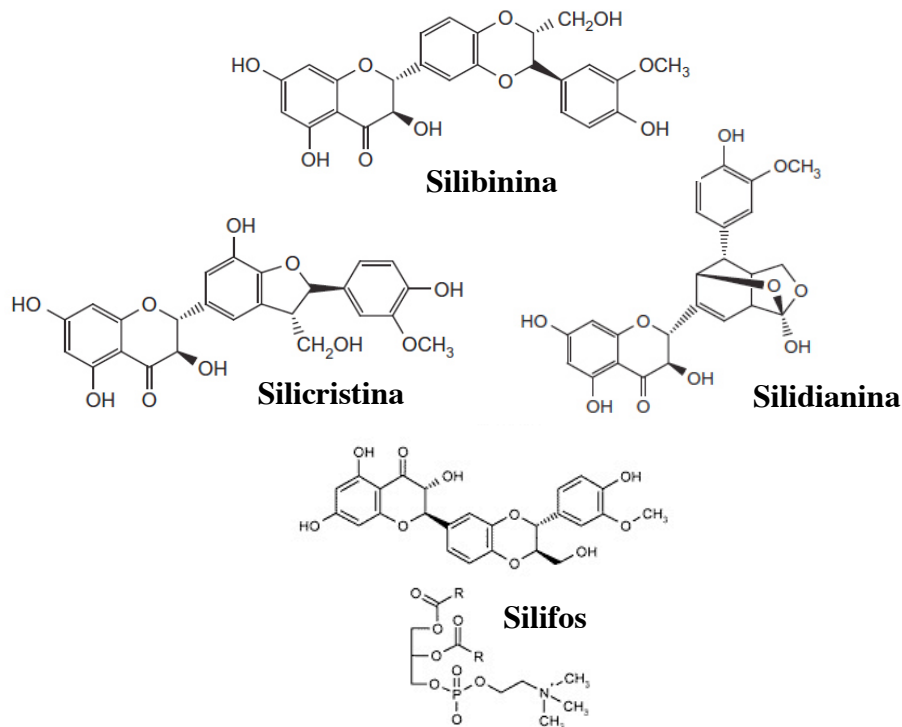


Figura 1. Estructuras químicas de los flavanolignanos que constituyen la silimarina y la estructura química de Silifos.

Se han reportado un número limitado de estudios clínicos controlados, aleatorizados, sobre investigación de la silimarina o la silibinina. Sin embargo, se han propuesto varios mecanismos de acción para la silimarina de acuerdo a los resultados obtenidos de estas investigaciones:

1. Como antioxidante por incremento de la actividad de la enzima superóxido dismutasa en eritrocitos y linfocitos (Varga Z et al., 2001),
2. Previene la depleción de glutatión en cultivo de hepatocitos humanos (Neuman MG et al., 1999)
3. Estabiliza la membrana de los hepatocitos, previniendo que las toxinas entren en la circulación enterohepática promoviendo la regeneración hepática por estimulación

nucleolar de la polimerasa A e incremento de la síntesis de proteínas ribosomales (Blumenthal., 2000).

En resumen la silimarina tiene varias propiedades benéficas con atractivo potencial terapéutico para las enfermedades hepáticas por alcohol, así como efectos en la regeneración hepática, en la peroxidación lipídica, en inflamación y en la fibrogénesis hepática.

1.2.2 Medicina herbolaria para enfermedades hepáticas en México.

El uso de remedios herbales es una costumbre ancestral en México y la información de las propiedades atribuidas a las plantas se transmite de generación en generación (Romo de Vivar A., 1985). Se estima que en México cerca del 60% la población utiliza algún remedio a partir de plantas para el tratamiento de sus enfermedades (Luna ALM et al., 2005).

Existen pocas plantas evaluadas científicamente en México para actividad hepatoprotectora, dentro de estas se encuentran: *Amole tuber*, *Cochlospermum vitifolium*, *Heterotheca inuloides*, *Hibiscus sabdariffa*, *Leucophyllum frutescens*, *Prostechea michuacan*, *Psidium guajava*, *Rosmarinus officinalis*, *Verbena carolin*, *Centaurea americana*, *Juglans mollis*, *Krameria ramossisima* y *Turnera diffusa* (Rodríguez-Hernández H et al., 2000; Salazar R et al., 2008; Torres-González L et al., 2011; Castillo-España P et al., 2007; Coballase-Urrutia E et al., Villalpando-Arteaga EV et al., 2013; Balderas-Rentería I et al., Gutiérrez R et al., 2009; Heinrich M et al., 1998; Sotelo-Félix JI et al., 2002; Argueta VA et al., 1994; Favari-Perozzi L et al., 2007; Torres-González L et al., 2014).

1.2.2.1 *Centaurea americana*.

Esta planta pertenece al género *Centaurea sp*, es comúnmente conocida como flor de canasta y cardo, es una planta anual, nativa del Norte de México en Coahuila y en Nuevo León y de los estados de Arizona, Arkansas, Kansas, Louisiana, Missouri, Nuevo México, Oklahoma y Texas en Estados Unidos, además de ser cultivada en varios países. Se ha referido por curanderos para el tratamiento de enfermedad hepática (Salazar-Aranda R., 2011). El aislamiento de sesquiterpenlactonas, lignanos y fitoecdisteroides ha permitido la caracterización de esta planta (Shoeb et al., 2006; Cooper G et al., 2002; Ohno N et al., 1973). Existen cuatro estudios de interés de esta especie. Shoeb et al. (2006) evaluaron la actividad antioxidante y la toxicidad a través del ensayo de letalidad en *Artemia salina* de los extractos de hexano, diclorometano y metanólico de semillas de *Centaurea americana* (*C. americana*). En este trabajo se reportó que la actividad antioxidante del extracto metanólico fue buena respecto de los controles y los extractos diferenciales no fueron tóxicos, sin embargo los lignanos aislados mostraron considerable toxicidad. Salazar R et al. (2011), evaluaron la actividad antioxidante de *C. americana* a través de la captura del radical libre 1,1-difenil,1-2-picrilhidrazilo (DPPH) por cromatografía en capa fina y espectrofotometría, mostrando una fuerte actividad antioxidante. Szokol B et al. (2010) evaluaron la actividad antitumoral de lignanos obtenidos a partir de *C. americana*. Este estudio mostró que la arctigenina fue efectiva a dosis de 50 mg/kg en la inhibición del desarrollo de carcinoma colo-rectal C38 en ratones C57BI/6. Por último, Torres G et al. (2011) reportaron la actividad hepatoprotectora del extracto metanólico de flor y tallo/hoja de *C. americana* en células de hepatoma humano (Huh7) en el daño inducido por tetracloruro de carbono (CCl₄). En este estudio se mostró que el pre-tratamiento de las

células Huh7 con el extracto metanólico a concentración de 10, 100 y 1000 ug/mL protegió a las células del daño inducido por el agente tóxico.

1.3 Modelos para la evaluación hepatoprotectora de productos naturales.

Durante los últimos 40 años, varios bioensayos de toxicidad hepática han sido utilizados para la evaluación de la potencial actividad hepatoprotectora de los productos naturales (Jaeschke H et al., 2013). Seleccionar el modelo adecuado y las condiciones experimentales para poder monitorear plantas medicinales, es causa de las investigaciones científicas.

1.3.1 Líneas celulares.

El modelo de líneas celulares involucra el uso de líneas celulares normales y líneas celulares de hepatoma humano (HepG2, Huh-7, Hep3B, FOCUS y SK-Hep 1) (Kikkawa et al., 2005). Las líneas celulares de hepatoma humano han sido propuestas como una alternativa a los hepatocitos humanos como modelos de cultivo celular *in vitro* de hígado normal. Las ventajas potenciales de las células de hepatoma son que, siendo una línea celular inmortalizada, están fácilmente disponibles en grandes cantidades, son fáciles de mantener pues pueden ser criopreservadas y las enzimas metabolizadoras de fármacos no disminuyen en cultivo, como sucede con los cultivos primarios de hepatocitos humanos (Duthie SJ et al., 1994). Sin embargo, una obvia desventaja es que siendo células transformadas, el metabolismo de fármacos y el mecanismo de toxicidad, pudieran ser anormales. A pesar de los defectos enlistados previamente, las células de hepatoma HepG2 han sido ampliamente utilizadas en estudios de función hepática así como de metabolismo y de toxicidad de fármacos (Sassa S et al., 1994; Conover & Leake, 1990). Aunado a ello, las células HepG2 poseen muchas de las características bioquímicas y morfológicas de los

hepatocitos normales (Bouma ME et al., 1989). Debido a que conserva muchas de las características fenotípicas y genotípicas de las células hepáticas, esta línea celular se ha utilizado en varios estudios relacionados con plantas medicinales con potencial actividad hepatoprotectora (Pareek A et al., 2013; Torres L et al., 2011; Krithika R et al., 2009; Thabrew 1997).

1.3.2 Cortes precisos de rebanadas de hígado de rata.

El uso de animales ha sido de gran utilidad durante muchos años. Sin embargo, existe una fuerte presión a nivel mundial para disminuir el uso de animales en experimentación. Una alternativa, es el modelo de rebanadas de tejidos, el cual se basa en la preparación mecánica de rebanadas, con dimensiones y grosor similares entre sí y su posterior cultivo en condiciones controladas (Gandolfi AJ et al., 1996). Las rebanadas así obtenidas representan un sistema *ex vivo* muy valioso en el que se observan características fisiológicas similares a los modelos *in vivo*. Esto se debe principalmente a que en una sola rebanada se encuentran representadas células de todas las zonas del órgano, así como a la conservación de la arquitectura histológica y tridimensional del órgano de origen; conservando además las interacciones célula-célula y con la matriz extracelular original del tejido, por consiguiente, se refleja mejor el complejo nivel de organización biológica dentro del órgano; pero lo más interesante, es que retienen su capacidad metabólica, por lo que son consideradas como mini-órganos (Lerche-Langrand C et al., 2000). Junto con estas ventajas, constituyen un excelente modelo intermedio entre los cultivos *in vitro* y los ensayos *in vivo* que permite disminuir considerablemente el número de animales de experimentación (Carranza-Rosales et al., 2010; Carranza-Rosales et al., 2012).

1.3.3 Animales.

Los animales son buenos sujetos de investigación por varias razones: son biológicamente similares a los seres humanos; son susceptibles a muchos de los mismos problemas de salud; y tienen ciclos de vida cortos, por lo que fácilmente pueden ser estudiados a lo largo de toda su vida útil o a través de varias generaciones. Además, los científicos pueden controlar fácilmente el ambiente alrededor del animal (dieta, temperatura, iluminación, etc.) (Ellenbroek B et al., 2016). Los estudios con animales se realizan en las primeras etapas de una investigación médica para definir en primera instancia los beneficios y las complicaciones de los productos naturales evaluados. Las ratas y ratones han sido los principales animales modelo utilizados en la investigación biomédica, aunque otros animales como los primates no humanos, el pez cebra, la mosca de la fruta y los nematodos también se emplean. De las ratas y ratones, las ratas cepa Wistar y Sprague-Dawley son de principal elección en la investigación de productos naturales con efecto hepatoprotector (Vikran N et al., 2013; Arbab A et al., 2016; Baali N et al., 2016; Chang B et al., 2016).

1.4 Agentes inductores de daño utilizados en los diversos modelos de evaluación hepatoprotectora de productos naturales.

Entre los agentes inductores de daño más utilizados en los diversos modelos de evaluación hepatoprotectora de productos naturales se encuentra el CCl_4 , el acetaminofén (Acet) y la tioacetamida.

1.4.1 Tetracloruro de Carbono.

El CCl_4 es un reactivo químico industrial que está estrictamente regulado en muchos países. El CCl_4 es metabolizado por el citocromo P450 y produce el radical triclorometil que puede unirse a proteínas y ADN, causando daño directamente a estas macromoléculas (Weber et

al., 2003). Este radical puede sustraer un hidrógeno de los ácidos grasos poliinsaturados, formando radicales libres. La adición de O₂ produce radicales peroxilo que pueden reaccionar con otros ácidos grasos poliinsaturados para formar nuevos radicales en un ciclo de propagación (Weber et al., 2003). El resultado es la peroxidación lipídica y la lesión hepática. La administración aguda de una dosis alta de CCl₄ causa necrosis severa, mientras que la administración crónica de dosis bajas es frecuentemente usada para inducir fibrosis y cirrosis hepática.

Diversos estudios reportan la protección de los remedios herbales contra el CCl₄ en pre- y co- tratamiento (Dhanasekara et al., 2009; Risal et al., 2012; Tzeng et al., 2013). Los autores de estos estudios concluyen que la protección de estos remedios herbales es atribuible a la actividad antioxidante y anti-inflamatoria.

1.4.2 Acetaminofén

El Acet es un analgésico y antipirético ampliamente utilizado. Sin embargo, una sobredosis causa hepatotoxicidad según reportes de estudios en humanos y modelos experimentales (Hart SG et al., 1995; Bessems JGM et al., 2001; Larson AM et al., 2005).

La toxicidad es iniciada por el metabolismo del fármaco por el citocromo P450 para producir N-acetil-p-benzoquinoneimina (NAPQI) (Nelson SD et al., 1995). Este metabolito reactivo es detoxificado por el GSH resultando en una gran depleción hepática. Además, NAPQI reacciona con los grupos sulfidrilo de las proteínas, a través de enlace covalente a las proteínas celulares (Dahlin DC et al., 1984), debido a que la mitocondria es el más importante blanco de unión, esta cascada de eventos genera estrés oxidativo mitocondrial. Como consecuencia ocurre la activación de apoptosis a través de la señal regulada por la quinasa 1 y la quinasa c-jun-N-terminal (JNK), así como la amplificación del estrés

oxidativo mitocondrial y formación de peroxinitrito por la translocación mitocondrial de JNK (Reid AB et al., 2005). El extenso estrés oxidativo genera (James LP et al., 2003):

1. Apertura del poro de transición de la permeabilidad de membrana en la mitocondria con el colapso de la membrana
2. Formación de especies reactivas tales como : $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y HO^{\bullet} , especies reactivas de nitrógeno tales como óxido nítrico y peroxinitrito.
3. Productos de reacción de peroxidación.

La pérdida de la permeabilidad de la membrana mitocondrial genera la liberación de proteínas intermembrana tales como endonucleasa G y el factor inductor de apoptosis. Ambas proteínas se translocan al núcleo y causan la fragmentación del ADN. El colapso de la mitocondria que produce depleción de ATP y la fragmentación del ADN son eventos claves en la necrosis celular (Jaeschke et al., 2012; Hinson et al., 2010).

1.5 Justificación.

Las enfermedades hepáticas son un problema importante de salud pública, diversos tratamientos están en desarrollo para tratarlas, sin embargo el alto costo de algunos de ellos y los eventos adversos que pueden presentar , han permitido que la fitoterapia sea cada vez más aceptada para la búsqueda de nuevos tratamientos para este tipo de enfermedades. En la patogénesis de la enfermedad hepática ha sido implicado el estrés oxidativo. Se ha reportado que los radicales libres son causantes del estrés oxidativo y son bloqueados por agentes antioxidantes. Las plantas han mostrado ser una gran fuente de compuestos antioxidantes y México es un país con una gran diversidad de plantas. Por lo que se requiere de información científica sobre la utilidad de las plantas medicinales con potencial actividad hepatoprotectora. Por lo anterior, es importante contar con métodos que aseguren

científicamente dicha actividad a través de ensayos *in vitro* y *ex vivo*, y solo llevar al modelo *in vivo* las de mayor potencial hepatoprotector y disminuir así el número de animales de experimentación.

1.6 Objetivo General.

Evaluar el tratamiento de agentes hepatoprotectores en el modelo *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* contra el daño inducido por acetaminofén y tetracloruro de carbono; y su aplicación en la evaluación de un extracto de *Centaurea americana*.

1.7 Objetivos específicos.

1. Evaluar en el modelo *in vitro* con la línea celular HepG2 el pre-tratamiento de los agentes hepatoprotectores: silimarina, silibinina y Silifos en el daño inducido con tetracloruro de carbono y acetaminofén, para seleccionar el mejor inductor de daño.
2. Evaluar en el modelo *ex vivo* con cortes precisos de rebanas de hígado de rata el tratamiento de los agentes hepatoprotectores: silimarina, silibinina y silifos en el daño inducido con tetracloruro de carbono y acetaminofén, para seleccionar el mejor inductor de daño.
3. Evaluar en un modelo *in vivo* el pretratamiento de los agentes hepatoprotectores en el daño inducido con el agente hepatotóxico seleccionado en los objetivos anteriores.
4. Evaluar la actividad hepatoprotectora, citotóxica y antioxidante de un extracto primario de *Centaurea americana* en el modelo seleccionado en los objetivos anteriores.

CAPITULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material y Equipo

2.1.1 Material General.

- Licuadora Osterizer.
- Embudo Pyrex de vidrio.
- Matraces Erlenmeyer Pyrex de 1000 mL.
- Matraces bola Pyrex de 1000 mL.
- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm.
- Tubos de ensayo de 12 x 75 mm.
- Gradillas.
- Celdas de cuarzo de 1 cm de trayecto óptico.
- Papel filtro Whatman No.1.
- Pipeta multicanal marca Labnet, para volumen de 50 a 300 uL.
- Pipeta automática de volumen ajustable marca BioPet, para volumen de 0.5 a 10 y de 10 a 100 uL.
- Pipeta de volumen ajustable marca Finnpipette, para volumen de 40 a 200 uL
- Pipetas automáticas de volumen ajustable marca Wilson para 200 y 1000 uL
- Puntillas para pipeta automática de volumen ajustable p200, p300, p1000
- Pipetas serológicas estériles, desechables, empaque individual plastificado, con graduación de 1/10 mL, capacidad de 5 y 10 mL. Marca Corning.
- Botella para cultivo celular con ventilación de 75 cm², con capacidad de 300 mL, triangular, cuello recto, tamaño de membrana: 0.22 um. Marca Corning.

- Placas para cultivo celular de 6 pozos, fondo plano, estériles. Marca Corning.
- Tubos de fondo cónico, estériles, graduados, para volumen de 15 y 50 mL. Marca Corning.
- Tubos para microcentrífuga no estériles con graduación hasta 0.65 mL y hasta 2 mL. Marca Corning.

2.1.2 Reactivos y solventes.

- Agua bidestilada.
- Agua miliQ.
- Metanol grado analítico, Fermont
- Acetato de etilo, Fermont Lote 603433.
- Ácido acético glacial grado analítico, Fermont
- Silibinina, Sigma-Aldrich Chemical Co.
- DPPH (Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), Sigma-Aldrich Chemical Co.
- Dimetil sulfóxido, ACS Research Organics Lote W58196.
- Kit comercial “TBARS Assay Kit” de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, E.U.).
- Kit comercial “ Glutación Assay Kit” de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, E.U.).
- Kit comercial “Antioxidant Assay Kit” de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, E.U.).
- Kit comercial “Superoxido Dismutase Assay Kit” de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, E.U.).

- Medio de cultivo Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium; D-MEM). Marca Gibco Invitrogen.
- Suero fetal bovino (serum bovine fetal; SBF). Marca Gibco Invitrogen.
- Tripsina 1x. Marca Gibco Invitrogen.
- Antibiótico 100x (100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina). Marca Gibco Invitrogen.
- Solución salina amortiguadora de fosfatos (phosphate buffer saline; PBS) 1x en tabletas. (10 mM de fosfatos, 150 mM de cloruro de sodio, pH 7.2 a 7.3). Marca Gibco Invitrogen.
- Azul tripano 0.4% Lote 1293059. Marca Gibco Invitrogen.
- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol –2-il)-2,5-difenil-2H- tetrazolium (MTT) LoteX62920. Marca Gibco Invitrogen.
- Buffer salino de fosfatos (PBS) 10x. Marca Gibco Invitrogen.

2.1.3 Equipo.

- Autoanalizador de bioquímica – ILab Aries 300 plus
- Balanza granataria Scout Ohaus
- Balanza analítica Denver Instrument APX-200
- Equipo de rotaevaporación Yamato RE500
- Equipo de rotaevaporación Buchi Modelo 461 con baño de agua Buchi RE 121
- Bomba peristáltica Bio Rad EP1 EconoPump
- Colector automático de muestras Bio Rad 2128
- Centrifuga IEC Micro MB
- Espectrofotómetro UV-Visible

- Campana de Bioseguridad II Tipo A2 Marca Nuaire.
- Centrífuga Thermo Electro Corporation Centra CL2.
- Ultrasonido modelo 2510 marca Branson
- Microscopio Olympus CKX41.
- Incubadora CO₂ Water-Jacketed Incubator Autoflow Marca Nuaire.
- Centrífuga refrigerada Heraeus Biofuge primo R.
- Baño de ultrasonido Branson 3510.
- Agitador mecánico Labnet Vortex VX100.
- Lector de microplacas Thermo Scientific Multiskan FC Modelo 357.
- Agitador mecánico Daigger Model 22406.
- Estufa Marca Blue M.
- Ultracongelador So-Low a - 80°C.
- Lámpara de LUV Spectroline ENF 260C.
- Polarímetro Perkin Elmer Modelo 341.

2.1.4 Material Biológico.

2.1.4.1. Línea parental de carcinoma hepatocelular humano HepG2.

Se utilizó la línea parental de Carcinoma hepatocelular humano HepG2 obtenida del Laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad, Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de México, Ciudad de México.

2.1.4.2. Ratas Wistar

Se utilizaron ratas Wistar de género indistinto entre 200-300 g de peso, para la obtención de hígado en el proceso de las rebanadas precisas de hígado, así como para los experimentos *in vivo* de inducción de daño con CCl₄ o Acet.

2.1.5 Material vegetal

Se realizó la colecta de la flor de *C. americana* en mayo-junio del año 2013 en el Barrial, Villa de Santiago, N.L. Un espécimen de la planta fue llevado al Herbario Institucional de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León para determinar su clasificación taxonómica correcta.

La planta se secó a temperatura ambiente por dos semanas, y trascurrido este tiempo se molió finamente la flor de la planta en licuadora. Una vez molido el material se almacenó en bolsas etiquetadas con la fecha y el lugar de recolección, para su posterior uso.

2.2 Métodos.

2.2.1 Cultivo celular.

Las células HepG2 fueron mantenidas en crecimiento en medio Dulbecco Eagle modificado (D-MEM) advance, suplementado con suero fetal bovino (10%), penicilina G (100 UI/mL), estreptomycin G (100 ug/mL) y 1% aminoácidos esenciales, a 37 °C en una atmosfera húmeda con 95% de O₂ y 5% de CO₂ hasta una confluencia de 70% a 80%.

2.2.1.1 Congelamiento de línea celular HepG2

1. Se retiró el medio de cultivo D-MEM advance de la botella con 70% a 80% de confluencia celular, utilizando una pipeta pasteur acoplada a la bomba de vacío.
2. Las células se lavaron con 5 mL de PBS 1x ó con medio D-MEM no suplementado, y posteriormente se retiró dicho volumen.
3. Se agregó 3 mL de tripsina 1x a las botellas T-75 cm² y se incubó durante 5 minutos a 37°C o el tiempo necesario para que las células se despegaran de la

superficie de la botella de cultivo (nunca fue mayor de 15 min., pues podían dañarse las células).

4. Las células de un par de botellas se colectaron en un tubo falcón de 15 mL y se centrifugaron durante 5 min. a 2000 revoluciones por minuto (rpm).
5. Una vez centrifugado el tubo se retiró la tripsina y se re-suspendió suavemente el botón de células con 3,700 uL de SFB si se utilizaron 2 frascos de T-75 cm².
6. Se agregó 75 uL de DMSO (con el propósito de preservar la membrana celular al conservar a -80°C) a un criotubo y añadieron 925 uL de suspensión de células en SFB.
7. Se homogeneizó con la punta de la pipeta.
8. Inmediatamente se colocó en hielo y una vez terminado el procedimiento para todos los crioviales, las células contenidas en los crioviales se preservaron a -80°C.

2.2.1.2 Mantenimiento de la línea celular HepG2

1. Se siguió el procedimiento descrito previamente para congelamiento hasta el punto 4.
2. Una vez centrifugado el tubo se retiró la tripsina y se re-suspendió suavemente el botón de células con 1 mL de medio DMEM-advance suplementado con 10% de SBF y 1% antibiótico.
3. Se tomó una alícuota del volumen contenido en el tubo y se agregó a una nueva botella de cultivo que contenía previamente 9 mL de medio suplementado.

4. Se colocó en la incubadora en condiciones estándar (37°C, 95% de humedad y 5% de CO₂) y se verificó crecimiento celular al día siguiente por medio del invertoscopio a 40x.

2.2.2 Plaqueo celular

1. Se siguió el procedimiento descrito antes para el congelamiento celular hasta el punto 4.
2. A partir de la suspensión celular obtenida se tomó 10 uL y se agregó a un tubo que contenía 70 uL de azul tripano (siendo la dilución realizada 1:8).
3. De la dilución anterior se tomó 10 µL y se colocó en una cámara de Neubauer, para realizar el conteo.
4. El conteo se realizó tomando en cuenta solamente las células no teñidas con el colorante azul tripano.
5. El conteo celular se realizó en los cuadrantes 1, 2, 3 y 4 de la cámara de Neubauer.
6. Se realizó el conteo por duplicado.
7. Se calculó el número de células de acuerdo a la ecuación 1:
(Ecuación 1) Células / mL = (Total de células por cuadrante) (factor de dilución) (10⁴)
8. De acuerdo a los cálculos obtenidos se tomó la cantidad de células requeridas para cada bioensayo en placas de cultivo celular.
9. Las placas de cultivo que contenían las células se incubaron a una temperatura de 37°C y a una atmósfera húmeda de 5% de CO₂, durante 12 h.

2.2.3 Medición de viabilidad celular

Para evaluar la viabilidad celular se realizó la prueba de reducción de MTT descrita por Mosmann (1983). Este análisis colorimétrico se basó en la conversión de la sal de tetrazolium (MTT; bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol -2-il)-2,5-difeniltetrazolium), un substrato de color amarillo claro, a cristales púrpura de formazan. La reacción de reducción celular implicó los cofactores de nucleótidos de piridina $\text{NAD}^+/\text{NADPH}$ y la enzima mitocondrial deshidrogenasa, que solo ocurre en las células vivas (Figura 2). El producto de formazan es impermeable a la membrana celular, acumulándose dentro de la célula. Los cristales de formazan salen de la célula cuando se agrega un agente de lisis, permitiendo la cuantificación del producto formado. La intensidad del producto medido a 540 nm fue directamente proporcional al número de células vivas en cultivo (Mosmann T., 1983).

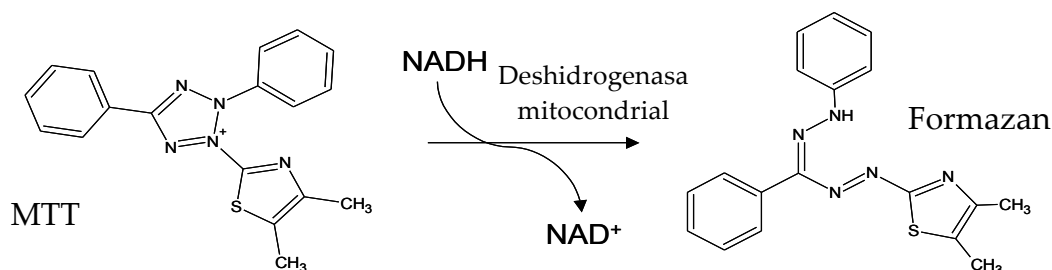


Figura 2. Reducción de MTT.

El siguiente procedimiento se realizó en placa de poliestireno de fondo plano de 96 pozos:

1. Se sembró 50,000 células/pozo.
2. Al día siguiente se retiró el medio de cultivo y se expusieron a diferentes concentraciones a evaluar por triplicado en 3 días diferentes. Se incluyó un control de esterilidad, constituido por medio de cultivo suplementado sin tratamiento alguno.

3. Tras el tiempo de tratamiento a evaluar, se retiró el sobrenadante y se lavó con amortiguador salino de fosfatos 1x.
4. Se agregó a cada pozo 150 uL de MTT (0.5mg/mL) recién preparado y se incubó por 2.5 h, bajo condiciones estándar de cultivo.
5. Se retiró la solución por succión con sistema de vacío y se lavaron los pozos con amortiguador salino de fosfato 1x.
6. Se agregó 250 uL de DMSO en cada pozo para disolver los cristales de formazan.
7. Se mezcló durante 30 segundos en el agitador del lector de microplacas.
8. Se determinó la absorbancia a 540 nm en lector de microplacas.

2.2.4 Medición de enzimas hepáticas

La actividad de las enzimas fue determinada en el equipo ILAB- 300 plus, Clinical Chemistry System. De acuerdo al fabricante, en la determinación de la aspartato amino transferasa (AST), el grupo amino del L-aspartato es transferido al alfa-cetoglutarato en la presencia de piridoxal-5-fosfato para producir glutamato y oxalacetato. El oxalacetato formado es convertido a malato por la malato deshidrogenasa en la presencia de dinucleótido de nicotiamida adenina reducido (NADH), el cual es oxidado a NAD^+ . La tasa de oxidación del NADH fue monitoreada por espectrofotometría a 37°C y fue utilizada para calcular la actividad de la enzima por el equipo.

Por otra parte, de acuerdo al fabricante en la determinación de la alanino amino transferasa (ALT), el grupo amino de la L-alanina es transferido a alfa-cetoglutarato en la presencia de piridoxal-5-fosfato para producir glutamato y piruvato. El piruvato formado es convertido a lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH) en presencia de NADH, el cual es oxidado a

NAD⁺. La tasa de oxidación del NADH es monitoreado por espectrofotometría a 37°C. La tasa de cambio es utilizado para calcular la actividad de la enzima. En la determinación de la LDH, el piruvato es convertido a lactato por esta enzima en presencia de NADH, el cual es oxidado a NAD⁺. La tasa de oxidación de NADH fue monitoreado por espectrofotometría a 37°C y fue utilizada para calcular la actividad enzimática por el equipo.

2.2.5 Medición de peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica se determinó con el Kit comercial “TBARS Assay Kit” de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, E.U.).

El kit de ensayo TBARS Cayman se basa en la medición colorimétrica a 540 nm de los aductos formados por la reacción de MDA y ácido tiobarbitúrico (TBA) en condiciones de alta temperatura (90°C -100°C) y acidez.

Procedimiento

1. Se mezclaron 100 uL de muestra o estándar de MDA a diferentes concentraciones de 0.625 a 50 uM con 100 uL de solución de disulfato de sodio y 4 mL de reactivo de color en tubos previamente identificados.
2. Se colocaron los tubos en baño de ebullición por 1 h.
3. Después de este tiempo, los tubos se colocaron en hielo durante 10 min para detener la reacción.
4. Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 3500 r.p.m. a 4°C por 10 min. A partir de los tubos centrifugados se tomaron 150 uL y se colocaron en placa de poliestireno de fondo plano de 96 pozos. Se midió la absorbancia de cada pozo a 540 nm.

Los valores de MDA (uM) para cada muestra fueron calculados a partir de la ecuación de la recta obtenida de la regresión lineal de la curva estándar por sustitución del valor de la absorbancia para cada muestra en la ecuación.

2.2.6 Medición de capacidad antioxidante total

La capacidad antioxidante total (CAO-T) de la célula HepG2 se determinó con el Kit comercial “Antioxidant Assay Kit” de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, E.U.).

El kit de ensayo Antioxidante de Cayman se basa en la capacidad de los antioxidantes en la muestra para inhibir la oxidación de ABTS (Sulfonato 2,2'-azino-di-3-etilbenziazolin) a $ABTS^{*+}$ por la metmioglobina. La cantidad de $ABTS^{*+}$ producida es medida por la lectura de absorbancia a 405 nm. Bajo las condiciones de reacción utilizadas por la determinación con el kit, los antioxidantes en la muestra causan supresión de la absorbancia a 405 nm y esto fue proporcional a la concentración que tenía. La capacidad antioxidante de las células HepG2 para prevenir la oxidación del ABTS se comparó con el Trolox, un análogo de tocoferol, y se cuantifico como equivalentes de Trolox (mM).

Procedimiento.

1. Se prepararon los reactivos necesarios de acuerdo a las instrucciones del proveedor de acuerdo al inserto.
2. Posteriormente, se mezcló 10 uL de estándar de trolox a diferentes concentraciones de 0.045 a 0.330 mM o de sobrenadante de células sonicadas y 10 uL de metmioglobina y 150 uL de cromógeno en cada pozo de una placa de poliestireno de 96 pozos, según se haya definido.
3. Se inició la reacción por adición de 40 uL de peróxido de hidrógeno y después de 5 min de agitación a temperatura ambiente, se realizó la lectura a 405 nm utilizando un lector de placa.

Los valores de equivalentes de trolox (mM) para cada muestra fueron calculados a partir de la ecuación de la recta obtenida de la regresión lineal de la curva estándar por sustitución del valor de la absorbancia para cada muestra en la ecuación.

2.2.7 Medición de superóxido dismutasa

La actividad de la superóxido dismutasa (SOD) se determinó a través de la medición colorimétrica del cristales de formazan a 450 nm con el Kit comercial “Superoxido Dismutase Assay Kit” de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, E.U.).

Este ensayo emplea una sal de tetrazolium para la detección de radicales superóxido generados por la xantina oxidasa e hipoxantina. Una unidad de SOD es definida como la cantidad de enzima necesaria para exhibir el 50% de dismutación del radical superóxido. El ensayo tiene la capacidad de evaluar los tres tipos de SOD (Cu/Zn, Mn y Fe).

Procedimiento

1. Se mezclaron 200 uL de detector radical diluido y 10 uL de estándar a diferentes concentraciones de 0.025 a 0.25 U/mL o 10 uL de muestra en el pocillo asignado en la placa de poliestireno de fondo plano de 96 pozos.
2. Se inició la reacción por adición de 20 uL de xantina oxidasa diluida a todos los pozos lo más rápido posible.
3. Se mezcló cuidadosamente por 10 segundos y se cubrió la placa con un protector.
4. Se incubó por 20 min a temperatura ambiente. Posterior a este tiempo se realizó la lectura de absorbancia a 450 nm utilizando un lector de microplaca.

La actividad de la SOD para cada muestra fue calculada a partir de la ecuación de la recta obtenida de la regresión lineal de la curva estándar por sustitución del valor de la absorbancia para cada muestra en la ecuación.

2.2.8 Medición de glutatión.

La cuantificación de GSH se determinó con el Kit comercial “Glutathione Assay Kit” de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, E.U.).

Este ensayo emplea un método optimizado de reciclaje enzimático, utilizando glutatión reductasa. El grupo sulfidrilo del GSH reacciona con el ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DNTB) y produce un color amarillo del ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB). El disulfido GSTNB es reducido por la glutatión reductasa para reciclar el GSH y producir TNB. La tasa de producción de TNB es directamente proporcional a esta reacción de reciclaje y esta a su vez directamente proporcional a la concentración de GSH en la muestra. La medición de la absorbancia de TNB a 405 nm da una estimación precisa del GSH en la muestra.

Procedimiento

1. Se mezclaron 50 uL de estándar de GSH a diferentes concentraciones de 0.5 a 16 uM o muestra y 150 uL de mezcla de ensayo recién preparado.
2. Se incubó en oscuridad y se realizaron lecturas de absorbancia cada 5 minutos durante 30 minutos (6 mediciones) a 405 nm.

La mezcla de ensayo se preparó mezclando amortiguador de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (11.25mL), cofactor reconstituido (0.45mL), enzima reconstituida (2.1 mL), agua (2.3 mL) y DTNB reconstituido (0.45mL). Este se utilizó en máximo 10 minutos desde su preparación.

La actividad del GSH para cada muestra fue determinada por la interpolación en una curva de regresión lineal del estándar TNB.

2.2.9 Manejo de animales

El manejo de los animales fue realizado de acuerdo con las Guías de producción, cuidado y uso de animales de laboratorio y de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-Z00-1999 publicada en el Diario Oficial Federal publicado en agosto 22 de 2001. Todos los protocolos utilizados en esta investigación fueron aprobados por el comité de ética de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Dr. José E. González”. Los experimentos fueron realizados en ratas Wistar con peso de 200-300 g. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones estándar, tales como temperatura ambiente estable ($24 \pm 3^{\circ}\text{C}$), y ciclos de 12 h de luz/oscuridad y con acceso a alimento comercial y agua *ad libitum*.

2.2.10 Preparación de cortes precisos de rebanadas de hígado de rata.

Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad. Se administró a las ratas una sobredosis de pentobarbital sódico vía intraperitoneal, una vez en anestesia profunda, se disecó el hígado y se colocó en amortiguador Krebs-Bicarbonato (KB) a pH 7.4, estéril y a 4°C . Posteriormente se obtuvieron cilindros de tejido de 10 mm de diámetro los cuales se colocaron en el porta muestras del rebanador Brendel-Vitron, a través del cual se hizo recircular amortiguador KB a 4°C y una mezcla de gas ($95\%\text{O}_2/5\%\text{CO}_2$) a velocidad de flujo de 0.75 -1.0 L/min. Se prepararon rebanadas de hígado de 10 mm de diámetro y 300 μm de grosor, las cuales fueron colectadas en el amortiguador KB a 4°C . A partir de estas rebanadas se prepararon “chips” de tejido de 4 mm de diámetro. Se colocó un chip de tejido por cada pozo de una microplaca de 24 pozos con 1 ml de medio de cultivo D-MEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal de bovino, 25 mM de glucosa y una mezcla de insulina-transferrina-selenio, se incubaron a 37°C con 5% de $\text{CO}_2/95\%$ de aire y agitación de 25 rpm.

2.2.11 Análisis histológico.

El tejido hepático obtenido de las ratas Wistar tratadas fue embebido en bloques de parafina utilizando el método convencional. Los bloques fueron seccionados para obtener cortes de 5 mm y teñidos con hematoxilina-eosina. Los cortes fueron observados en microscopía de luz por una Patóloga experta en el tema para identificar cambios histológicos de daño por CCl₄ incluyendo degeneración balonoide, necrosis lítica, necrosis confluyente, necrosis submasiva, esteatosis microvesicular, esteatosis macrovesicular e infiltración inflamatoria linfocítica. Se calculó el porcentaje de células necróticas a partir del número de células necróticas o apoptóticas observadas en 3 diferentes campos (40X); a partir de zonas 1-3, 50 células fueron contadas en cada zona.

2.2.12 Evaluación de citotoxicidad.

2.2.12.1 Evaluación de citotoxicidad en la línea celular HepG2

Para ello las células HepG2 se mantuvieron en condiciones estándar (2.2.1). A una confluencia de 80-90%, las células fueron tripzinizadas y plaqueadas a 50, 000 células o 500, 000 células o 5 millones de células por pozo según fuera requerido para los bioensayos (2.2.1.3). Entonces se probaron la concentración de 10, 100 y 1000 ug/mL de extracto de *C. americana* o 50, 100 y 150 µg/mL de SLF, SLM o SLB en PBS1x o medio de cultivo durante 1 h o 12 h, el cual fue utilizado como control de crecimiento. Se determinaron las enzimas AST, ALT y LDH en el medio de cultivo (2.2.4), se determinó en las células: viabilidad celular (2.2.3), peroxidación lipídica (2.2.5), CAO-T(2.2.6), SOD (2.2.7) y GSH (2.2.8) de acuerdo a cada kit comercial de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, E.U.). No se consideraron citotóxicas las concentraciones en la cuales se observó una viabilidad >60%, niveles de AST <50 UI/L,

ALT<30 UI/L, antioxidantes totales >2 mM, y niveles de MDA, SOD, GSH similares al GC de acuerdo a lo reportado por Torres-González L et al., 2011.

2.2.12.2 Evaluación de citotoxicidad en cortes precisos de rebanadas de hígado de rata

Los cortes precisos de rebanadas de hígado de rata (CPHR) se obtuvieron de acuerdo a lo descrito en la sección 2.2.10. Después de 1 hora de pre-incubación a 37 °C, las rebanadas fueron transferidas a microplacas de 24 pozos las cuales contenían, por separado, medio de cultivo (control sin tratamiento), 10, 100 y 1000 ug/mL de extracto de *C. americana* o 50, 100 y 150 ug/mL de SLF, SLM o SLB en medio de cultivo, utilizando como control de citotoxicidad CPHR con CCl₄. Se incubaron durante 12 horas a 37 °C con 5% de CO₂/95% de aire y agitación de 25 rpm. Transcurrido este tiempo, se colectaron muestras de sobrenadantes del medio donde se cultivaron las rebanadas para realizar la medición de enzimas hepáticas (sección 2.2.4). Por otra parte, las rebanadas se fijaron en formol neutro al 10%, para realizar el análisis histológico (sección 2.2.11). Así mismo, se determinó en la células: viabilidad celular (2.2.3), peroxidación lipídica (2.2.5), CAO-T (2.2.6), SOD (2.2.7) y GSH (2.2.8) de acuerdo a cada kit comercial de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, E.U.).

2.2.13 Efecto de tetratrocloreuro de carbono

2.2.13.1 Efecto del tetratrocloreuro de carbono en la línea celular HepG2

Las células HepG2 se mantuvieron en condiciones estándar (2.2.1) A una confluencia de 80-90%, las células fueron tripzinizadas y plaqueadas a 50,000 o 500,000 o 5 millones de células por pozo según fuera requerido para los bioensayos (2.2.1.3).

Entonces se probaron la concentraciones de 20 mM, 30 mM y 40 mM de CCl₄ por tiempo de 1 h, 1 h 30 min, 2 h y 3 h. Se determinaron las enzimas AST, ALT y LDH en el medio de cultivo

(2.2.4), se determinó en las células: viabilidad celular (2.2.3), peroxidación lipídica (2.2.5), CAO-T (2.2.6), SOD (2.2.7) y GSH (2.2.8) en el daño inducido de acuerdo a cada kit comercial de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, E.U.). El procedimiento fue realizado 9 veces en días diferentes.

2.2.13.2 Efecto del tetracloruro de carbono en cortes precisos de rebanadas de hígado de rata

Los cortes precisos de rebanadas de hígado se obtuvieron de acuerdo a lo descrito en la sección 2.2.10. Después de 1 hora de pre-incubación a 37 °C, las rebanadas fueron transferidas a microplacas de cultivo celular de 24 pozos las cuales contenían: 1) medio de cultivo (GC), 2) CCl₄ a concentraciones de 20 mM, 30 mM y 40 mM. Cada concentración fue evaluada por 1 h, 1 h 30 min, 2 h y 3 h. Se determinaron las enzimas AST, ALT y LDH en el medio de cultivo (2.2.4) y la viabilidad celular (2.2.3), a fin de establecer daño. Una vez establecido daño por incremento de enzimas y disminución de viabilidad, en el homogenizado de las rebanadas se determinó peroxidación lipídica (2.2.5), CAO-T (2.2.6), SOD (2.2.7) y GSH (2.2.8) de acuerdo a cada kit comercial de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, E.U.). No se consideraron citotóxicos cuando se observó una viabilidad >60%, niveles de AST <50 UI/L, ALT<30 UI/L, antioxidantes totales >2 mM, y niveles de MDA, SOD, GSH similares al GC de acuerdo a lo reportado por Torres-González L et al (2011).

2.2.14 Efecto de acetaminofén

2.2.14.1 Efecto del acetaminofén en la línea celular HepG2.

Las células HepG2 se mantuvieron en condiciones estándar (2.2.1). A una confluencia de 80-90% , las células fueron tripzinizadas y plaqueadas a 50,000 o 500,000 o 5 millones de células por pozo según fuera requerido para los bioensayos (2.2.1.3).

Se evaluaron diferentes concentraciones de Acet (2 mM, 4 mM y 8 mM). Cada concentración se evaluó a 12 h, 24 h, 48 h y 72 h en medio D-MEM. Transcurrido cada tiempo, se determinaron las enzimas AST, ALT y LDH en el sobrenadante (2.2.4), se determinó en las células: viabilidad celular (2.2.3), peroxidación lipídica (2.2.5), CAO-T (2.2.6), SOD (2.2.7) y GSH (2.2.8) en el daño inducido de acuerdo a cada kit comercial de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, E.U.).

2.2.14.2 Efecto de acetaminofén en cortes precisos de rebanadas de hígado de rata.

Los cortes precisos de rebanadas de hígado se obtuvieron de acuerdo a lo descrito en la sección 2.2.10.

Después de 1 h de pre-incubación a 37 °C, las rebanadas fueron transferidas a microplacas de cultivo celular de 24 pozos las cuales contenían: 1) medio de cultivo (GC), 2) Acet a concentración de 2 mM, 4 mM y 8 mM.

Cada concentración fue evaluada al transcurrir 12 h, 24 h, 48 h. Transcurrido cada tiempo, se determinaron las enzimas AST, ALT y LDH en el medio de cultivo (2.2.4) y la viabilidad celular (2.2.3), a fin de establecer daño. Una vez establecido daño por incremento de enzimas y disminución de viabilidad, al homogenizado de las rebanadas se le determinó: peroxidación lipídica (2.2.5), CAO-T (2.2.6), SOD (2.2.7) y GSH (2.2.8) de acuerdo a cada kit comercial de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, E.U.).

2.2.15 Evaluación de la actividad hepatoprotectora.

2.2.15.1 Evaluación de la actividad hepatoprotectora en la línea celular HepG2.

Para ello las células HepG2 se mantuvieron en condiciones estándar (2.2.1) a una confluencia de 80-90%, las células fueron tripzinizadas y plaqueadas a 50,000 o 500,000 o 5 millones de células por pozo según fuera requerido para los bioensayos (2.2.1.3).

Entonces se probaron las concentraciones de 10, 100 y 1000 ug/mL de extracto de *C. americana* o 50, 100 y 150 ug/mL de SLF, SLM o SLB en PBS1x o medio de cultivo durante 1 h o 12 h . Posteriormente se agregó la concentración de CCl₄ 40 mM por 1 hora 30 min.

Después se determinaron las enzimas AST, ALT y LDH en el medio de cultivo (2.2.4) y en las células: viabilidad celular (2.2.3), peroxidación lipídica (2.2.5), CAO-T (2.2.6), SOD (2.2.7) y GSH (2.2.8) en el daño inducido de acuerdo a cada kit comercial de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, E.U.).

2.2.15.2 Evaluación de la actividad hepatoprotectora en cortes precisos de rebanadas de hígado de rata

Los cortes precisos de rebanadas de hígado se obtuvieron de acuerdo a lo descrito en la sección 2.2.10. Después de 1 hora de pre-incubación a 37 °C, las rebanadas fueron transferidas a microplacas de 24 pozos las cuales contenían, por separado, medio de cultivo (control sin tratamiento), 10, 100 y 1000 µg/mL de extracto de *C. americana* o 50, 100 y 150 ug/mL de SLF, SLM o SLB en medio de cultivo durante 1 h o 12 h. Posteriormente, se agregó la concentración de CCl₄ 40 mM por 1 hora 30 min a 37 °C con 5% de CO₂/95% de aire y agitación de 25 rpm. Transcurrido este tiempo, se colectaron las muestras de los sobrenadantes donde se cultivaron las rebanadas para realizar la determinación de las enzimas AST, ALT y

LDH en el medio de cultivo (2.2.4), viabilidad celular (2.2.3), en el tejido: peroxidación lipídica (2.2.5), CAO-T (2.2.6), SOD (2.2.7) y GSH (2.2.8) en el daño inducido de acuerdo a cada kit comercial de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, E.U.).

2.2.15.3 Actividad hepatoprotectora en ratas Wistar

Las ratas Wistar fueron divididas en los siguientes grupos (n=5 cada uno): Grupo de toxicidad el cual recibió CCl₄/aceite de oliva (1:1, 1ml/kg, i.p.), este grupo fue sacrificado después de 24 h para obtener las muestras de sangre y tejido hepático; los otros grupos recibieron solución fisiológica (1 ml/kg, v.o.) (CN), SLM+CCl₄, SLF+CCl₄, SLB+CCl₄ a dosis de 70 mg/Kg cada 12h cada uno. Para evaluar el efecto hepatoprotector de los compuestos o extractos cada uno fue administrado durante 3 días consecutivos (70 mg/Kg cada 12h) y entonces se administró CCl₄/aceite mineral (1:1, 1 ml/kg, i.p.). Las ratas fueron sacrificadas 24 h después de la inyección de CCl₄ para obtener el tejido hepático tras la anestesia con pentobarbital sódico (35 mg/kg, i.p.) y 3 mL de sangre fueron obtenidos de la aorta abdominal de cada rata. Las muestras de suero fueron obtenidas por centrifugación a 3500 r.p.m. por 10 minutos y fueron almacenadas a -20°C hasta su análisis. Los hígados fueron seccionados cuidadosamente y transferidos inmediatamente a solución de formol al 10% en amortiguador de fosfato para su fijación o para homogeneizar. El análisis histológico fue realizado en tejido fijado en formol con amortiguador de fosfatos. Así se determinó en el homogenizado de tejido la actividad de enzimas hepáticas (sección 2.2.4), peroxidación lipídica (2.2.5), CAO-T (2.2.6), SOD (2.2.7) y GSH (2.2.8) de acuerdo a cada kit comercial de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, E.U.).

2.2.16 Obtención de extracto metanólico de *C. americana*.

Al material previamente molido (50 g), se realizaron 3 extracciones con metanol (2 con 350 mL y una con 300 mL) bajo agitación constante por 1 h. Los extractos se filtraron por gravedad y el solvente fue eliminado a presión reducida a 37°C. Se recuperó el extracto por raspado, se secó en estufa y posteriormente se almacenó a -20°C hasta su uso. Se calculó el porcentaje de recuperación del extracto metanólico obtenido.

2.2.17 Medición de flavonoides totales.

La determinación de flavonoides totales se realizó midiendo la absorción del extracto metanólico a 415 nm después de haberlo tratado con AlCl_3 .

Procedimiento.

1. Se rotularon los tubos correspondientes por utilizar.
2. Se preparó una solución de extracto a una concentración de 1 mg/mL en metanol al 100%, como control positivo se utilizó la quercetina.
3. Se realizó diluciones seriadas a partir de la solución de quercetina 1 mg/mL para obtener concentraciones desde 10 y 50 $\mu\text{g/mL}$.
4. Se preparó una solución de AlCl_3 al 10% y HCl al 10%
5. Se mezcló 750 μL del extracto o dilución de quercetina, 25 μL de AlCl_3 al 10%, 25 μL de HCl al 10% y 700 μL de agua destilada.
6. Se dejó reaccionar durante 30 min.

Una vez transcurrido el tiempo se midió la absorbancia a 415 nm. Calculando la concentración del contenido de flavonoides considerando las diversas diluciones realizadas y la curva de regresión con quercetina.

2.2.18 Medición cualitativa y cuantitativa de la actividad antioxidante.

La medición cualitativa de la actividad antioxidante de cada extracto se evaluó en cromatografía en capa fina utilizando como revelador una solución de DPPH, en donde las bandas antioxidantes aparecieron como color amarillo en un fondo violeta.

Para ello, se preparó 1 mL de una solución de 1 mg/mL de cada extracto. Se sembró 5 μ L de cada solución en cromatografía en capa fina sílica gel 60 F-254. La cromatografía se eluyó con la fase móvil con acetato de etilo: agua: ácido acético: ácido fórmico (25:1:1:3) y se visualizó bajo luz UV (254 nm y 365 nm). Se reveló con una solución de DPPH (2 mg/mL en etanol) a fin de ver capacidad antioxidante.

La medición cuantitativa de la actividad antioxidante de cada extracto se evaluó en términos de la capacidad de captura de radicales libres, usando el radical DPPH, de acuerdo a lo descrito por Salazar et al. (2011).

Procedimiento.

1. Se preparó una solución de cada extracto a una concentración de 1 mg/mL en metanol al 100%, como control positivo se utilizó la quercetina.
2. Se realizaron diluciones seriadas a partir de la solución de extracto de 1 mg/mL para obtener concentraciones desde 0.234 hasta 200 μ g/mL.
3. Se preparó una solución de DPPH a una concentración de 125 μ M en metanol al 100%.

4. Se mezcló 500 uL de la dilución y 500 uL del DPPH, se dejó en oscuridad por 30 min.
5. Una vez transcurrido el tiempo se midió la absorbancia de la muestra a 517 nm en un espectrofotómetro Jenway 6320 D (Burlington, E.U.).

La actividad de reducción del radical libre se calculó utilizando la ecuación 2:

(Ecuación 2) $\% \text{ de reducción} = (\text{Abs control} - \text{Abs muestra}) / \text{Abs control} \times 100$

Se graficó el porcentaje de reducción en función de la concentración. La concentración del extracto que redujo al 50 % la actividad del radical libre DPPH, se obtuvo por interpolación. La actividad se expresó como la concentración del extracto que redujo efectivamente el 50 % del radical DPPH (CE_{50}).

2.2.19 Análisis estadístico

Todas las variables fueron medidas por triplicado y los experimentos fueron repetidos al menos 3 veces en días distintos. Los resultados son expresados como media \pm desviación estándar. Los datos fueron analizados utilizando Prueba T, modelo lineal multivariable y método de correlación de Pearson donde fuera aplicable. Se emplearon el programa de Microsoft Excel para prueba T y SPSS software (v.15.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) para los otros análisis. Una $P < 0.05$ fue considerada como significativa.

CAPITULO III

RESULTADOS

3.1 Efecto de tetracloruro de carbono en la línea celular HepG2.

El efecto del CCl₄ en las células HepG2 a dosis de 20, 30 y 40 mM durante 1 h, 1 h 30 min, 2 h y 3h se muestra en las figuras 3 a la 6. Las células HepG2 expuestas a CCl₄ mostraron un incremento significativo de AST, LDH, MDA y reducción significativa en los niveles de antioxidantes totales, SOD y GSH en los tiempos evaluados. La ALT no mostró cambios a ninguna concentración y tiempo.

Se seleccionó la dosis de CCl₄ de 40 mM por 1 h 30 min para inducción de daño, con base en los resultados de viabilidad <60%, AST > 80 UI/L y LDH >500 UI/L (figura 4).

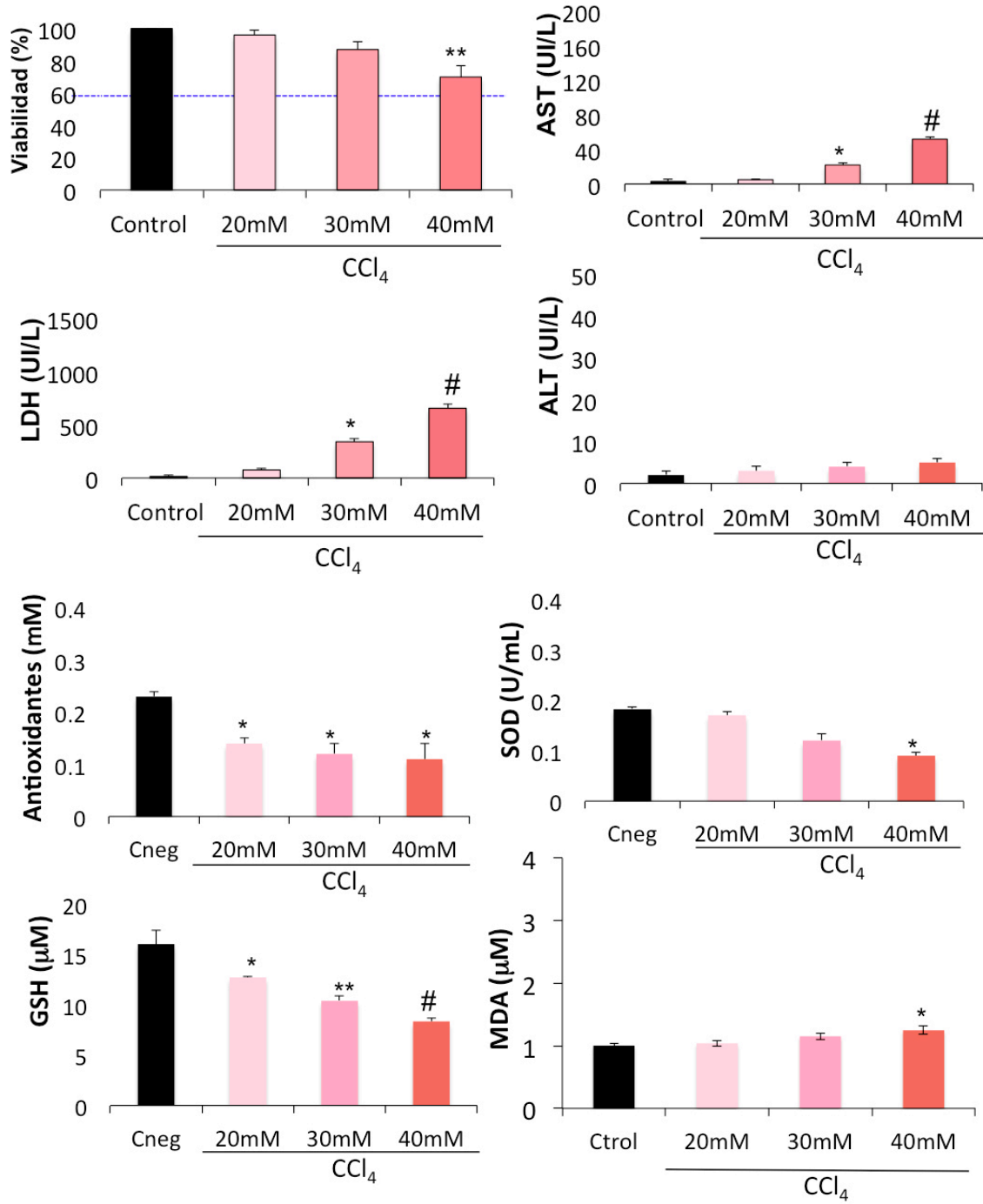


Figura 3. Efecto de CCl₄ a concentración de 20, 30 y 40 mM por 1 h en la línea celular HepG2. Los valores son expresados como media ± D.E. *Tratamiento vs GC, $P < 0.05$; ** Tratamiento vs GC, $P = 0.001$; # Tratamiento vs GC, $P < 0.001$

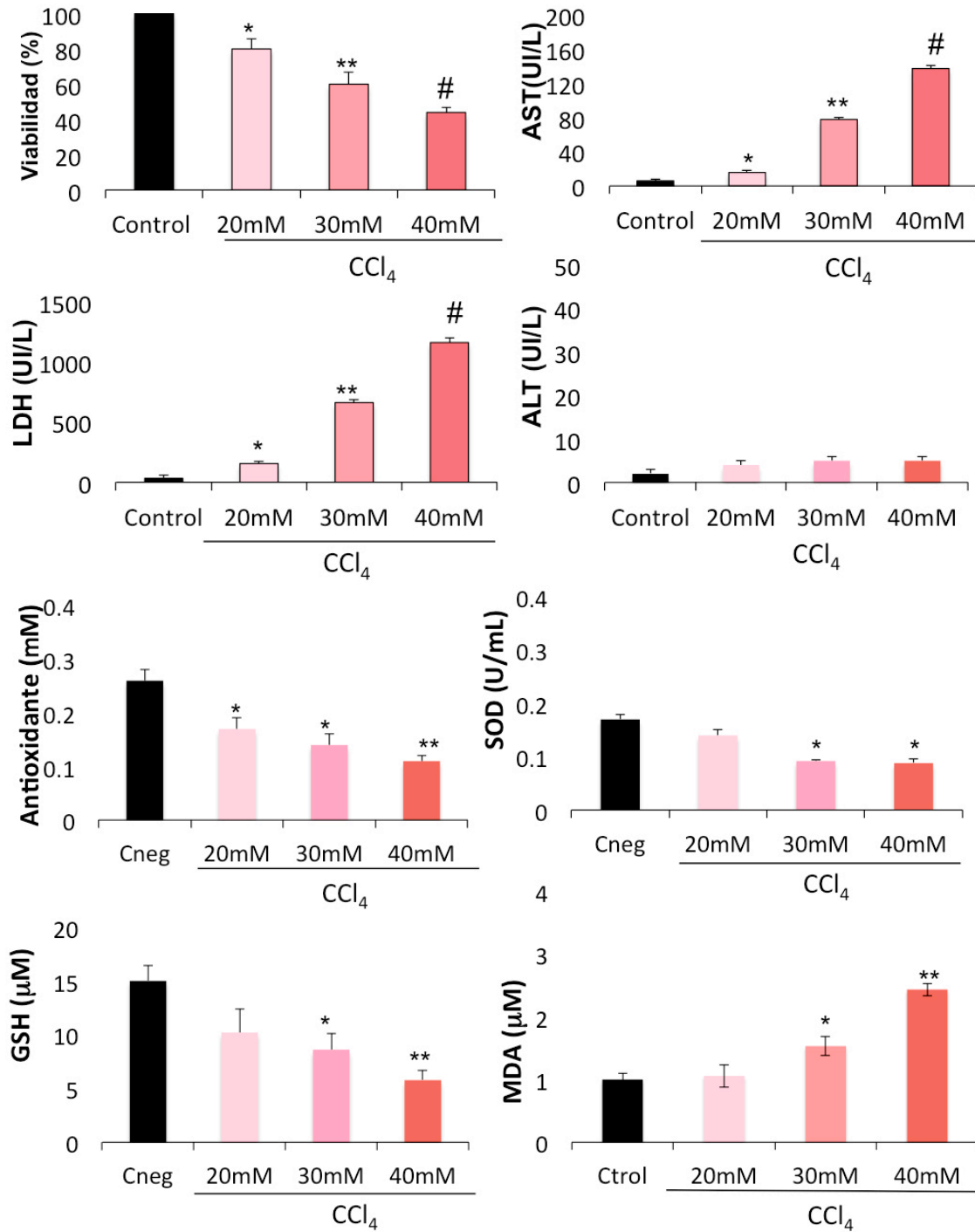


Figura 4. Efecto de CCl₄ a concentración de 20, 30 y 40 mM por 1 h 30 min en la línea celular HepG2. Los valores son expresados como media ± D.E. * Tratamiento vs GC, $P < 0.05$; ** Tratamiento vs GC, $P = 0.001$; # Tratamiento vs GC, $P < 0.001$

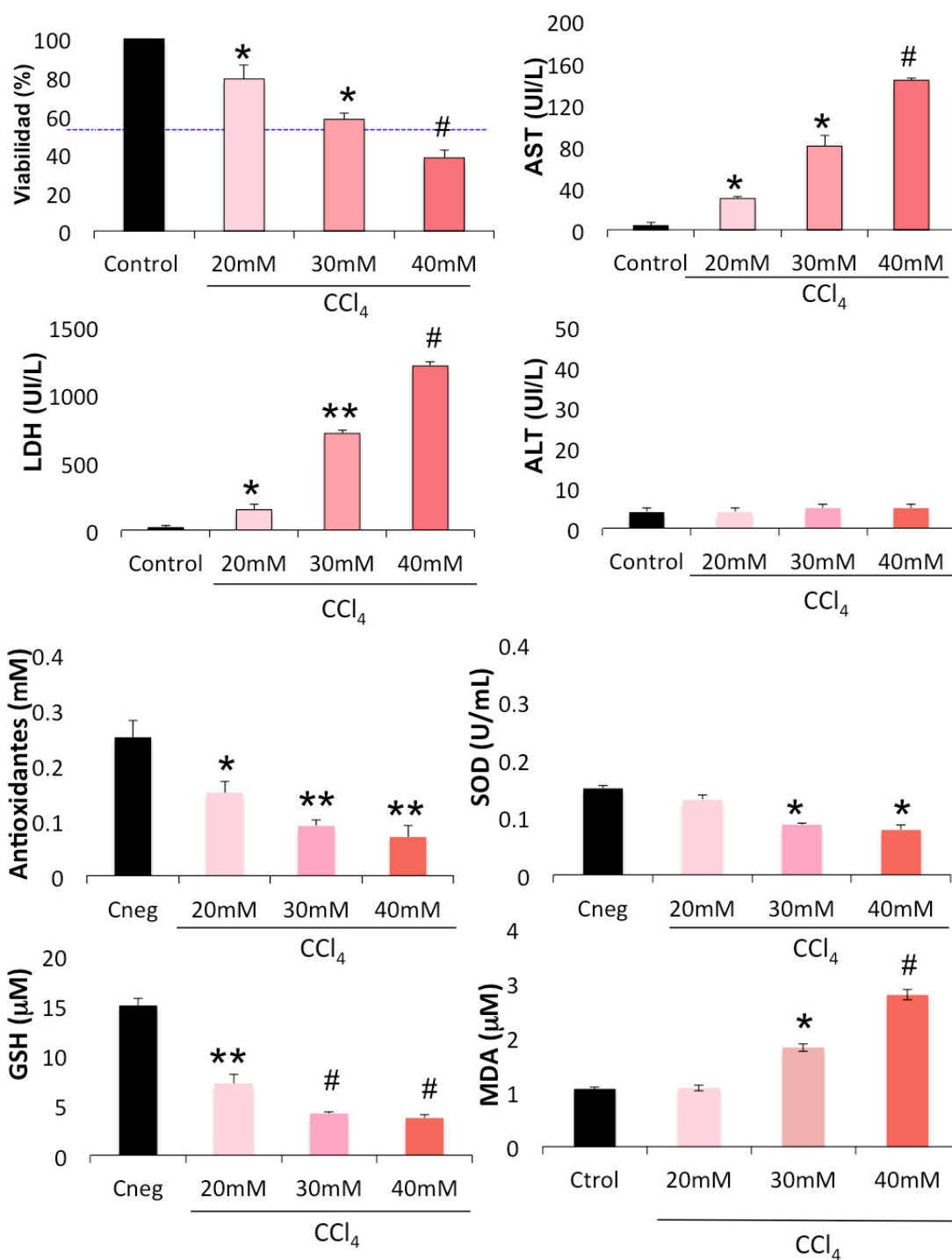


Figura 5. Efecto de CCl₄ a concentración de 20, 30 y 40 mM por 2 h en la línea celular HepG2. Los valores son expresados como media ± D.E. * Tratamiento vs GC, $P < 0.05$; ** Tratamiento vs GC, $P = 0.001$; # Tratamiento vs GC, $P < 0.001$

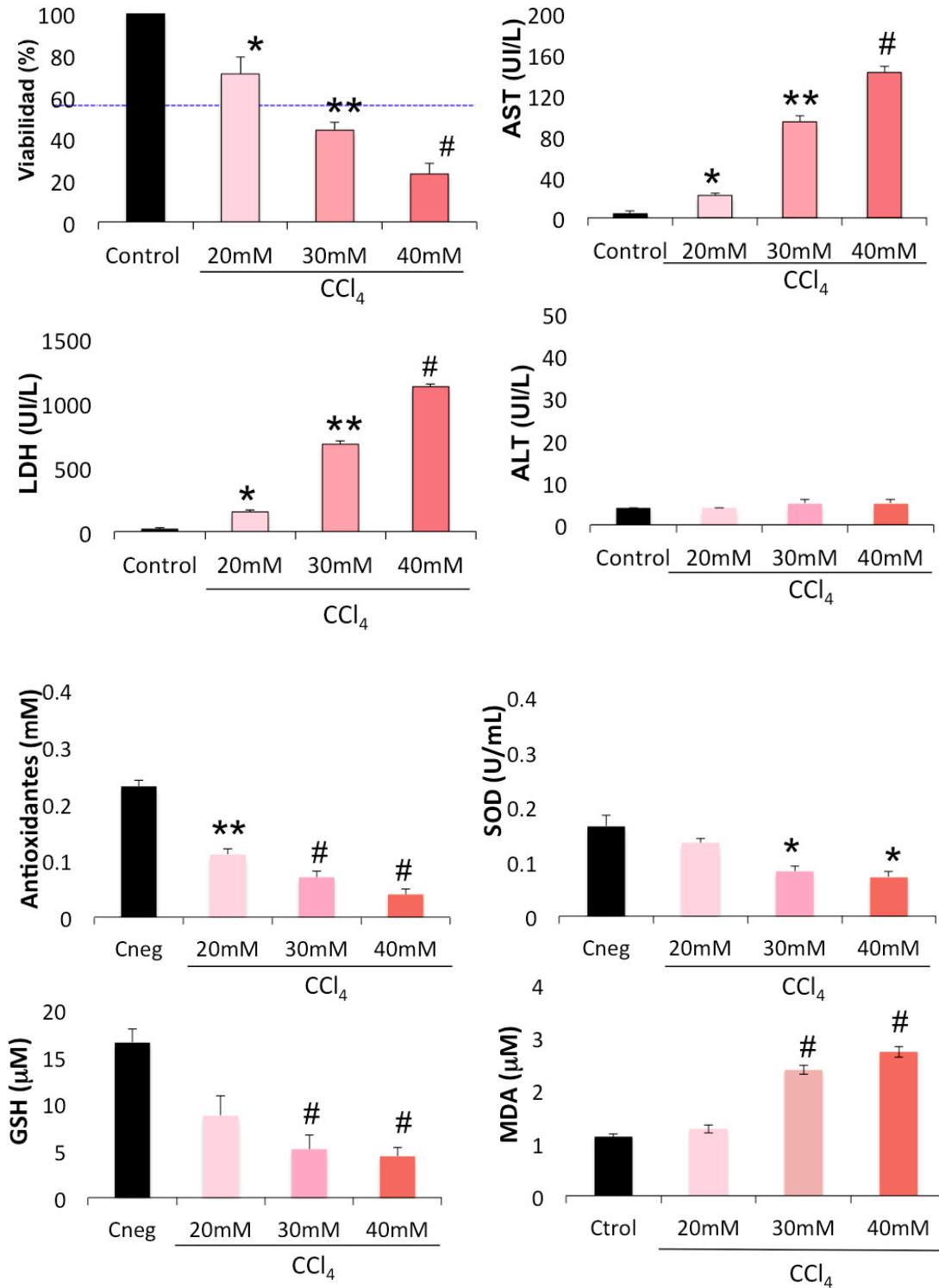


Figura 6. Efecto de CCl₄ a concentración de 20, 30 y 40 mM por 3 h en la línea celular HepG2. Los valores son expresados como media ± D.E. * Tratamiento vs GC, $P < 0.05$; ** Tratamiento vs GC, $P = 0.001$; # Tratamiento vs GC, $P < 0.001$

3.2 Efecto del acetaminofén en la línea celular HepG2.

El efecto del Acet en las células HepG2 se muestra en las figuras de la 7 a la 10. Las células HepG2 expuestas a Acet mostraron un incremento de la liberación de la AST, ALT y LDH durante las primeras 12 horas y posteriormente una reducción, lo cual se relaciona con la disminución de la viabilidad celular, siendo significativo este cambio a todas las concentraciones evaluadas a las 72h ($P<0.001$).

La exposición de las células HepG2 a Acet mostró un incremento en los niveles de MDA dependiente de la concentración y tiempo de exposición, siendo significativo a todas las concentraciones vs el control sin tratamiento a un tiempo de exposición de 72 h ($P<0.001$).

Hubo una reducción de los niveles de antioxidantes totales, SOD y GSH dependiente de concentración y tiempo, siendo significativo a todas las concentraciones evaluadas a un tiempo de exposición de 72h ($P<0.001$).

Debido a la variabilidad en los resultados obtenidos con Acet, no se consideró seleccionar este agente como inductor de daño, para la evaluación de los agentes hepatoprotectores.

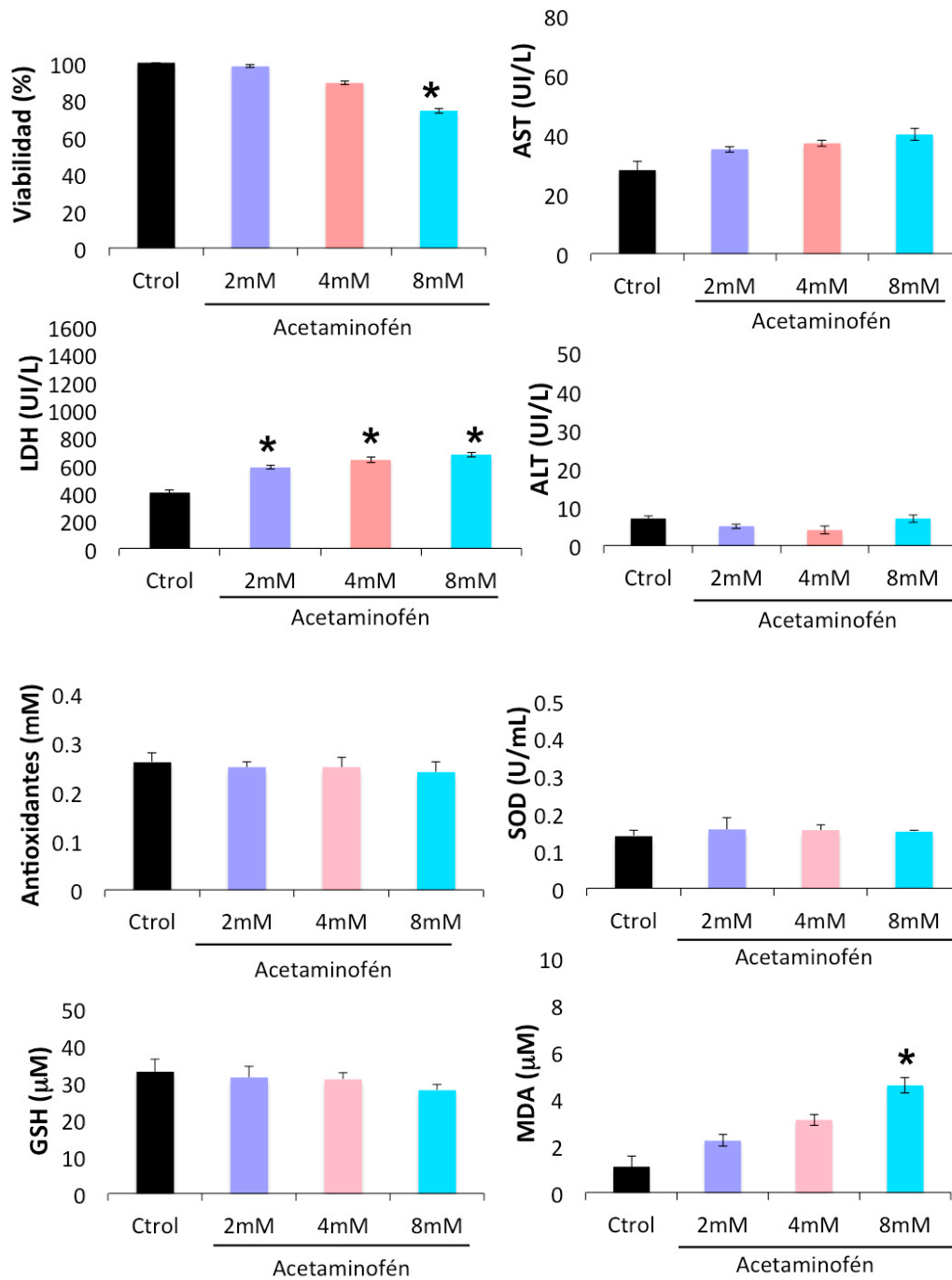


Figura 7. Efecto de Acet a concentración de 2, 4 y 8 mM por 12 h, en la línea celular HepG2. Los valores son expresados como media \pm D.E. * Tratamiento vs GC, $P < 0.05$

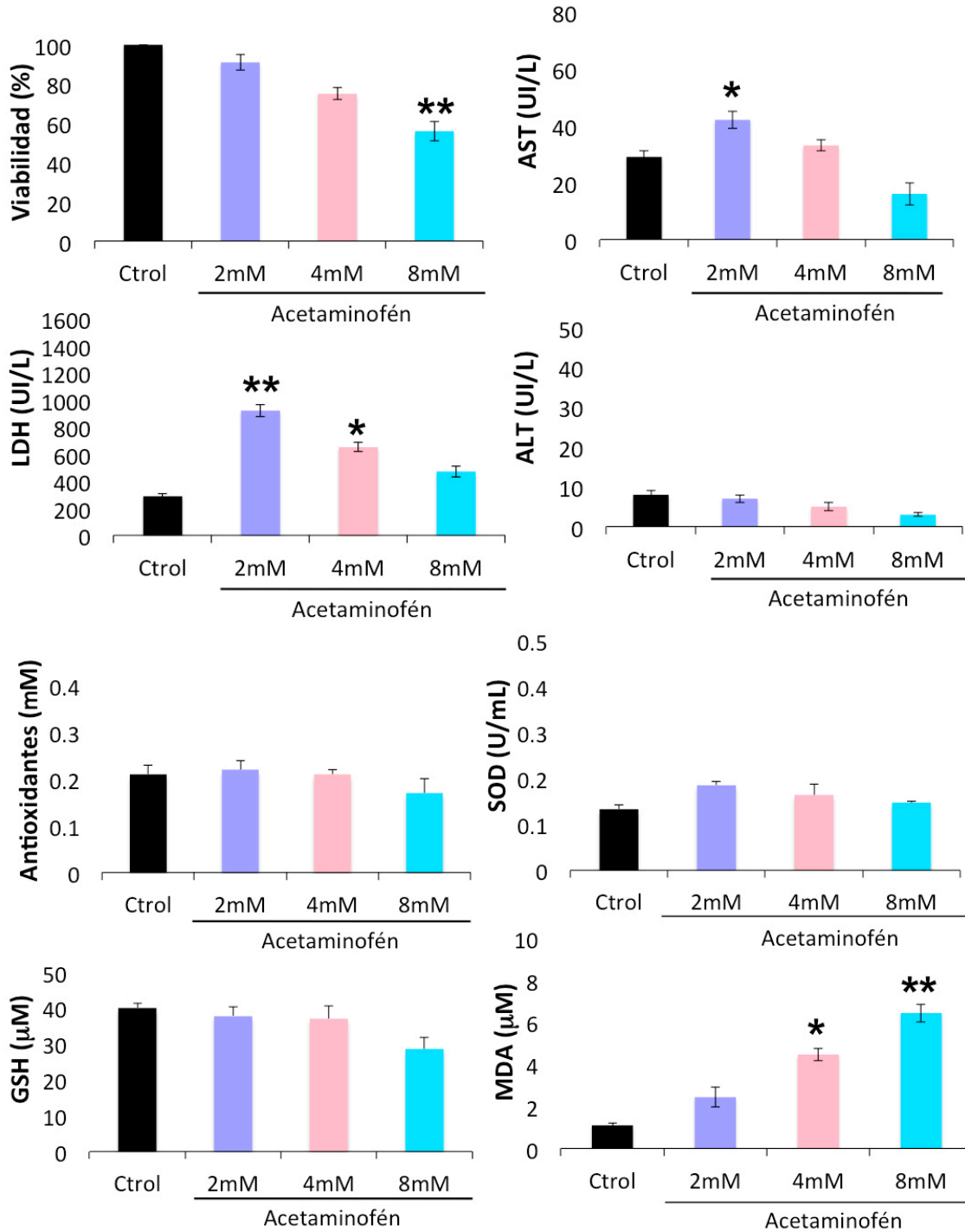


Figura 8. Efecto de Acet a concentración de 2, 4 y 8 mM por 24 h en la línea celular HepG2. Los valores son expresados como media \pm D.E. * Tratamiento vs GC, $P < 0.05$; ** Tratamiento vs GC, $P = 0.001$

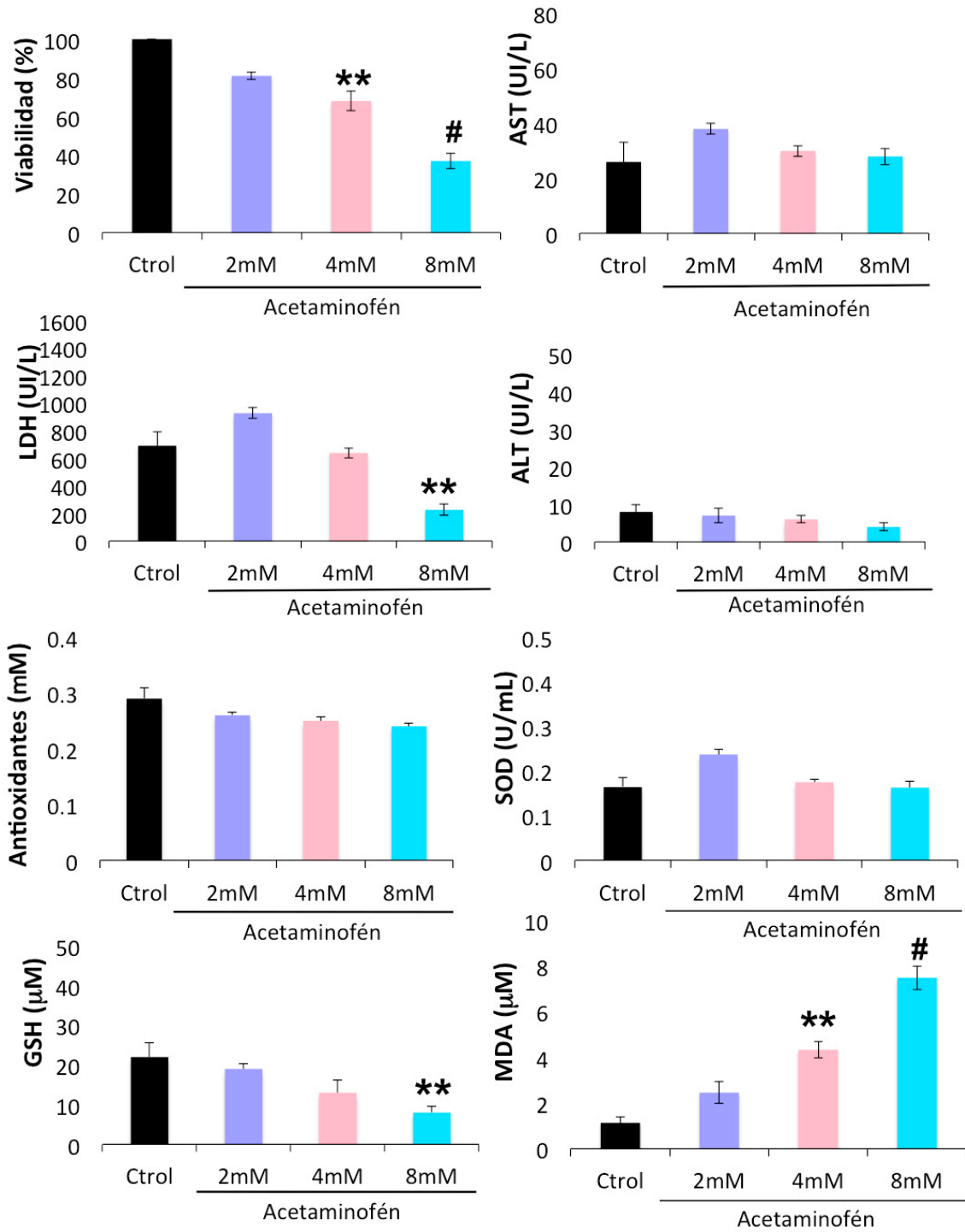


Figura 9. Efecto de Acet a concentración de 2, 4 y 8 mM por 48 h en la línea celular HepG2. Los valores son expresados como media \pm D.E. ** Tratamiento vs GC, $P=0.001$; # Tratamiento vs GC, $P<0.001$

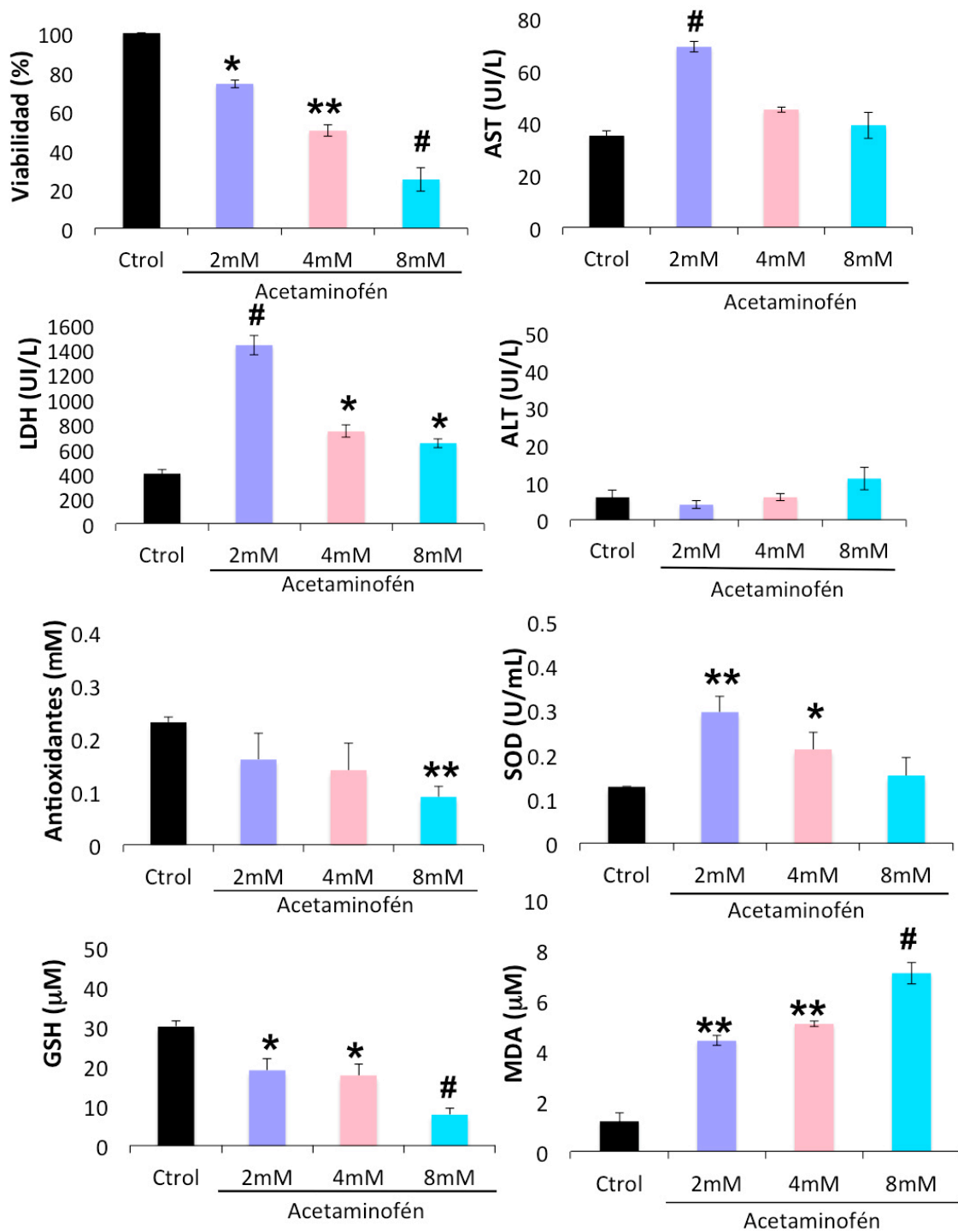


Figura 10. Efecto de Acet a concentración de 2, 4 y 8 mM por 72 h en la línea celular HepG2. Los valores son expresados como media \pm D.E. * Tratamiento vs GC, $P < 0.05$; ** Tratamiento vs GC, $P = 0.001$; # Tratamiento vs GC, $P < 0.001$

3.3 Evaluación de la actividad citotóxica de silimarina, silibinina y silifos en la línea celular HepG2.

Los resultados del efecto de la exposición de SLB, SLM y SLF a 10, 100 y 150 ug/mL durante 1 h y 12 h sobre la línea celular HepG2, se muestra en la figura 11 y figura 12. La exposición por 1 h de las células HepG2 a 150 ug/mL de SLM vs GC mostró un incremento significativo de AST (4 ± 2 UI/L vs 26 ± 4 UI/L) y SOD (0.14 ± 0.009 U/mL vs 0.34 ± 0.02 U/mL) ($P < 0.05$); a 150 ug/mL de SLB vs GC mostró un incremento significativo de LDH (7 ± 3 UI/L vs 17 ± 3 UI/L) y AST (4 ± 2 UI/L vs 16 ± 3 UI/L) ($P < 0.05$); y a 100 ug/mL y 150 ug/mL de SLF vs GC mostró un incremento significativo de LDH (7 ± 3 U/L vs 19 ± 2 UI/L ; 31 ± 2 UI/L) y SOD (0.135 ± 0.009 U/mL vs 0.248 ± 0.015 U/mL) ($P < 0.05$). La exposición por 12 h de las células HepG2 a SLB, SLM y SLF a diversas concentraciones mostraron un incremento significativo de AST, ALT, LDH y SOD y una disminución significativa en viabilidad y GSH ($P < 0.05$). Sin embargo, no se consideraron citotóxicos ya que se observó una viabilidad $> 60\%$, niveles de AST < 50 UI/L, ALT < 30 UI/L, antioxidantes totales > 2 mM, y niveles de MDA, SOD y GSH similares al GC de acuerdo a lo reportado por Torres-González L et al (2011).

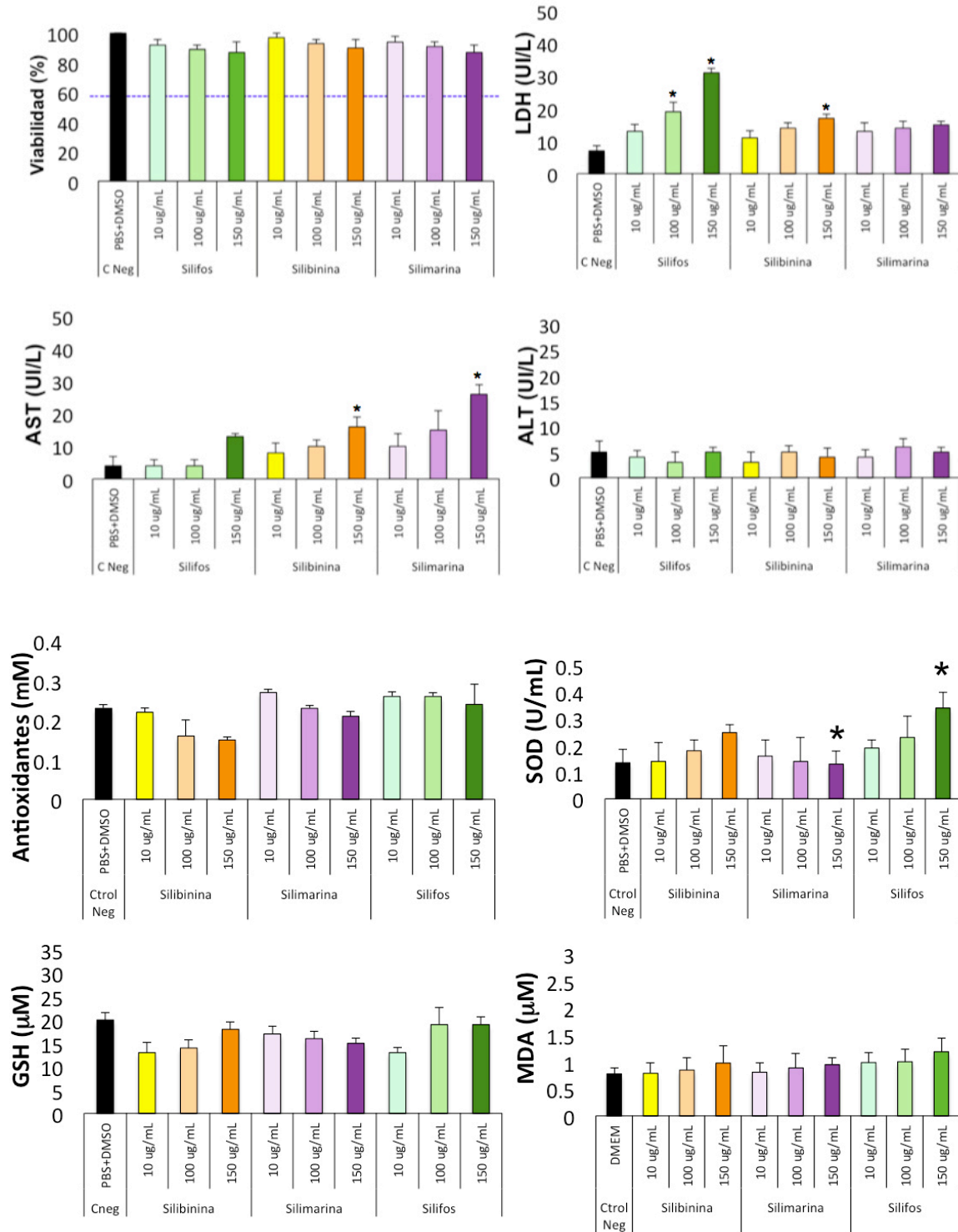


Figura 11. Efecto de SLB, SLM y SLF a concentración de 10, 100 y 150 µg/mL por 1 h en la línea celular HepG2. Los valores son expresados como media ± D.E. * Tratamiento vs GC: $P < 0.05$

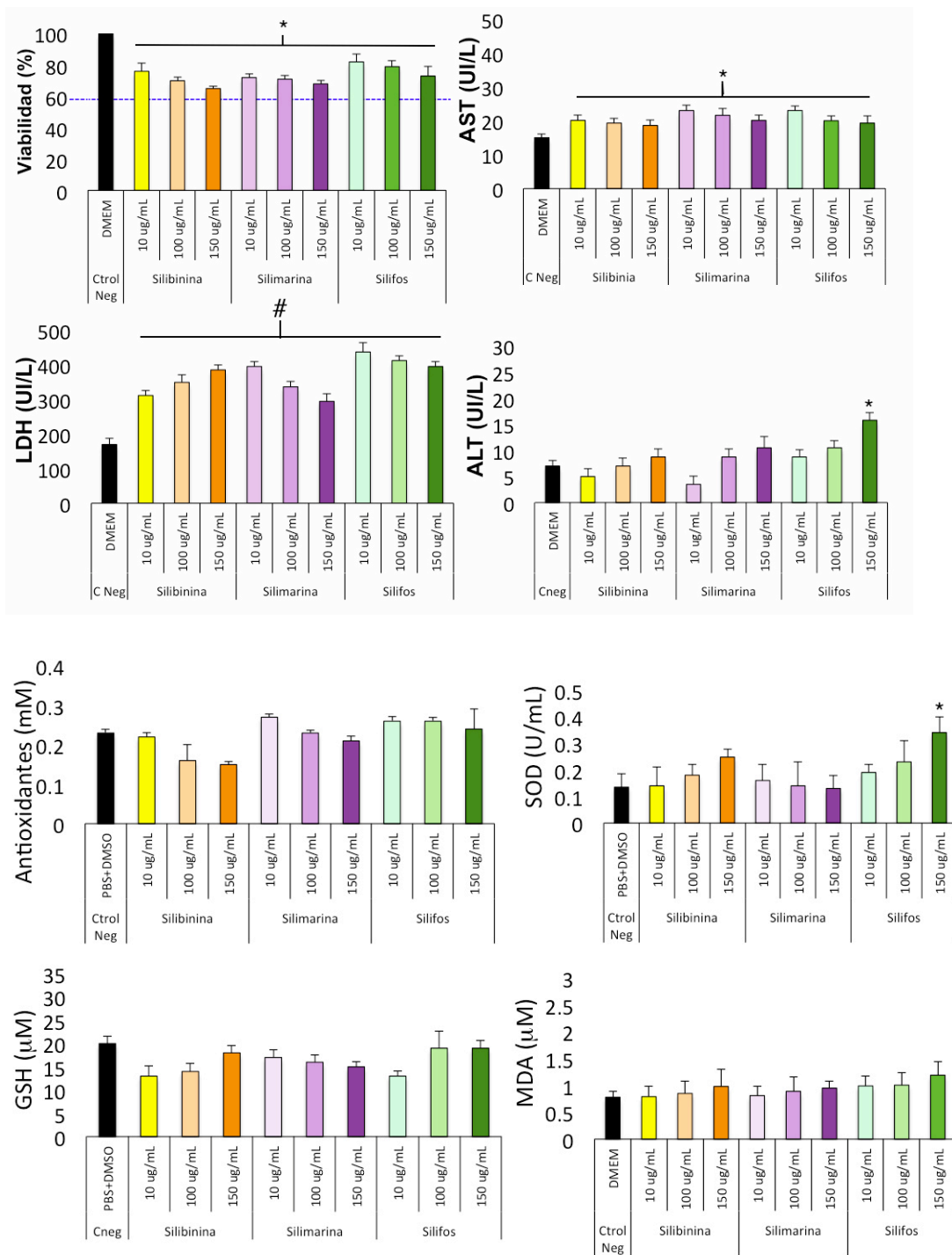


Figura 12. Efecto de SLB, SLM y SLF a concentración de 10, 100 y 150 µg/mL por 12 h en la línea celular HepG2. Los valores son expresados como media ± D.E. *Tratamiento vs GC: * $P < 0.05$; # Tratamiento vs GC, $P < 0.001$

3.4 Evaluación de la actividad hepatoprotectora de silimarina, silibinina, silifos en HepG2.

Los resultados del efecto hepatoprotector de la SLB, SLM y SLF se muestra en la figura 13. El pre-tratamiento de las células HepG2 con los hepatoprotectores y posterior daño inducido por CCl₄, mostró que la SLB a todas las concentraciones evaluadas disminuyó los niveles de AST , LDH y MDA a 100 ug/mL y 150 ug/mL, así mismo previno la disminución de antioxidantes totales vs CCl₄ en forma significativa ($P=0.001$). El pre-tratamiento con SLM y SLF a todas las concentraciones no previnieron la reducción de los antioxidantes totales vs CCl₄, siendo menor a 150 ug/mL ($P<0.001$).

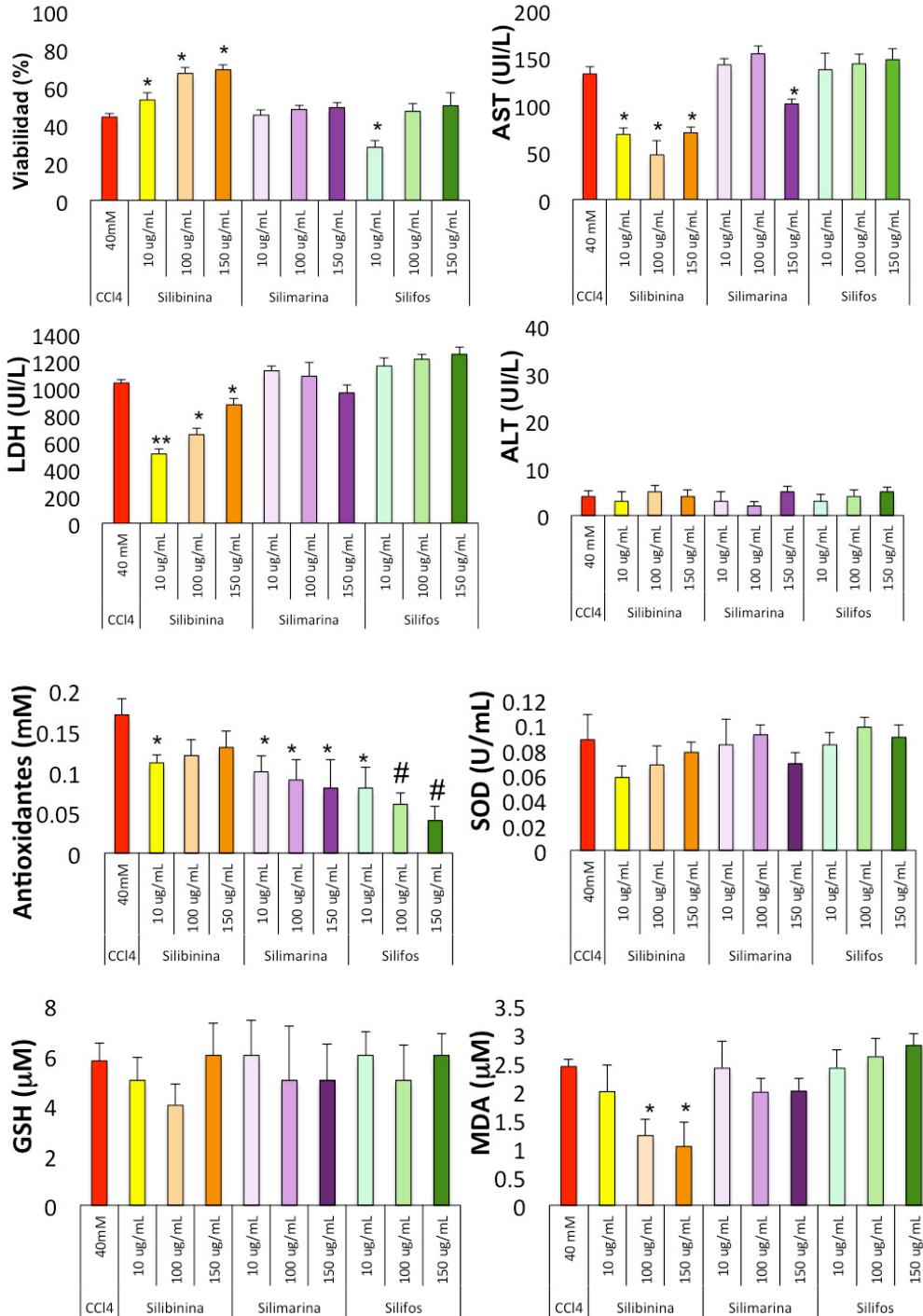


Figura 13. Efecto hepatoprotector de SLB, SLM y SLF en el daño inducido por CCl₄ 40 mM por 1 h 30 min en la línea celular HepG2. Los valores son expresados como media ± D.E. * Tratamiento vs GC, $P < 0.05$; ** Tratamiento vs GC, $P = 0.001$; # Tratamiento vs GC, $P < 0.001$.

3.5 Efecto de tetracloruro de carbono en cortes precisos de hígado de rata.

La exposición de los CPHR a CCl_4 se muestra en la figura 14. Las enzimas ALT, AST y LDH se incrementaron de forma variable no dependiendo del tiempo y concentración. Solo fue significativo el incremento de AST a las 18 h respecto del control sin tratamiento a 20 mM y 40 mM, así como a 24 h con 30 mM ($P < 0.03$); ALT a las 18 h respecto a GC a 20 mM y a las 24 h con 30 mM ($P < 0.03$); LDH a las 18 h y 24 h con 40 mM respecto GC ($P < 0.05$).

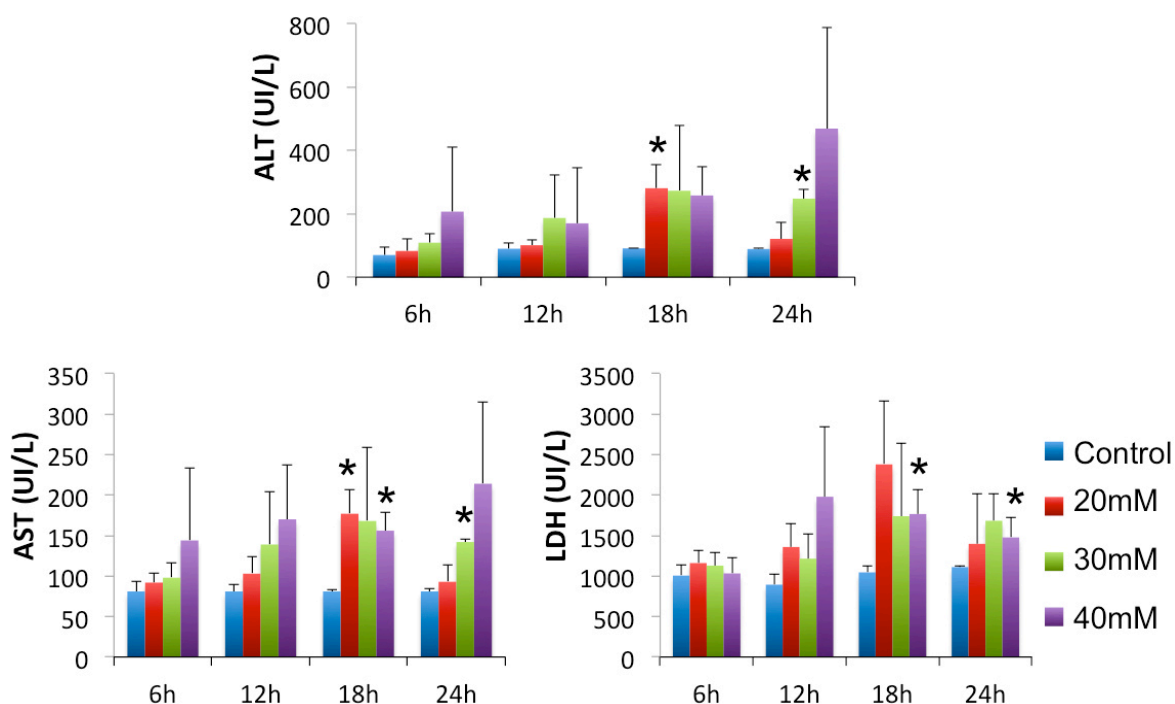


Figura 14. Efecto del CCl_4 en los cortes precisos de hígado de rata a concentraciones de 20, 30 y 40 mM durante 6, 12, 18 y 24 h. Los valores son expresados como media \pm D.E. de 6 determinaciones en 2 días distintos.* Control vs Tratamiento, $P < 0.05$.

En base a estos resultados variables, se decidió inducir el daño con CCl_4 y posteriormente realizar los cortes precisos de hígado de rata a partir de los hígados ya dañados. Los resultados se muestran en la figura 15. La viabilidad disminuyó de forma significativa a las 24 h ($P < 0.05$). La actividad de la ALT y el MDA se incremento en comparación al GC de forma significativa ($P < 0.05$), siendo más significativo este cambio a las 24h ($P < 0.001$). La actividad de la AST y LDH se incremento en razón del tiempo de exposición, sin cambio significativo. Los antioxidantes totales, la SOD y el GSH disminuyeron de forma significativa conforme al tiempo, siendo mayor esta disminución a las 24 h ($P < 0.001$).

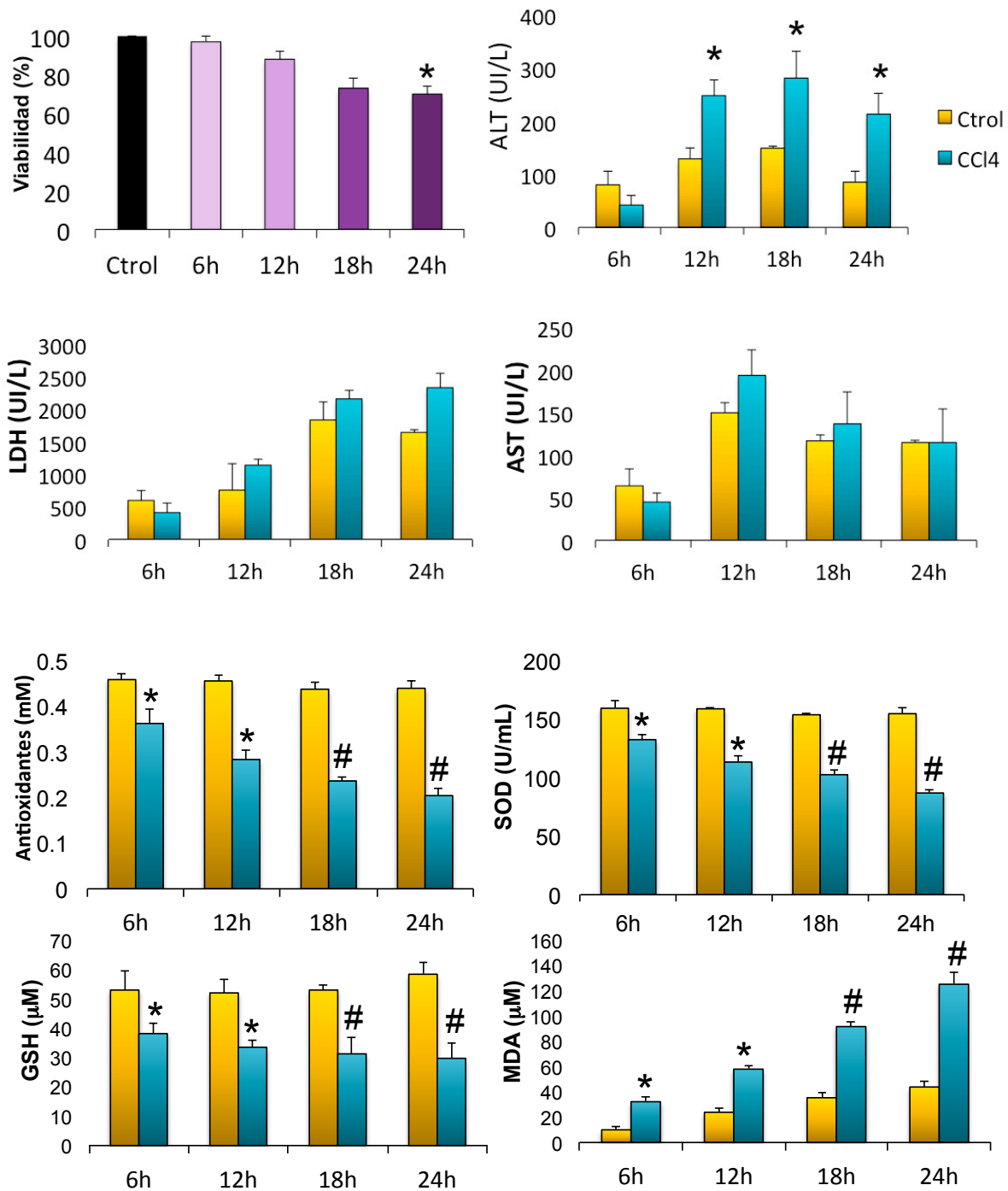


Figura 15. Efecto de CCl_4 a dosis de 1 mL/Kg de peso en los cortes precisos de hígado de rata. Los valores son expresados como media \pm D.E. de 4 determinaciones de 2 días distintos. * GC vs tratamiento, $P < 0.05$; # GC vs tratamiento, $P < 0.001$.

3.6 Efecto del acetaminofén en cortes precisos de hígado de rata.

La exposición de los CPHR a Acet se muestra en la figura 16. La actividad de la ALT mostró un incremento en las primeras 12 h ($P<0.05$) y posteriormente fue disminuyendo de manera dependiente de dosis y tiempo. La disminución mayor fue a la concentración de 8 mM ($P<0.05$). La AST fue incrementado de manera dependiente de dosis y tiempo ($P<0.01$). La LDH mostró un incremento en las primeras 12 h y posteriormente fue incrementando de forma variable ($P<0.05$). La viabilidad de las rebanadas fue disminuyendo significativamente de manera dependiente de dosis y tiempo. Los antioxidantes totales, MDA y GSH no mostraron cambio durante las primeras 12h, sin embargo a partir de las 24 h hubo cambio significativo y se mantuvo hasta las 48 h a las diferentes concentraciones evaluadas ($P<0.05$). La SOD no mostró cambio a ninguna concentración en los tiempos evaluados.

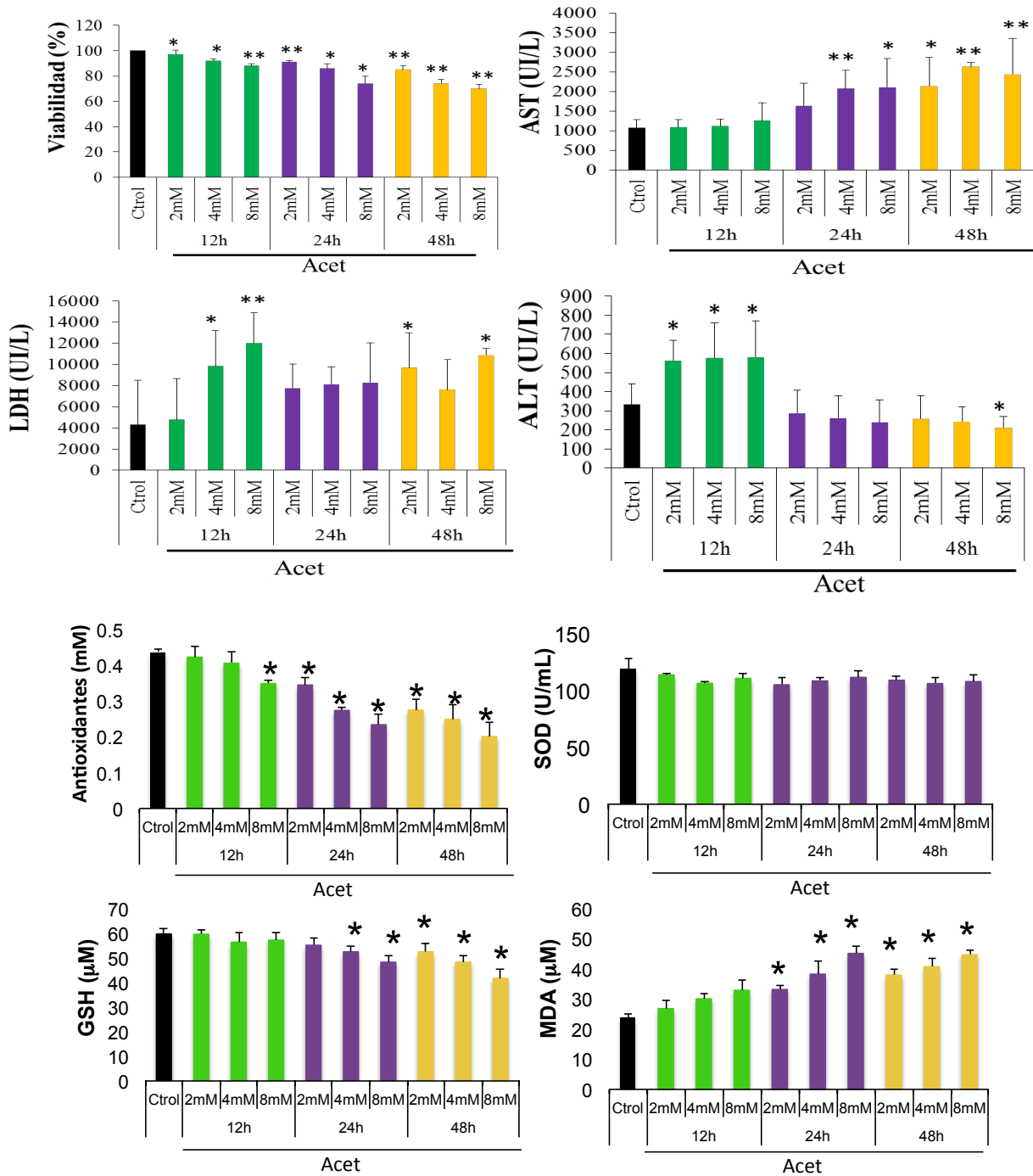


Figura 16. Efecto de Acet en los cortes precisos de hígado de rata a los tiempos de 12, 24 y 48h. Los valores son expresados como media \pm D.E. de 3 determinaciones de 2 días distintos. * GC vs tratamiento, $P < 0.05$; ** GC vs tratamiento, $P < 0.010$.

3.7 Evaluación de la actividad citotóxica de Silimarina, Silibinina y Silifos en los cortes precisos de hígado de rata.

El efecto de la SLB, SLM y SLF a 10, 100 y 150 ug/mL 24h sobre los CPHR se muestra en la figura 17. Estos agentes no mostraron cambio significativo de AST, ALT, LDH, MDA o disminución significativa de SOD y GSH, ni viabilidad celular menor a 60% en los CPHR comparados con GC, por ello la SLB, SLM y SLF no se consideraron citotóxicos.

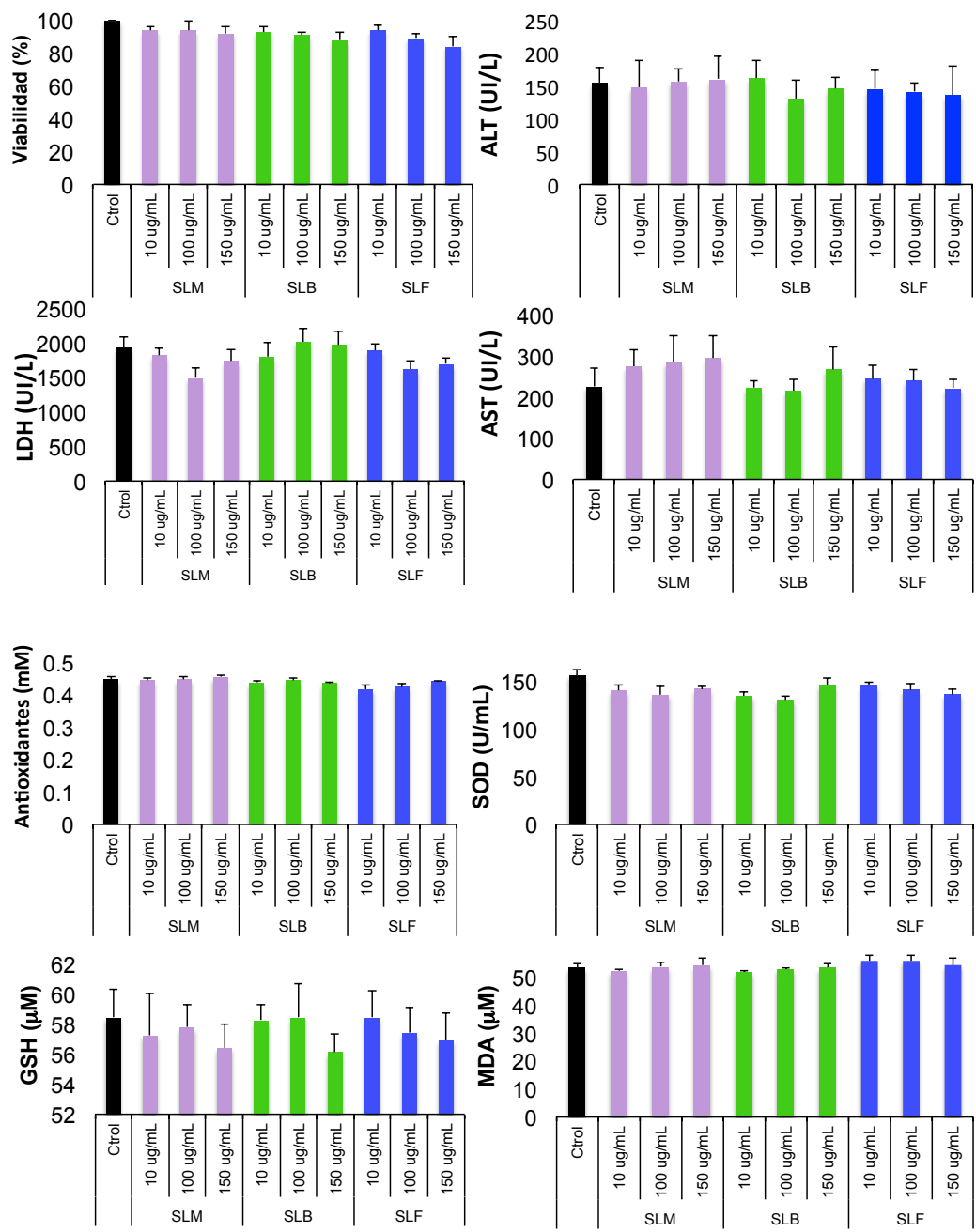


Figura 17. Efecto de SLM, SLB y SLF a concentración de 10, 100 y 150 ug/mL en los CPHR a las 24h. Los valores son expresados como media \pm D.E. de 3 determinaciones de 2 días distintos.

3.8 Determinación de la actividad hepatoprotectora de Silimarina, Silibinina, Silifos en los cortes precisos de hígado de rata.

El efecto hepatoprotector de la SLB, SLM y SLF en los CPHR se muestra en la figura 18. El co-tratamiento de los CPHR con los hepatoprotectores en el daño inducido por CCl_4 , mostró que la SLB a todas las concentraciones evaluadas previno la disminución de la viabilidad, antioxidantes totales, SOD y GSH, así mismo evitó el incremento de los niveles de ALT, LDH y MDA en forma significativa ($P < 0.05$). La SLM mostró un efecto similar en los parámetros determinados excepto en AST, donde mostró que solo a dosis de 150 $\mu\text{g/mL}$ previno el incremento de forma significativa ($P < 0.05$). El co-tratamiento con SLF a todas las concentraciones no previno el daño inducido por CCl_4 .

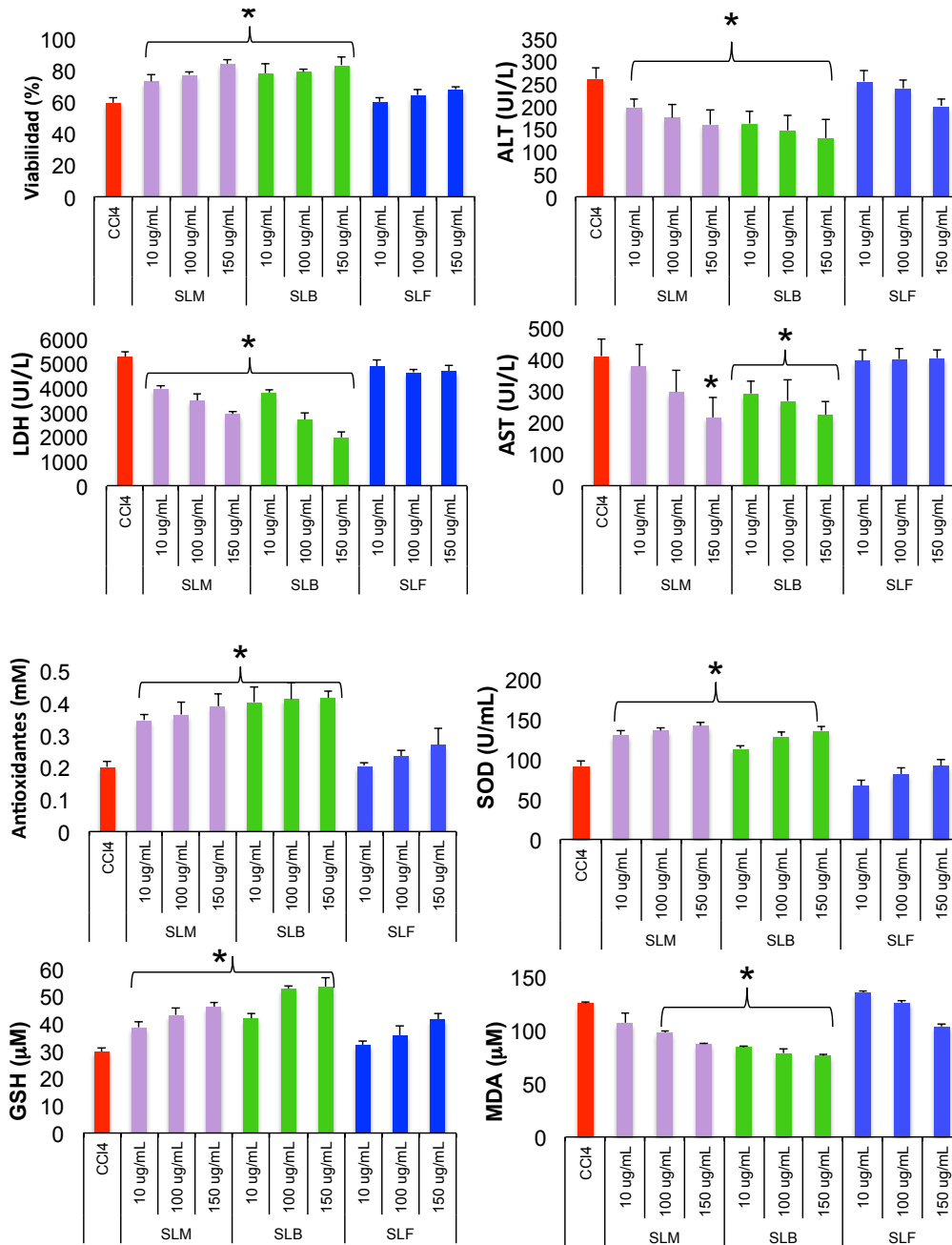


Figura 18. Efecto hepatoprotector de SLM, SLB y SLF a dosis de 10,100 y 150 µg/mL en los CPHR a las 24h. Los valores son expresados como media ± D.E. de 3 determinaciones de 2 días distintos. * GC vs tratamiento, $P < 0.05$.

3.9 Efecto hepatoprotector de silibinina, silimarina y silifos en ratas Wistar.

El efecto hepatoprotector de SLB, SLM y SLF en el daño inducido por CCl₄ se muestra en la figura 19. La actividad de la ALT y AST fueron significativamente menores en el grupo con SLB+CCl₄ y SLM+CCl₄ comparados con el grupo de CCl₄ solo ($P<0.01$). La actividad de LDH solo fue significativamente menor el grupo SLB+CCl₄ comparado con el grupo de CCl₄ solo ($P<0.01$). La actividad de las enzimas fue mayor en el grupo SLF+CCl₄ aunque no hubo diferencia significativa.

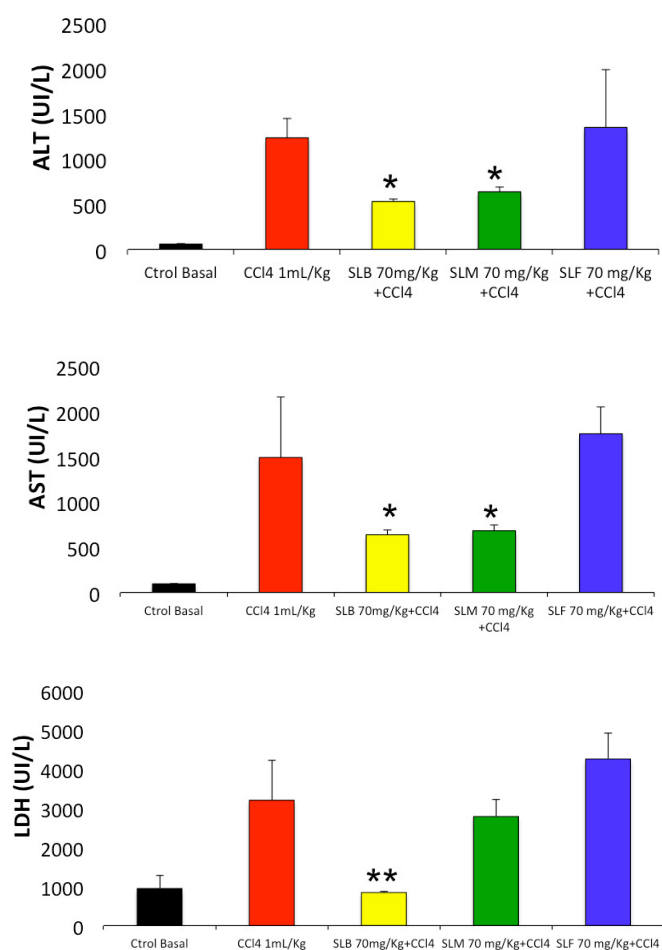


Figura 19. Efecto hepatoprotector de SLM, SLB y SLF a dosis de 70mg/kg de peso en el daño inducido por CCl₄ en ratas Wistar. Los valores son expresados como media \pm D.E. * GC vs tratamiento, $P<0.05$; ** GC vs tratamiento, $P=0.001$

Respecto a la histología, los hígados del grupo de ratas con CCl_4 mostraron severa infiltración inflamatoria y necrosis submasiva y confluyente. El grupo con $\text{SLM}+\text{CCl}_4$ y $\text{SLB}+\text{CCl}_4$ mostró esteatosis microvesicular con necrosis, particularmente en la región perivenular, siendo evidente en ambos grupos la prevención del daño que es generado por CCl_4 . El grupo con $\text{SLF}+\text{CCl}_4$ mostró degeneración balonoide e infiltración inflamatoria mixta y necrosis lítica, similar al CCl_4 , por lo cual no se considero hepatoprotector (Figura 20).

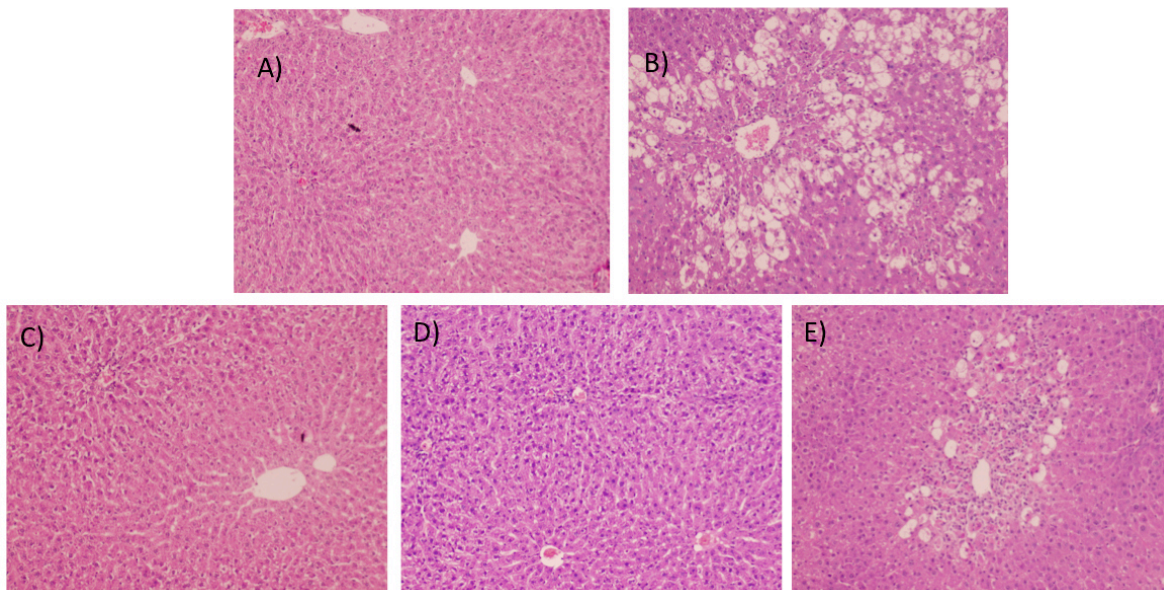


Figura 20. Histología hepática. A) Control normal, en el cual se encuentra la histología normal del parénquima hepático. B) CCl_4 , necrosis submasiva confluyente e infiltrado inflamatorio mixto. C) $\text{SLM}+\text{CCl}_4$, esteatosis microvesicular perivenular sin necrosis. D) $\text{SLB}+\text{CCl}_4$, esteatosis microvesicular perivenular sin necrosis. E) $\text{SLF}+\text{CCl}_4$, degeneración balonoide, infiltrado inflamatorio y necrosis lítica. Tinción de hematoxilina y eosina a 10x.

3.10 Material vegetal

La planta *C. americana* fue autenticada y un ejemplar de la planta fue depositado en el herbario institucional de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UAN-17624).

3.11 Obtención de extracto metanólico de *C. americana*

La flor de *C. americana* se procesó como fue descrito en la sección 2.2.1. El porcentaje de recuperación obtenido del extracto fue de 14.57%.

3.12 Medición de flavonoides totales

La determinación de flavonoides totales se realizó midiendo la absorción del extracto metanólico a 415 nm después de haberlo tratado con $AlCl_3$, como fue descrito en la sección 2.2.17. La cantidad de flavonoides totales obtenidos fue de 40 mg de flavonoides/g de extracto.

3.13 Evaluación de la actividad citotóxica del extracto de *C. americana* en la línea celular HepG2

El efecto del extracto de *C. americana* a 10, 100 y 1000 $\mu g/mL$ durante 1 h y 12 h se muestra en la figura 21 y figura 22, respectivamente. Las diferentes concentraciones que se evaluaron del extracto metanólico de *C. americana* en la exposición durante 1 h mostró un incremento significativo de AST a 10, 100 y 1000 $\mu g/mL$ vs GC ($P < 0.05$), aunque esta diferencia no fue indicativa de daño ya que los niveles estuvieron por < 50 UI/L, la SLB mostró un comportamiento similar. A sí mismo, se mostró una disminución significativa de viabilidad a 100 y 1000 $\mu g/mL$ vs control ($P < 0.05$). La exposición de las células HepG2 a

12 h de las diferentes concentraciones que se evaluaron del extracto metanólico de *C. americana* no mostró diferencia significativa en alguna determinación. Aunque a una hora hubo diferencias significativas, no se consideró que el extracto metanólico de *C. americana* fuera citotóxico ya que se observó una viabilidad >60%, niveles de AST <50 UI/L, ALT<30 UI/L, antioxidantes totales >2 mM, y niveles de MDA, SOD, GSH similares al GC de acuerdo a lo reportado por Torres-González L y cols. (2011).

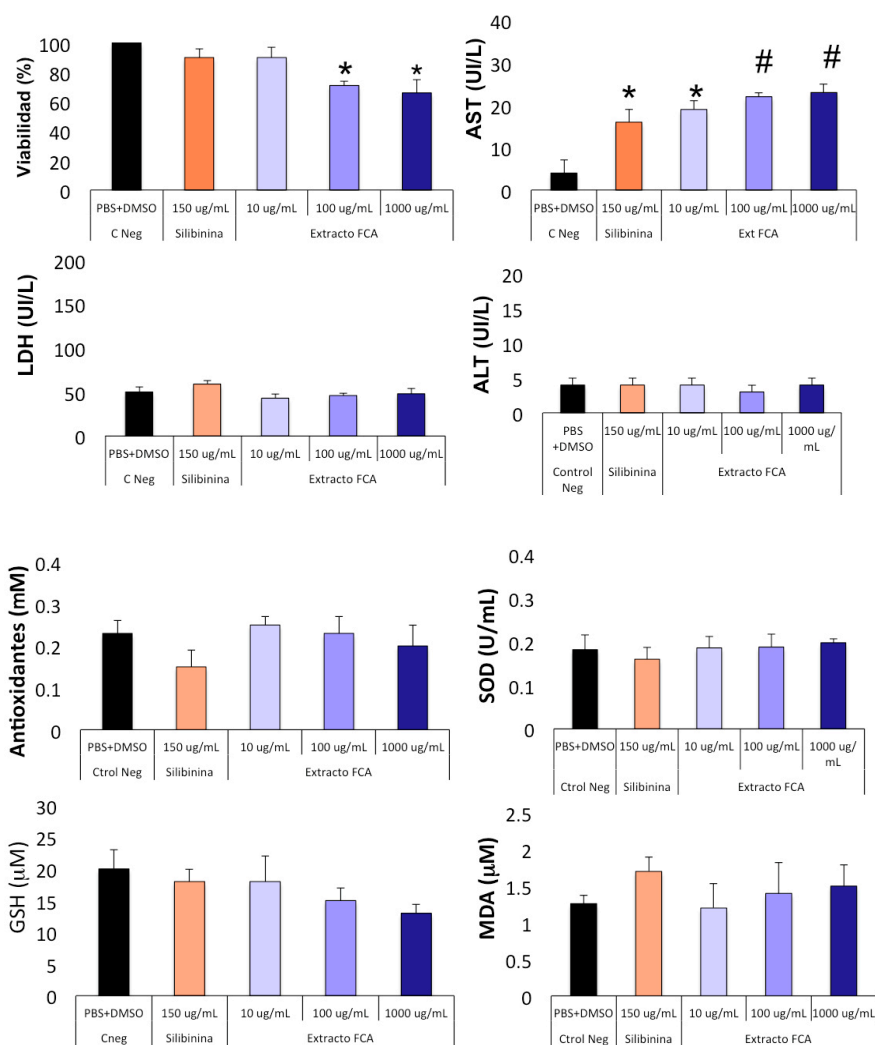


Figura 21. Efecto del extracto de flor de *C. americana* (FCA) a concentraciones de 10, 100 y 1000 ug/mL por 1 h en la línea celular HepG2. Los valores son expresados como media ± D.E. * Tratamiento vs GC, $P<0.05$; # Tratamiento vs GC , $P=0.001$

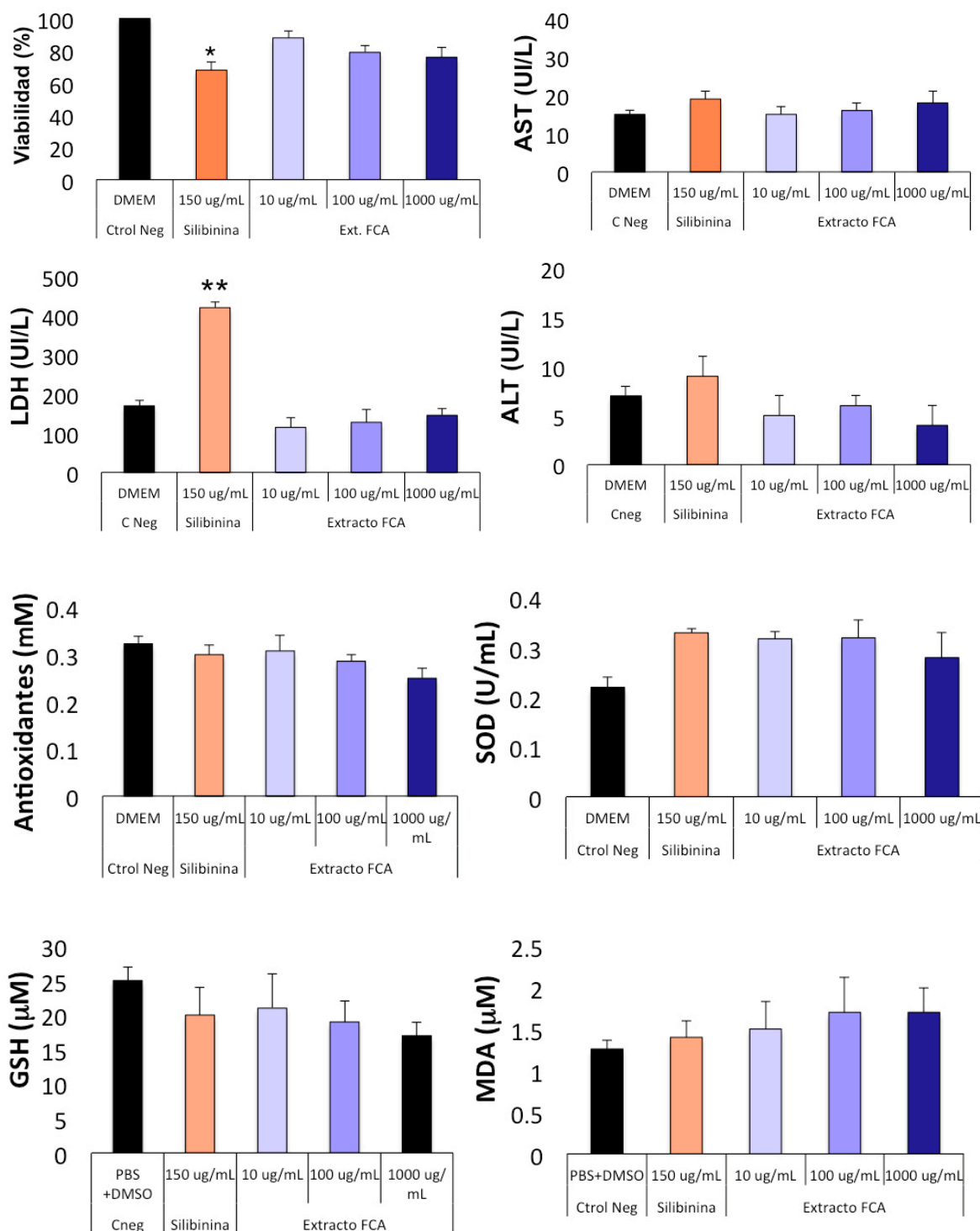


Figura 22. Efecto del extracto de flor de *C. americana* (FCA) a concentraciones de 10, 100 y 1000 µg/mL por 12 h en la línea celular HepG2. Los valores son expresados como media \pm D.E. * Tratamiento vs GC, $P < 0.05$; ** Tratamiento vs GC, $P < 0.001$.

3.14 Evaluación de la actividad hepatoprotectora del extracto de *C. americana* en la línea celular HepG2.

El efecto hepatoprotector del extracto de *C. americana* se muestra en la figura 23. El pre-tratamiento de las células HepG2 con 100 ug/mL y 1000 ug/mL del extracto de *C. americana* redujo la elevación de la AST inducida por CCl₄. Así mismo, a todas las concentraciones redujo la LDH inducida por CCl₄, y previno la peroxidación ($P<0.05$).

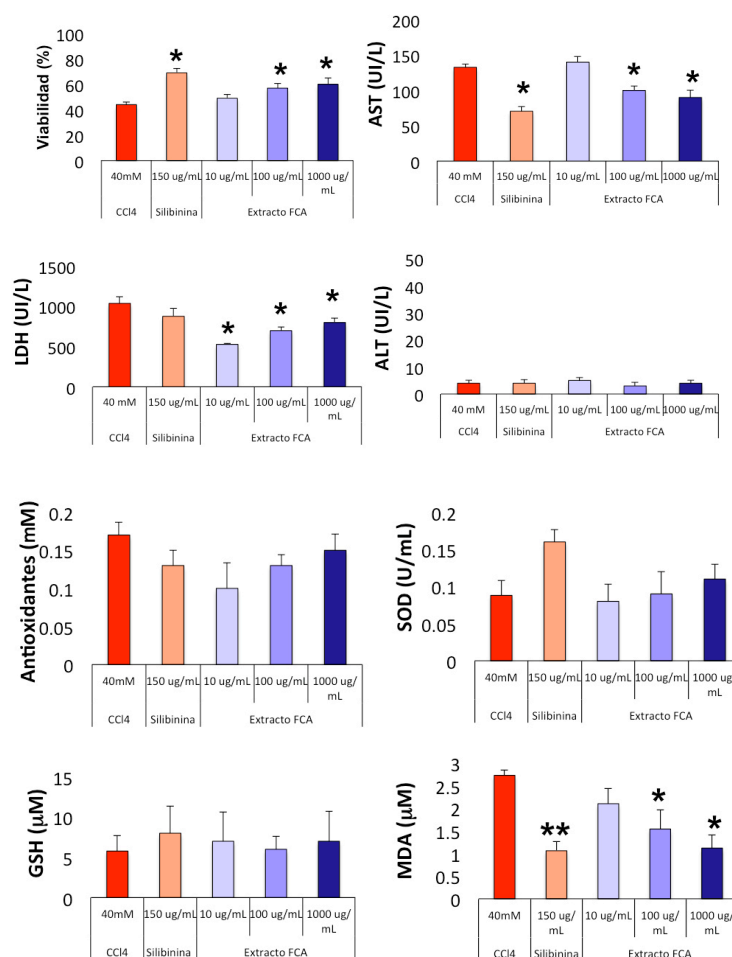


Figura 23. Efecto hepatoprotector de extracto de flor de *C. americana* (FCA) en el daño inducido por CCl₄ 40 mM por 1h 30 min en la línea celular HepG2. Los valores son expresados como media ± D.E. * Tratamiento vs GC, $P<0.05$, ** Tratamiento vs GC, $P=0.001$

3.15 Evaluación cualitativa de la actividad antioxidante del extracto de *C. americana*

La evaluación cualitativa de la actividad antioxidante del extracto de *C. americana* se realizó en CCF y se reveló con DPPH. Se observó evidencia de presencia de compuestos antioxidantes en el extracto de *C. americana* (Figura 24).

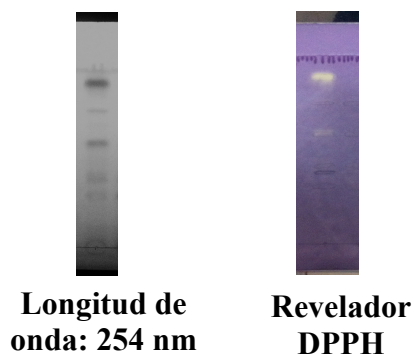


Figura 24. Análisis cualitativo por CCF de la actividad antioxidante del extracto de *C. americana*.

Se calculó el Rf de las manchas visualizadas, lo cual se observa en la tabla 1.

Tabla 1. Cálculo del factor de retardo de las manchas visualizadas en la CCF del extracto de *C. americana* visualizadas bajo luz UV, 254 nm.

	Rf
Extracto de <i>C. americana</i>	0.29
	0.38
	0.58
	0.77
	0.93

3.16 Medición cuantitativa de la actividad antioxidante de Silimarina, Silibinina, Silifos y del extracto de *C. americana*

La evaluación cuantitativa del porcentaje de reducción del DPPH de los agentes hepatoprotectores y del extracto de *C. americana*, se realizó por espectrofotometría. La CE_{50} se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. CE_{50} de los agentes hepatoprotectores y del extracto de *C. americana* y quercetina.

Muestra	CE_{50} (ug / mL)
Silimarina	39.71 ± 0.85
Silibinina	14.14 ± 0.65
Silifos	169.53 ± 2.19
Extracto de <i>C. americana</i>	17.05 ± 0.32
Quercetina	2.25 ± 0.09

Capítulo IV

Discusión

Las enfermedades hepáticas representan la quinta causa de mortalidad en México según cifras publicadas por el INEGI en 2013. La cirrosis hepática es el resultado final del daño causado por diferentes enfermedades crónicas que afectan al hígado las cuales modifican la estructura del tejido hepático. Se ha implicado al estrés oxidativo como un mecanismo común en la iniciación y progresión de casi todas las condiciones clínicas y experimentales de la enfermedad hepática crónica por diversas etiologías (Bottari NB et al., 2015; Galicia-Moreno M et al., 2014; Poli G et al., 1997). Por esta razón, es de gran interés el desarrollar agentes para disminuir el efecto inducido por el estrés oxidativo.

Las plantas medicinales poseen un gran cantidad de moléculas bioactivas, algunas en específico asociadas a la actividad antioxidante. Uno de los mecanismos por los cuales estas moléculas pueden ejercer su actividad antioxidante es mediante el bloqueo de radicales libres. El aislamiento de estos metabolitos a partir de una biomasa compleja requiere una selección cuidadosa y una ejecución de bioensayos adecuada en las distintas etapas del proceso de investigación de la plantas de estudio (Phillipson JD 2001).

Por lo que en esta investigación, se evaluaron diversos inductores de daño (CCl_4 y Acet) tanto *in vitro* como *ex vivo*, para seleccionar el mejor modelo de hepatotoxicidad, a través de diversos ensayos como: el método de MTT (*in vitro*) y azul alamar (*ex vivo*), medición de la actividad de diversas enzimas AST, ALT y LDH e indicadores de estrés oxidativo como MDA, CAO-T, SOD y GSH; posteriormente se evaluó el agente hepatotóxico seleccionado *in vivo*. Finalmente se evaluó la actividad hepatoprotectora,

citotóxica y antioxidante del extracto *C. americana* considerando la viabilidad celular, la liberación al medio de cultivo de enzimas hepáticas para las dos primeras y el método de DPPH, para la última.

Se decidió utilizar la línea HepG2 como modelo *in vitro* por ser una de las líneas celulares más utilizada a nivel experimental para evaluar el efecto del CCl_4 y el Acet a diversas concentraciones y tiempos de exposición. Estas células expuestas a los tóxicos pierden viabilidad celular, liberan enzimas hepáticas al medio de cultivo y generan cambios significativos en CAO-T, MDA, SOD, GSH (Holden et al., 2000; Harries et al., 2001; Yang X et al., 2011). Se ha reportado que el daño hepático causado *in vitro* por el CCl_4 puede ser debido a dos diferentes mecanismos: un efecto directo del solvente o un efecto indirecto por generación de radicales libres y subsecuente peroxidación lipídica (Chen S et al., 1996).

Berger et al (1986) reportaron el efecto de CCl_4 a una concentración de 20% en hepatocitos aislados de rata (6×10^6). Durante los primeros 10-30 min de la exposición a este agente ellos observaron daño en la membrana celular y postularon que fue causado por acción directa del solvente, por lo tanto este no pudo ser prevenido por tratamiento con antioxidantes. Además realizaron la cuantificación de los niveles de MDA y no observaron cambios en este marcador de peroxidación lipídica durante los primeros 30 min. En el presente trabajo utilizando 6×10^6 células HepG2, el CCl_4 no causó efecto tóxico o incremento de los niveles de MDA durante los primeros 30 min de exposición sino hasta los 60 min, lo cual excluye algún efecto directo del solvente. Por otro lado, se ha reportado que el CCl_4 a una concentración de 0.18% en 7×10^6 células HepG2 incrementó la LDH de forma significativa a partir de la 1h 30 min y fue máximo a las 24h (Holden et al., 2000). En la presente investigación, comparadas con las células control, las células HepG2

expuestas a CCl_4 mostraron una respuesta significativa en los niveles de LDH a 1 h 30 min, concordando con lo reportado.

Ha sido descrita la participación de la peroxidación lipídica vía formación de radicales libres y pérdida de la viabilidad celular en HepG2 después de la exposición a 0.5% de CCl_4 por un periodo de 2 h (Harries et al., 2001). En la presente investigación se encontró que, comparadas con las células control, las células HepG2 expuestas a CCl_4 mostraron significativamente reducción de viabilidad, CAO-T, GSH y SOD e incremento de AST, LDH y MDA a 1h 30 min. La ALT no mostro cambio significativo, aunque esta ausencia de cambio pudiera relacionarse al tiempo de exposición, considerando que otros estudios muestran incremento significativo a mayor tiempo de exposición (Pareek et al., 2013; Krithika et al., 2009).

El estrés oxidativo tiene papel importante en la toxicidad de Acet. El estrés oxidativo se produce cuando la generación de ROS sobrepasa la capacidad de detoxificar las especies reactivas de la etapa de propagación o excede la capacidad de reparar el daño resultante (Cover C, 2005). Ha sido reportado que altos niveles de Acet causan daño y reducen la viabilidad celular hasta un 80% a las 24h (Lin J, 2012). En este estudio, las células HepG2 expuestas a Acet mostraron resultados similares e incremento de muerte celular a un tiempo prolongado de exposición (72h). En otros estudios, las células HepG2 fueron expuestas a varias concentraciones de Acet por 24h y 72h y mostraron un incremento en la liberación de LDH a dosis de 10 mM (Jian J et al., 2015). En contraste, en esta investigación, el incremento de la liberación de AST, ALT y LDH fue evidente durante las primeras 12 h. Por otro lado, la disminución de la CAO-T, SOD, GSH e incremento de los niveles de MDA fueron dependientes del tiempo de análisis. Ha sido repetidamente demostrado que las células HepG2 mueren por la exposición a Acet, principalmente por

apoptosis (Macanas-Pirard et al., 2005; Manov et al., 2002). Por esta razón, no ocurre la depleción del GSH en las células HepG2 a las 12h (McGill et al., 2011). En la presente investigación, los resultados mostraron que el GSH disminuyó solo después de las 12 h, lo cual es consistente con esta observación.

Debido a la variabilidad de los resultados obtenidos con Acet, en esta investigación no se considero este agente hepatotóxico adecuado para inducir daño y se estableció que el mejor inductor de daño fue el CCl₄ a las condiciones de incubación de 1h 30 min y a una concentración de 40 mM. Los resultados experimentales utilizando varios mediadores de estrés oxidativo confirman la participación de los radicales libres a través de la peroxidación lipídica reportada para este agente tóxico (Berger et al., 1986; Holden et al., 2000; Harries et al., 2001; Krithika et al 2009; Pareek et al 2013).

A la par del estudio en la línea celular se evaluó otra alternativa reciente para la investigación de aspectos tóxicos y metabólicos del hígado, con la utilización de CPHR. Estos representan un modelo intermedio entre el cultivo celular y los modelos *in vivo*. En este estudio se utilizaron dichos CPHR para evaluar el efecto del CCl₄ y Acet. La exposición directa de las rebanadas a CCl₄ mostró un incremento muy variable de ALT, AST, LDH y viabilidad celular. Por ello, se decidió inducir primero el daño con CCl₄ en la rata Wistar y posteriormente realizar los CPHR (a las 6 h). Realizando este cambio, la viabilidad disminuyó y la ALT se incrementó en comparación con GC (ambos parámetros de forma significativa) siendo el máximo cambio a las 24 h, sin embargo AST y LDH también se incrementaron pero sin ser significativo (Figura 15). Así mismo, hubo disminución de la CAO-T, SOD, GSH y hubo incremento de los niveles de MDA. Estos resultados obtenidos están de acuerdo a lo reportado en otras investigaciones en las cuales

se utilizó el CCl₄ como inductor de daño en CPHR (Sreelatha S et al., 2010; Liu Y et al., 2015). Por otro lado, la exposición de las rebanadas a Acet mostró un incremento de la ALT solo durante las primeras 12 h a la mayor dosis, mientras que AST se incrementó en función de la dosis y tiempo de exposición y la LDH mostró un incremento de forma variable. La viabilidad disminuyó en razón de dosis y tiempo. Estos resultados están de acuerdo a reportes previos donde a dosis de 10 mM durante 24h los CPHR muestran una reducción de viabilidad comparado con cortes control (Mukazayire MJ et al., 2010). Los resultados variables de las rebanadas con Acet fueron similares a los obtenidos en la línea celular HepG2, por lo que se confirmó que el CCl₄ fue el mejor inductor de daño en ambos modelos evaluados. Con base en los resultados obtenidos de los experimentos en las células HepG2 y los CPHR tras la inducción de daño con CCl₄ y Acet, se decidió evaluar solo el CCl₄ *in vivo*.

El daño por CCl₄ *in vivo* ha sido un modelo ampliamente estudiado y está determinado por cambios en las enzimas hepáticas y en tejido hepático. Se ha reportado la optimización de hepatotoxicidad inducida por CCl₄ en ratas Wistar, a través de la determinación de las enzimas ALT, AST, fosfatasa alcalina y bilirrubina total y se describió que la mejor vía de administración para inducir el daño fue la intraperitoneal; además, se ha reportado que el incremento máximo de las enzimas se observó a las 24h y que la dosis optima fue con 2 mL/kg (Janakat S et al., 2002). En la presente investigación se observó un efecto similar del daño por CCl₄ administrado vía intraperitoneal en las enzimas AST y ALT a las 24h. Los resultados de varios estudios han permitido concluir que los principales cambios histológicos inducidos por el daño con CCl₄ son la degeneración de hepatocitos, la presencia de necrosis e infiltración inflamatoria (Orhan DD et al., 2007; Shaker E et al.,

2010). Estos mismos hallazgos fueron encontrados para el grupo de ratas Wistar tratadas con CCl₄ en el presente estudio y por ello se utilizaron estas condiciones para evaluar los agentes hepatoprotectores en el modelo *in vivo*.

Para determinar el efecto hepatoprotector de la SLM, SLB y SLF, fue importante evaluar varias concentraciones de estos, a fin de probar que no fueran citotóxicos a las concentraciones de interés. Estos compuestos resultaron ser no citotóxicos hacia las células HepG2 ya que se determinó una viabilidad >60%, niveles de AST <50 UI/L, ALT<30 UI/L, CAO-T >2 mM y MDA, SOD, GSH similares las células control, esto de acuerdo con lo reportado por nuestro grupo de investigación y con otros reportes (Gazak R et al., 2010; Torres-González L et al., 2011; Oliveira DR et al., 2015; Cardile A.P., 2013). No existen reportes sobre estos agentes en CPHR, por lo que de acuerdo con nuestros resultados no se consideraron citotóxicos, ya que no hubo incremento significativo de AST, ALT, LDH, MDA o disminución significativa de SOD y GSH, ni una viabilidad celular >60% comparados con CPHR control.

A partir de la determinación de las condiciones experimentales de inducción de daño se evaluó el efecto hepatoprotector de la SLM, SLB y SLF *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. En estudios previos, se reportó que la SLM promueve un incremento de GSH así como la reducción de niveles de MDA, y se atribuyó este efecto principalmente a la SLB que es el componente mayoritario de la SLM (Valenzuela et al., 1989; Nencine et al., 2007). En la presente investigación se mostró que el pre-tratamiento con SLB en las células HepG2 a las mayores dosis previno las alteraciones bioquímicas indicativas del daño por CCl₄, mientras que la misma dosis de SLM no previno el daño. En la evaluación *ex vivo*, la SLM y la SLB en co-tratamiento a CCl₄ mostraron reducción de la liberación al medio de las enzimas

hepáticas, en los niveles de MDA e incremento en la actividad de CAO-T, GSH, SOD en comparación con los CPHR expuesto a CCl₄. En la evaluación *in vivo* solo el pretratamiento de las ratas Wistar con SLM y SLB a dosis de 70 mg/kg vía oral redujo la elevación de las enzimas AST y ALT indicativas de daño celular inducido por CCl₄. Por otro lado, se ha reportado que el tratamiento con SLM generó una reducción de la células inflamatorias y disminución de la degeneración de los hepatocitos, tras el daño inducido por CCl₄ (Shaker E et al., 2010). Estos mismos hallazgos se encontraron en los cortes histológicos en el presente estudio en el grupo de ratas tratadas con SLM y SLB y posterior daño con CCl₄.

En base a los reportes previos realizados por el grupo de investigación sobre el estudio de la actividad hepatoprotectora (Torres-González L et al., 2011) y antioxidante (Salazar R et al., 2011) de plantas de la región Noreste de México, se estableció que las plantas *Juglans mollis* y *C. americana* mostraron la mayor actividad hepatoprotectora. Por lo que, en el presente estudio se consideró evaluar el extracto de *C. americana* en el modelo de daño por CCl₄ en células HepG2 para corroborar la aplicación de este modelo de hepatoprotección. El extracto de *C. americana* mostró proteger a las células HepG2 contra el daño oxidativo generado por el CCl₄ evidencia de ello fue la disminución de la liberación de enzimas al medio de cultivo, incremento del GSH, indicando un efecto hepatoprotector.

Finalmente, se puede mencionar que el efecto hepatoprotector de la SLM es debido principalmente a su capacidad antioxidante. Diversos métodos se han empleado para evaluar la capacidad antioxidante y uno de los más referidos es el de DPPH. Este se empleó para medir la capacidad antioxidante del extracto de *C. americana*, SLM, SLB y SLF. Se demostró que la capacidad antioxidante fue mayor en SLB, seguida de SLM, sin embargo el SLF mostró un baja actividad. Una explicación posible para la baja actividad de SLF es

que hubiera interferencia de alguno de los constituyentes de la mezcla de la presentación evaluada (Silifos, selenio de metionina y ácido lipoico) (Medix®) o bien oxidación del compuesto en la presentación evaluada, ya que no era un compuesto puro. Estos resultados están de acuerdo a los diversos estudios que han reportado la gran capacidad antioxidante de SLB y SLM. (Oliveira DR et al., 2015; Gazak R et al., 2010). Por otra parte, el extracto de *C. americana* mostró una buena actividad antioxidante en comparación a la SLB y la quercetina. Los resultados en esta investigación coinciden con estudios en literatura que ya han reportado dicha actividad para esta planta (Shoeb M et al., 2006) y otras especies de este mismo género (Shoeb M et al., 2005; Shoeb M et al., 2007; Zengin G et al., 2010; Aktumsek A et al., 2011).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones

- El mejor agente hepatotóxico para utilizar en los modelos *in vitro* y *ex vivo* evaluados fue el CCl₄.
- El modelo de daño por CCl₄ en células HepG2 es una estrategia sencilla para el monitoreo de compuestos con potencial actividad hepatoprotectora.
- Los agentes hepatoprotectores SLM, SLB y SLF no fueron citotóxicos a los tiempos y dosis evaluadas en el modelo *in vitro* y *ex vivo*.
- En el modelo *in vitro* (HepG2) la SLB fue el mejor hepatoprotector a dosis de 150 ug/mL.
- En el modelo *ex vivo* se observó similitud al daño inducido *in vivo* por el CCl₄.
- El modelo *ex vivo* es una estrategia sencilla, que puede ser utilizada para seleccionar aquellos compuestos hepatoprotectores que se quieran evaluar *in vivo*.
- En el modelo *in vivo* (ratas Wistar) SLM y SLB mostraron tener efecto hepatoprotector a dosis de 70 mg/kg.
- El extracto de *C. americana* no fue citotóxico a los tiempos y dosis evaluadas y fue hepatoprotector en el daño inducido por CCl₄, en el modelo *in vitro*.
- El extracto de *C. americana* mostró una buena capacidad antioxidante por el ensayo de DPPH.

5.2 Perspectivas

- Evaluar la actividad hepatoprotectora de *C. americana* en el modelo *in vivo*.
- Realizar el aislamiento biodirigido del o los compuestos responsables de la actividad hepatoprotectora a partir del extracto de *C. americana*.
- Realizar la caracterización estructural del o los compuestos aislados de esta planta.
- Evaluar la actividad antioxidante, citotóxica y hepatoprotectora del o los compuestos obtenidos de *C. americana*.
- Evaluar la actividad del extracto metanólico de *C. americana* en otros modelos de daño por estrés oxidativo tal como el de isquemia-reperfusión hepática y renal.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Kader SM, El-Den Ashmawy EM. Non-alcoholic fatty liver disease: The diagnosis and management. *World J Hepatol.* 2015;7: 846-58.
- Abreu GOA, Cuellar CA. Estrategias en la selección de las plantas medicinales a investigar. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2008; 13: 0-0 http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962008000300009&lng=es.
- Ahmed A, Keefe EB. Hepatitis C virus and liver transplantation. *Clin Liver Dis.* 2001;5:1073-90.
- Ahmed M. Non-alcoholic fatty liver disease in 2015. *World J Hepatol.* 2015;7: 1450-9.
- Arbab AH, Parvez MK, Al-Dosari MS, Al-Rehaily AJ, Ibrahim KE, Alam P, Alsaid MS, Rafatullah S. Therapeutic efficacy of ethanolic extract of *Aerva javanica* aerial parts in the amelioration of CCl₄-induced hepatotoxicity and oxidative damage in rats. *Food Nutr Res.* 2016;60:30864.
- Argueta A, Cano LM, Rodarte ML. Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. 1a Ed, Vol III. Mexico: Instituto Nacional Indigenista; 1994. p.1374-1380. (*Verbena carolina*).
- Aktumsek A, Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Duran A. Screening for in vitro antioxidant properties and fatty acid profiles of five *Centaurea L.* species from Turkey flora. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(11):2914-20.

- Balderas-Renteria I, Camacho-Corona Mdel R, Carranza-Rosales P, Lozano-Garza HG, Castillo-Nava D, Alvarez-Mendoza FJ, et al. Hepatoprotective effect of *Leucophyllum frutescens* on Wistar albino rats intoxicated with carbon tetrachloride. *Ann Hepatol* 2007;6(4):251-4.
- Baali N, Belloum Z, Baali S, Chabi B, Pessemesse L, Fouret G, Ameddah S, Benayache F, Benayache S, Feillet-Coudray C, Cabello G, Wrutniak-Cabello C. Protective Activity of Total Polyphenols from *Genista quadriflora* Munby and *Teucrium polium geyrii* Maire in Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Rats. *Nutrients*. 2016;8(4):193.
- Barzaghi N, Crema F, Gatti G, Pifferi G, Perucca E. Pharmacokinetic studies on IdB 1016, a silybin- phosphatidylcholine complex, in healthy human subjects. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 1990;15(4):333-8.
- Bellentani S, Marino M. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Ann Hepatol*. 2009; 8: S4-8.
- Bessems JGM, Vermeulen NPE. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. *Crit Rev Toxicol* 2001; 31:55-138.
- Blumenthal M. Herbal Medicine: Expanded Commission E monographs 2000; 257-263.
- Bondy SC. Ethanol toxicity and oxidative stress. *Toxicol Lett* 1992; 63:231–242.
- Bottari NB, Mendes RE, Lucca NJ, Schwertz CI, Henker LC, Olsson DC, et al. Oxidative stress associated with pathological lesions in the liver of rats

experimentally infected by *Fasciola hepatica*. *Exp Parasitol*. 2015;159:24-28.

- Bouma ME, Rogier E, Verthier N, Labarre C, Feldmann G. Further cellular investigation of the human hepatoblastoma-derived cell line HepG2: Morphology and immunocytochemical studies of hepatic-secreted proteins. *In Vitro Cell Dev Biol* 1989; 25: 267-275.
- Carranza-Rosales P, Santiago-Mauricio MG, Guzmán-Delgado NE, Lozano-Garza G, Vargas-Villarreal J, Ventura-Juárez J, et al. Precision-cut hamster liver slices as an ex vivo model to study amoebic liver abscess. *Exp Parasitol*. 2010; 126:117-125.
- Carranza-Rosales P, Santiago-Mauricio MG, Guzmán-Delgado NE, Vargas-Villarreal J, Lozano-Garza G, Viveros-Valdez E, et al. Induction of virulence factors, apoptosis, and cytokines in precision-cut hamster liver slices infected with *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol*. 2012; 132: 424-433.
- Castañeda SR, Muñoz ELE. Hepatitis víricas agudas. *Hepatología desde la Biología Molecular al diagnóstico, tratamiento y prevención*. Ed Mc Graw Hill, 2007; 6: 75-89.
- Castillo-España P, Monroy-Ortiz C. *Plantas Medicinales utilizadas en el Estado de Morelos*. México: Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos; 2007.
- Cederbaum AI. Introduction—Serial review: Alcohol, oxidative stress, and cell injury. *Free Rad Biol Med* 2001; 31:1524–1526.
- Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline

by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology*. 2012; 142: 1592-609.

- Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2014; 20: 8082-91.
- Coballase-Urrutia E, Pedraza-Chaverri J, Cárdenas-Rodríguez N, Huerta-Gertrudis B, García-Cruz ME, Ramírez-Morales A, et al. Hepatoprotective effect of acetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl₄-induced toxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2011; 63(4):363-370.
- Cooper G, Laird A, Nahar L, Sarker SD. Lignan glucosides from the seeds of *Centaurea americana* (Compositae). *Biochem System Ecol*. 2002;30: 65-67.
- Comoglio A, Leonarduzzi G, Carini R, Busolin D, Basaga H, Albano E, Tomasi A, Poli G, Morazzoni P, Magistretti MJ. Studies on the antioxidant and free radical scavenging properties of IdB 1016 a new flavanolignan complex. *Free Radic Res Commun*. 1990;11(1-3):109-15.
- Conover CA, Leake PD. Insulin regulation of insulin-like growth factor-binding protein production in cultured HepG2 cells. *J Clin Endocrinol Met* 1990; 70: 1062-1067.
- Chang BY, Lee DS, Lee JK, Kim YC, Cho HK, Kim SY. Protective activity of kudzu (*Pueraria thunbergiana*) vine on chemically-induced hepatotoxicity: in vitro and in vivo studies. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16:39.
- Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830:3670-95.

- Dahlin DC, Miwa GT, Lu AY, Nelson SD. N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 1327–1331.
- Dhanasekaran M, Ignacimuthy S, Agastian P. Potential hepatoprotective activity of ononitol monohydrate isolated from *Cassia tora L.* on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in wistar rats. *Phytomedicine* 2009; 16: 891– 895.
- Di Bisceglie AM, Catithers RL, Gores GJ. Hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2003; 28: 1161-1165.
- Dongiovanni P, Lanti C, Riso P, Valenti L. Nutritional therapy for non-alcoholic fatty liver Disease. *J Nut Biochem* 2015, In Press.
- Duthie SJ, Melvin WT, Burke MD. Bromobenzene detoxification in the human, liver derived HepG2 cell line. *Xenobiotica* 1994; 24: 265-279.
- Ellenbroek B, Youn J. Rodent models in neuroscience research: is it a rat race?. *Dis Model Mech.* 2016;9(10):1079-1087.
- Farnsworth NR, Fabricant DS. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery, *Environ Health Perspect*, 1991; 109: 69-75.
- Favari-Perozzi L, Nava-Álvarez R, Meléndez-Camargo ME. Probable efecto hepatoprotector de la verbena en la hepatitis inducida con tetracloruro de carbono en la rata. *Rev Mex Cienc Farm* 2007; 38(3): 19-25.
- Fogden E, Neuberger J. Alternative medicines and the liver. *Liver Int.* 2003; 23(4):213-20.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin*

Invest. 2004;114:1752–1761.

- Galicia-Moreno M, Gutiérrez-Reyes G. The role of oxidative stress in the development of alcoholic liver Disease. Rev Gastroenterol Méx (English Edition) 2014; 79 (2): 135-144
- Gandolfi AJ, Wijeweera J, Brendel K. Use of precision-cut liver slices as an in vitro tool for evaluating liver function. Toxicol Pathol. 1996; 24:58-61.
- García AJS, Verde SMJ, Heredia N. Traditional uses and scientific knowledge of medicinal plant from México and Central America. J Herb Spices Med Plants 2001; 8: 37–81.
- Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX), 2012.
- Gutiérrez RM, Solís RV. Hepatoprotective and inhibition of oxidative stress in liver of *Prosthechea michuacana*. Rec Nat Prod 2009; 3(1): 46-51.
- Hart SG, Cartun RW, Wyand DS, Khairallah EA, Cohen SD. Immunohistochemical localization of acetaminophen in target tissues of the CD-1 mouse: correspondence of covalent binding with toxicity. Fundam Appl Toxicol 1995; 24: 260–274.
- Harries HM, Fletcher ST, Duggan CM, Baker VA. The use of genomics technology to investigate gene expression changes in cultured human liver cells. Toxicol In Vitro 2001; 15 (4-5): 399-405.
- Heinrich M, Ankli A, Frei B, Weimann C, Sticher O. Medicinal plants in Mexico:

Healers' consensus and cultural importance. *Soc Sci Med* 1998; 47(11): 1859-1871.

- Hinson JA, Roberts DW, James LP. Mechanisms of acetaminophen- induced liver necrosis. *Handb Exp Pharmacol*. 2010; 196: 369–405.
- Holden PR, James NH, Brooks AN, Roberts RA, Kimber I, Pennie WD. Identification of a possible association between carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and interleukin-8 expression. *J Biochem Mol Toxicol* 2000; 14(5): 283-90
- Ivanov AV, Bartosch B, Smirnova OA, Isaguliants MG, Kochetkov SN. HCV and oxidative stress in the liver. *Viruses*. 2013; 5: 439-69.
- Jaeschke H, McGill MR, Ramachandran A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab. Rev.* 2012; 44: 88–106.
- Jaeschke H, Williams DC, McGill M, et al. Models of drug-induced liver injury for evaluation of phytotherapeutics and other natural products. *Food Chem Toxicol* 2013; 55: 279-289.
- James LP, McCullough SS, Lamps LW, Hinson JA. Effect of N-acetylcysteine on acetaminophen toxicity in mice; relationship to reactive nitrogen and cytokine formation. *Toxicol Sci* 2003; 75:458-467.
- Janakat S, Al-Merie H. Optimization of the dose and route of injection, and characterisation of the time course of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2002; 48: 41-44.
- Jian J, Briedé JJ, Jennen DG, Van Summeren A, Saritas-Brauers K, Schaart G, et

- al. Increased mitochondrial ROS formation by acetaminophen in human hepatic cells is associated with gene expression changes suggesting disruption of the mitochondrial electron transport chain. *Toxicol Lett* 2015; 234: 139-150.
- Kershenovich D, Razavi HA, Sánchez-Avila JF, Bessone F, Coelho HS, Dagher L, et al. Trends and projections of hepatitis C virus epidemiology in Latin America. *Liver Int.* 2011; 31: 18-29.
 - Kikkawa R, Yamamoto T, Fukushima T, Yamada H, Horii I. Investigation of a hepatotoxicity screening system in primary cell cultures- “What biomarkers would need to be addressed to estimate toxicity in conventional and new approaches?” *J Toxicol Sci.* 2005; 30: 61-72
 - Krithika R, Mohankumar R, Verma RJ, Shrivastav PS, Mohamad IL, Gunasekaran P, et al. Isolation, characterization and antioxidative effect of phyllanthin against CCl₄-induced toxicity in HepG2 cell line. *Chem Biol Interact.* 2009;181(3):351-8.
 - Larson AM, Polson J, Fontana RJ, Davern TJ, Lalani E, Hynan LS, Reisch JS, Schiodt FV, Ostapowicz G, Shakil AO, Lee WM. Acute Liver Failure Study Group. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology* 2005; 42: 1364–1372.
 - Lawitz E, Poordad FF, Pang PS, Hyland RH, Ding X, Mo H, et al. Once Daily Sofosbuvir/ledipasvir fixed dose combination with or without Ribavirin resulted in $\geq 95\%$ sustained virologic response in patients with HCV genotype 1, including patients with cirrhosis: the LON-ESTAR study [AASLD Abstract 215]. *Hepatology* 2013; 58: 315 A
 - Lerche-Langrand C, Toutain HJ. Precision-cut liver slices: characteristics and use

for in vitro pharmaco-toxicology. *Toxicology* 2000;153: 221-53.

- Levent G, Ali A, Ahmet A, Polat EC, Aytac C, Ayse E, et al. Oxidative stress and antioxidant defense in patients with chronic hepatitis C patients. *J Transl Med.* 2006; 4: 25.
- Liu Y, Cao L, Du J, Jia R, Wang J, Xu P, Yin G. Protective effects of *Lycium barbarum* polysaccharides against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in precision-cut liver slices *in vitro* and *in vivo* in common carp. (*Cyprinus carpio L.*). *Comp Biochem Physiol, Part C* 2015; 169:65-72.
- Luna ALM, Roja AM. Medicina tradicional de México y sus plantas medicinales. URL: <http://www.tlahui.com/medic/medic18/planlun1.html>.2005.
- Luper S. A review of plants used in the treatment of liver disease: Part 1, *Altern Med Rev* 1998; 3: 410-421.
- Luper S. A review of plants used in the treatment of liver disease: Part 2. *Altern Med Rew* 1999; 4:178-188.
- Manns M, Marcellin P, Poordad F, De Araujo ESF, Buti M, Horsmans Y. et al. Simeprevir with pegylated interferon alfa 2a or 2b plus ribavirin in treatment-naive patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 2014;384:414
- Mathurin P, Bataller R. Trends in the management and burden of alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2015; 62:S 38-S46
- Méndez-Sánchez N, Uribe M. Conceptos actuales en hepatología, Capítulo 1, 3-9. Masson Doyma 2003.
- Méndez-Sánchez N, Villa AR, Chávez-Tapia NC, Ponciano-Rodríguez G,

Almeda-Valdés P, González D, et al. Trends in liver disease prevalence in Mexico from 2005 to 2050 through mortality data. *Annals Hepatol* 2005; 4: 52-55.

- Miranda-Beltran ML, Huacuja-Ruiz L, López-Velázquez AL, Panduro-Cerda A. Fitoterapia molecular como parte de la medicina alternativa complementaria en las enfermedades del hígado. *Invest Salud* 2005; 7: 64-70.
- Mittal S, El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma: consider the population. *J Clin Gastroenterol*. 2013; 47: S2–S6.
- Mohd Hanafiah K, Garcia M, Anderson D. Point-of-care testing and the control of infectious diseases. *Biomark Med*. 2013; 7: 333-47.
- Morazzoni P, Montalbetti A, Malandrino S, Pifferi G. Comparative pharmacokinetics of silipide and silymarin in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 1993;18(3):289-97.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63
- Nelson SD. Mechanism of the formation and disposition of reactive metabolites that can cause acute liver injury. *Drug Metab Rev* 1995; 27:147-177.
- Neuman MG, Cameron RG, Haber JA, Katz GG, Malkiewicz IM, Shear NH. Inducers of cytochrome P450 2E1 enhance metrotrexate-induced-hepatocytotoxicity. *Clin Biochem* 1999; 32: 519-536.
- NIH Consensus. NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002. *NIH Consens State Sci Statements* 2002; 19: 1-46
- Nordmann R, Riviere C, Rouach H. Implication of free radical mechanisms in ethanol–induced cellular injury. *Free Rad Biol Med* 1992; 12:219–240.

- Ohno N, Hirai H, Yoshioka H, Dominguez XA, Mabry T J. Cynaropicrin: A sesquiterpene lactone from *Centaurea americana*. *Phytochemistry*. 1973; 12: 221-22.
- Oliveira CP, Da Costa Gayotto LC, Tatai C, Della Bina BI, Janiszewski M, Lima ES, et al. Oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease, in rats fed with a choline-deficient diet. *J Cell Mol Med*. 2002; 6: 399-406.
- Orhan DD, Orhan N, Ergun E, Ergun F. Hepatoprotective effect of *Vitis vinifera* L. leaves on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. *J Ethnopharmacol* 2007; 112:145-151.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Panorama de la Inseguridad Alimentaria en América Latina y el Caribe, 2015. <http://www.fao.org>
- Organización Mundial de la Salud. Hepatitis B. 2012 / <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/es/>
- Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/inf-fs/en/fact204.html>. Abril de 2003.
- Organización Mundial de la Salud. Country statistics and global health estimates by WHO and UN partners. 2015 / http://who.int/gho/mortality_burden_disease/en/
- Pareek A, Godavarthi A, Issarani R, Nagori BP. Antioxidant and hepatoprotective activity of *Fagonia schweinfurthii* (Hadidi) Hadidi extract in carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in HepG2 cell line and rats. *J Ethnopharmacol*. 2013;150(3):973-81.
- Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin Y J, Bell BP. The contributions of

hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 2006; 45: 529-38.

- Phillipson JD. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry* 2001;56:237-43.
- Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *Eur J Med Chem* 2015; 97: 55-74.
- Poli G, Parola M. Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radic Biol Med* 1997; 22 (1): 287-305
- Reid AB, Kurten RC, McCullough SS, Brock RW, Hinson JA. Mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312:509-516.
- Risal P, Hwang PH, Yun BS, Yi HK, Cho BH, Jang KY, Jeong YJ. Hispidin analogue davallialactone attenuates carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *J Nat Prod.* 2012; 75: 1683-9.
- Rodríguez-Hernández H, Panduro-Cerda A, Burciaga-Nava JA , Reyes-Romero MA. Antifibrogenic effect of *Amole tuber* (Agave sp) in experimental cirrhosis and its antioxidant and scavenging properties. *J Hepatol*2000;32(S2):139.
- Romero CP, Reyes MH, Herrera AA, Lozoya LX, Tortoriello J. Aceptación de los fitofármacos por médicos y pacientes en clínicas de atención primaria. *Rev Med IMSS* 2004; 42: 125-130.
- Romo de Vivar A. *Productos Naturales de la flora Mexicana*. 1ª Edición. México: Guillermo Delgado; 1985: 1–38.

- Russell WMS, Burch RL. 1959. The principles of humane experimental technique. Methuen and Co.Ltd. London.
- Russo FP, Rodríguez-Castro K, Scribano L, Gottardo G, Vanin V, Farinati F. Role of antiviral therapy in the natural history of hepatitis B virus-related chronic liver Disease. *World J Hepatol.* 2015;7: 1097-104.
- Rusu E, Enache G, Jinga M, Dragut R, Nan R, Popescu H, et al. Medical nutrition therapy in non-alcoholic fatty liver disease - a review of literature. *J Med Life.* 2015; 8(3): 258-62.
- Salazar-Aranda R, Pérez-López LA, López-Arroyo J, Alanís-Garza BA, Waksman de Torres N. Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;2011:536139.
- Sassa S, Sugita O, Galbraith A, Kappas A. Drugs metabolism by the human hepatoma cell, HepG2. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 143: 52-57.
- Sreelatha S, Padma PR. Protective mechanisms of *Moringa oleifera* against CCl₄-induced oxidative stress in precision-cut liver slices. *Forsch Komplementmed* 2010;17(4):189-94.
- Schwartz JM, Reinus JF. Prevalence and natural history of alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis.* 2012;16: 659–66.
- Secretaria de Salubridad y Asistencia.
<http://www.ssa.gob.mx/epide/2010/sem05/cua85.html>
- Seeff LB, Lindsay KL, Bacon BR, Kresina TF, Hoofnagle JH. Complementary and Alternative Medicine in Chronic Liver Disease. *Hepatology* 2001; 34:595-603.
- Shaker E, Mahmoud H, Mnaa S. Silymarin, the antioxidant component and

Silybum marianum extract prevent liver damage. Food Chem Toxicol 2010; 48:803-806.

- Sherlock S. Diseases of the Liver and Biliary System Eighth Edition. Great Britain: Blackwell Scientific Publications, 2008; 1: 410-423.
- Shoeb M, Celik S, Jaspars M, Kumarasamy Y, MacManus SM, Nahar L, Thoo-Lim PK, Sarker SD. Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin, a unique indole alkaloid from the seeds of *Centaurea schischkini*. Tetrahedron 2005; 61: 9001-9006.
- Shoeb M, MacManus SM, Kumarasamy Y, Jaspars M, Nahar L, Thoo-Lin P.K., et al. Americanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignan, from the seeds of *Centaurea americana*. Phytochem. 2006; 67: 2370-2375.
- Shoeb M, MacManus SM, Jaspars M, Kong-Thoo-Lin P, Nahar L, Celik S, Sarker SD. Bioactivity of two Turkish endemic *Centaurea* species, and their major constituents. Braz J Pharmacogn. 2007; 17(2):155-159.
- Shoeb M, Celik S, Jaspars
- Sotelo-Felix JI, Martinez-Fong D, Muriel P, Santillan RL, Castillo D, Yahuaca P. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. J Ethnopharmacol 2002; 81(2): 145-154.
- Srdić-Rajić T, Konić Ristić A. Antioxidants: Role on Health and Prevention. Encyclopedia of Food and Health 2016: 227-233
- Suk KT, Kim MY, Baik SK. Alcoholic liver disease: treatment. World J Gastroenterol. 2014; 20:12934-44.

- Szokol LB, Sedlák É, Boldizsár I, Paku S, Preininger É, Gyurján I. (2010). Determination of dibenzylbutyrolactone-type lignans in *Centraurea* species and analysis of arctigenin's anticancer effect. *Plant Med* 2012;76: 568.
- Tanikawa K, Torimura T. Studies on oxidative stress in liver diseases: important future trends in liver research. *Med Mol Morphol*. 2006; 39: 22-7.
- Tawada A, Kanda T, Yokosuka O. Current and future directions for treating hepatitis B virus infection. *World J Hepatol*. 2015;7:1541-52.
- Thabrew MJ, Hughes RD, Mcfarlane IG. Screening of hepatoprotective plant components using a HepG2 cell cytotoxicity Assay. *J Pharm Pharmacol* 1997; 49: 1132-1135.
- Torres-González L, Waksman-de Torres N, Pérez-Meseguer J, Muñoz-Espinosa L, Salazar-Aranda R, Cordero Pérez P. Review of plants with hepatoprotective activity evaluated in México. *Medicina Universitaria* 2014; 16:78-86
- Tzeng JI, Chen MF, Chung HH, Cheng JT. Silymarin decreases connective tissue growth factor to improve liver fibrosis in rats treated with carbon tetrachloride. *Phytother Res*. 2013; 27: 1023-8.
- Ubago Pérez R, Castillo Muñoz MA, Navarro Caballero JA, Márquez Peláez S. Inhibidores de la proteasa (boceprevir y telaprevir) en el tratamiento de pacientes monoinfectados por el VHC: eficacia, seguridad y eficiencia comparada [Internet]. Sevilla: Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias, 2012. Informe 1/2012. URL: www.juntadeandalucia.es/salud/orgdep/AETSA
- Varga Z, Czompa A, Kakuk G, Antus S. Inhibition of the superoxide anion release and hydrogen peroxide formation in PMNLs by flavonolignanos. *Phytother Res*

2001; 15: 608-612.

- Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adult. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34: 274–285
- Villalobos Anguiano CG, Torres González L, Muñoz Espinosa LE, Carranza Rosales P, Sotelo Gallegos MJ, Cordero Pérez P. Uso de la medicina alternativa y complementaria entre los pacientes con enfermedad crónica de una Unidad de Hígado. *Rev Mex Endocrino Met Nut* 2014; 1: 158-63.
- Villalpando-Arteaga EV, Mendieta-Condado E, Esquivel-Solís H, Canales-Aguirre AA, Gálvez-Gastélum FJ, Mateos-Díaz JC, et al. *Hibiscus sabdariffa* L. aqueous extract attenuates hepatic steatosis through down-regulation of PPAR- γ and SREBP-1c in diet-induced obese mice. *Food Funct* 2013; 4(4):618-626.
- Vikran N, Pandurang G. Screening Methods for Hepatoprotective Agents in Experimental Animals. *Care and Cure the Liver*. 2013-09-06. LAP LAMBERT Academic Publishing. English.
- Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol*. 2003; 33: 105–136.
- Yang X, Salminen WF. Kava extract, an herbal alternative for anxiety relief, potentiates acetaminophen-induced cytotoxicity in rat hepatic cells. *Phytomedicine* 2011; 18: 592–600.
- Zengin G, Cakmak YS, Guler GO, Aktumsek A. In vitro antioxidant capacities and fatty acid compositions of three *Centaurea* species collected from Central Anatolia

region of Turkey. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(10):2638-41.

- Zhan A, Sun H, Wang X. Recent advances in natural products from plants for treatment of liver diseases. *Eur J Med Chem* 2013; 63: 570-577.
- Zholobenko A, Modriansky M. Silymarin and its constituents in cardiac preconditioning. *Fitoterapia.* 2014; 97: 122-32.

Resumen Autobiográfico



Liliana Torres González

**Candidato para el grado de Doctor en Ciencias
con orientación en Química Biomédica**

Tesis: Evaluación de agentes hepatoprotectores en el daño inducido por tetracloruro de carbono y acetaminofén y su aplicación en la evaluación de un extracto de *Centaurea americana*.

Campo de Estudio: Química Biomédica

Biografía:

Nacida el 7 de Diciembre de 1980 en Ciudad de México, México. Hija de María Guadalupe González Infante (†) y Rafael Torres Villar. Casada con Miguel Puebla Blanco.

Educación:

° **Maestría con orientación terminal en Química Biomédica.**

**Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L.
Agosto de 2005 a Agosto de 2007. / Fecha de examen: 30 de Agosto de 2007.**

° **Licenciatura de Químico Clínico Biólogo**

**Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L.
Septiembre de 1997 a Julio de 2002. / Fecha de examen profesional: 5 de diciembre de 2002.**

e-mail: lilitorresgtz@yahoo.com; lilianator@gmail.com