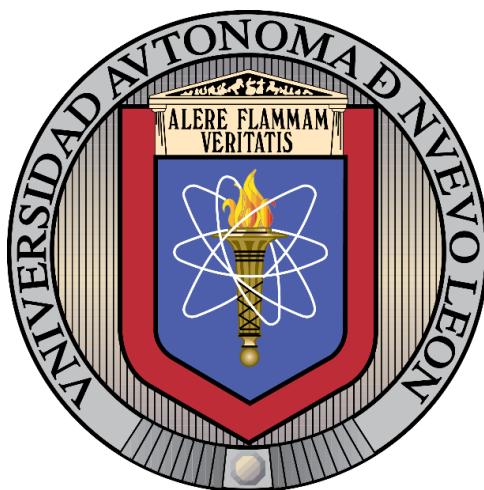


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA DE *Flourensia cernua* Y SU IMPACTO SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL AERÓBICA EN UN MODELO DE DAÑO INDUCIDO POR ACIDO VALPROICO EN RATAS

WISTAR

POR

Q.C.B JOSÉ MIGUEL DE LA ROSA GARCÍA

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

JULIO, 2024

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA DE *Flourensia cernua* Y SU
IMPACTO SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL AERÓBICA EN UN MODELO DE
DAÑO INDUCIDO POR ACIDO VALPROICO EN RATAS WISTAR

Aprobación de tesis:



Dra. C. Paula Cordero Pérez

Director de tesis



Dra. C. Verónica Mayela Rivas Galindo

Co-director de tesis



Dr. C. Luis Alejandro Pérez López

Comisión de tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su apoyo incondicional y sobre todo a mi madre Alicia García y mi padre José de la Rosa que siempre estuvieron para mí en todo momento.

Agradezco a la doctora Paula Cordero por darme las herramientas y la oportunidad de realizar investigación con ella, por los buenos consejos académicos y personales que me dio y por todo el apoyo brindado durante mi estancia.

A la doctora Verónica Rivas y al doctor Alejandro Pérez por su asesoramiento brindado para la culminación exitosa de este trabajo.

Agradezco al M.C Gustavo Govea, al QCB Daniel Garza y a la QCB Paola Cobos, por haber estado conmigo en los momentos difíciles, por todo el apoyo brindado y por sus palabras de aliento e impulsarme a salir adelante.

Agradezco a mis compañeros becarios, profesores y demás personal perteneciente a la Unidad de Hígado por todo su apoyo para la culminación de este trabajo y por todos los buenos ratos que pasamos durante toda mi estancia en la Unidad.

Gracias a todos por ayudarme a concluir este logro.

INDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1.1 Enfermedad hepática en México y el mundo	1
1.1.1 Hepatitis virales	3
1.1.2 Hepatopatía alcohólica	3
1.1.3 Enfermedad del hígado graso no alcohólico	4
1.1.4 Lesión hepática inducida por medicamentos	5
1.2 Desarrollo de fibrosis y progresión a cirrosis hepática	5
1.3 Modelos experimentales de daño hepático en animales	6
1.4 Uso de extractos de plantas para el tratamiento de enfermedades hepáticas	11
1.4.1 <i>Flourensia cernua</i> (Hojasén)	13
1.5 Impacto de los extractos de plantas sobre la microbiota intestinal	15
1.6 Justificación	17
1.7 Objetivo general	17
1.8 Objetivos específicos	18
MATERIAL Y MÉTODOS	19
2.1 Clasificación del estudio	19
2.2 Tamaño de muestra	19
2.3 Materiales y reactivos	19
2.3.1 Materiales	19
2.3.2 Anestésicos y antisépticos	20
2.3.3 Reactivos	20
2.3.4 Equipos	20
2.4 Estrategia General	21
2.5 Diseño experimental	22
2.5.1 Análisis bioquímico	24
2.5.2 Determinación de marcadores de estrés oxidativo	24
2.5.3 Análisis histológico	25
2.5.4 Análisis de microbiota	25
2.5.5 Análisis estadístico	26
RESULTADOS	28
3.1 Establecimiento del modelo agudo de daño hepático inducido por AVP ..	28

3.2 Evaluación de la no toxicidad y actividad hepatoprotectora del extracto hidroalcohólico de <i>Flourensia cernua</i> mediante la medición de marcadores bioquímicos	29
3.3 Evaluación de la no toxicidad y actividad hepatoprotectora del extracto hidroalcohólico de <i>Flourensia cernua</i> mediante la medición de marcadores de estrés oxidativo.....	31
3.4 Evaluación de la no toxicidad y actividad hepatoprotectora del extracto hidroalcohólico de <i>Flourensia cernua</i> mediante la evaluación morfológica de los grupos de estudio	33
3.5 Evaluación del impacto de la exposición de AVP y el extracto hidroalcohólico de <i>F. cernua</i> sobre la microbiota intestinal aeróbica empleando MALDI-TOF	34
DISCUSIÓN.....	38
4.1 Conclusiones	44
5. REFERENCIAS	45

LISTA DE TABLAS

I. Sistema de puntuación METAVIR para la evaluación de la fibrosis hepática y cirrosis	5
II. Agentes químicos utilizados para inducir daño hepático en modelos animales	7
III. Extractos de plantas con efecto hepatoprotector en modelos animales	12
IV. Principales microorganismos en el intestino humano	15

LISTA DE FIGURAS

1. Principales causas de muerte a nivel nacional desglosadas por sexo durante el periodo de enero-junio del 2023.....	2
2. Estructura química del ácido valproico.....	10
3. <i>Flourensia cernua</i>	14
4. Esquema de la estrategia general del estudio.....	21
5. Marcadores bioquímicos en los grupos SHAM y AVP.....	28
6. Evaluación de daño hepático mediante análisis histológico.....	29
7. Comparación de los marcadores bioquímicos entre los diversos grupos de estudio.....	31
8. Comparación de los marcadores de estrés oxidativo en los diversos grupos de estudio.....	32
9. Evaluación morfológica de los grupos de estudio empleando tinción HyE.....	33

10. Evaluación morfológica de los grupos de estudio empleando tinción tricromico de Masson.....	33
11. Comparación del porcentaje de abundancia de hepatocitos binucleados en dos distintas zonas en los diversos grupos de estudio.....	34
12. Especies bacterianas identificadas con alta confianza en heces fecales de los grupos de estudio por MALDI-TOF.....	35
13. Comparación de la carga bacteriana y proteobacterias en los diversos grupos de estudio.....	36
14. Mapa de calor del conteo bacteriano total en los distintos grupos de estudio.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Definición
ALB	Albúmina
ALT	Alanina aminotransferasa
ALP	Fosfatasa alcalina
AST	Aspartato aminotransferasa
AVP	Ácido valproico
CHC	Carcinoma hepatocelular
EHGNA	Enfermedad del hígado graso no alcohólico
<i>F. cernua</i>	<i>Flourensia cernua</i>
LDH	Lactato deshidrogenasa
LHIM	Lesión hepática inducida por medicamentos
MDA	Malondialdehído
MI	Microbiota intestinal
NTOX	No toxicidad
PT	Proteínas totales
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SHAM	Control sano
SOD	Superóxido dismutasa

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedad hepática en México y el mundo

El hígado cumple numerosas funciones metabólicas que lo hacen un órgano fundamental e importante para nuestro organismo, en las que se destaca su participación en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, la regulación del volumen sanguíneo, el apoyo del sistema inmunológico, el control endocrino de las vías de señalización del crecimiento, detoxificación de toxinas y fármacos, entre otras (Trefts *et al.*, 2017, Cheng *et al.*, 2021). Sin embargo, también es un órgano propenso a sufrir daño por distintos factores, tales como el consumo frecuente de medicamentos, consumo excesivo de alcohol, hábitos alimenticios poco saludables y con altos porcentajes de grasa, agentes infecciosos, entre otros, conllevando al desarrollo de diversas enfermedades hepáticas (Asociación Mexicana de Hepatología, 2020).

La enfermedad hepática representa más de 2 millones de muertes por año y es responsable del 4% de todas las muertes a nivel mundial (Devarbhavy *et al.*, 2023), mientras que a nivel nacional ésta representa la cuarta causa de muerte según el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática durante el periodo de enero-junio del 2023 (INEGI, 2024), con una prevalencia mayor en hombres que en mujeres (Figura 1).

Cuadro 1
10 PRINCIPALES CAUSAS¹ Y NÚMERO DE MUERTES, SEGÚN SEXO
 (enero-junio de 2023^P)

Rango	Total	Hombre	Mujer
1	Enfermedades del corazón 97 187 En 2022 fueron 105 752	Enfermedades del corazón 51 184 En 2022 fueron 57 040	Enfermedades del corazón 45 995 En 2022 fueron 48 702
2	Diabetes mellitus 55 885 En 2022 fueron 59 568	Diabetes mellitus 27 469 En 2022 fueron 29 871	Diabetes mellitus 28 415 En 2022 fueron 29 696
3	Tumores malignos 45 409 En 2022 fueron 44 322	Tumores malignos 21 529 En 2022 fueron 21 266	Tumores malignos 23 880 En 2022 fueron 23 054
4	Enfermedades del hígado 19 819 En 2022 fueron 20 547	Accidentes 14 858 En 2022 fueron 14 413	Enfermedades cerebrovasculares 8 682 En 2022 fueron 9 115
5	Accidentes 19 230 En 2022 fueron 18 648	Enfermedades del hígado 14 313 En 2022 fueron 15 030	Influenza y neumonía 7 258 En 2022 fueron 7 094
6	Enfermedades cerebrovasculares 17 766 En 2022 fueron 18 550	Agresiones (homicidios) 13 270 En 2022 fueron 14 020	Enfermedades del hígado 5 503 En 2022 fueron 5 513
7	Influenza y neumonía 16 386 En 2022 fueron 17 103	Influenza y neumonía 9 128 En 2022 fueron 10 004	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas 4 803 En 2022 fueron 4 404
8	Agresiones (homicidios) 15 082 En 2022 fueron 16 316	Enfermedades cerebrovasculares 9 081 En 2022 fueron 9 434	Accidentes 4 353 En 2022 fueron 4 190
9	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas 9 953 En 2022 fueron 9 394	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas 5 149 En 2022 fueron 4 990	Insuficiencia renal 3 454 En 2022 fueron 3 003
10	Insuficiencia renal 7 800 En 2022 fueron 6 897	Insuficiencia renal 4 346 En 2022 fueron 3 894	Septicemia 1 876 En 2022 fueron 1 664

Figura 1. Principales causas de muerte a nivel nacional desglosadas por sexo durante el periodo de enero-junio del 2023 (INEGI, 2024).

Las muertes son atribuibles en gran medida a las complicaciones de la cirrosis y al desarrollo de carcinoma hepatocelular (CHC). Las causas más comunes de cirrosis están relacionadas con hepatitis viral, hepatopatía alcohólica, enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) y lesión hepática inducida por medicamentos (LHIM) (Devarbhavy *et al.*, 2023).

1.1.1 Hepatitis virales

La hepatitis viral se refiere a la inflamación del hígado relacionada a una infección por virus de hepatitis A, B, C, D y E (Razavi, 2020). Las infecciones de algunos de estos virus puede desarrollarse en forma aguda y llegar a resolverse sin intervención alguna, sin embargo, en algunos casos donde la infección puede evolucionar a hepatitis crónica se requiere hospitalización y un tratamiento adecuado (Pisano *et al.*, 2021).

Los virus de la hepatitis B y C son los responsables de la mayoría de las muertes asociadas a hepatitis virales (Lanini *et al.*, 2019), con más de 1.1 millones de muertes reportadas en el año del 2020 (Devarbhavy *et al.*, 2023), lo que representa la principal causa de hepatitis en todo el mundo, por lo que es de suma importancia el desarrollo de tratamientos más efectivos para reducir la tasa de mortalidad y, por lo tanto, obtener un mejor pronóstico para los pacientes.

1.1.2 Hepatopatía alcohólica

La hepatopatía alcohólica se refiere al daño producido al hígado provocado por una ingesta excesiva de alcohol (Liu *et al.*, 2021), provocando la producción de metabolitos tóxicos como una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), causando daño que va desde la acumulación de lípidos en los hepatocitos hasta la inflamación, la fibrosis y la carcinogénesis (Dukić *et al.*, 2023, Seen, 2021).

Es conocida la relación que existe entre el consumo excesivo y prolongado de alcohol y la incidencia de una hepatopatía alcohólica, y se ha descrito que la cirrosis alcohólica tiene el peor pronóstico en comparación con la cirrosis originada por otra etiología, definiendo el alcohol como la principal causa de cirrosis a nivel mundial y responsable de casi el 60% de los casos de cirrosis en Europa, América del Norte y América Latina (Xiao et al., 2020, Devarbhavy et al., 2023).

1.1.3 Enfermedad del hígado graso no alcohólico

La EHGNA se caracteriza por la acumulación excesiva de grasa en el parénquima hepático, representando la enfermedad hepática crónica más común a nivel mundial, con una prevalencia estimada del 32.4% (Cotter & Rinella, 2020, Devarbhavy et al., 2023). Esta se encuentra asociada con factores metabólicos como la diabetes, resistencia a la insulina u obesidad principalmente (Tokushige et al., 2021).

México se encuentra entre los primeros lugares de obesidad a nivel mundial según la Encuesta Nacional de Salud y nutrición (ENSANUT, 2018). Esto es alarmante debido a que la EHGNA se desarrolla de manera acelerada debido principalmente a las epidemias mundiales de obesidad y diabetes, donde dietas hipercalóricas y altas en grasas se relacionan de manera directa al desarrollo de esta enfermedad (Pafili & Roden, 2021).

1.1.4 Lesión hepática inducida por medicamentos

Por otro lado, otra de las principales funciones del hígado es el metabolismo de xenobióticos, cuyo uso excesivo puede conllevar al desarrollo de LHIM, siendo la causa más común y significativa de insuficiencia hepática aguda a nivel mundial (Björnsson, 2019), principalmente en Asia, Estados Unidos, Europa e India (Andrade *et al.*, 2019).

1.2 Desarrollo de fibrosis y progresión a cirrosis hepática

Independientemente de la etiología, la enfermedad hepática es caracterizada por un daño prolongado del parénquima, con activación de la respuesta inflamatoria y, en consecuencia, desarrollo de fibrogénesis hepática, por la acumulación excesiva de componentes de la matriz extracelular por la activación de miofibroblastos hepáticos, células proliferativas, migratorias y profibrogénicas (Parola & Pinzani, 2019, Roehlen *et al.*, 2020).

La fibrosis hepática se clasifica de acuerdo a diversas escalas, donde una de las más comunes es la escala de METAVIR (Tabla I) (Smith *et al.*, 2019).

Tabla I. Sistema de puntuación METAVIR para la evaluación de la fibrosis hepática y cirrosis.

Nivel de fibrosis	Puntuación
Ausencia de fibrosis	F0
Fibrosis leve	F1

Fibrosis moderada	F2
Fibrosis grave	F3
Cirrosis	F4

Tabla tomada de Smith, A., Baumgartner, K., & Bositis, C. (2019).

La fibrosis leve a grave (F1 a F3) puede llegar a ser reversible mediante un tratamiento adecuado que elimine el agente etiológico y se restaure la arquitectura y la función del hígado (Kisseleva & Brenner, 2021), mientras que el estadio F4 se considera que ya no es reversible (Caligiuri *et al.*, 2021). Debido a esto, es esencial hacer un diagnóstico y tratamiento oportuno en etapas tempranas de la fibrosis para conducir a la resolución de la enfermedad y prevenir el avance hasta cirrosis o desarrollo de CHC.

1.3 Modelos experimentales de daño hepático en animales

Con el fin de mejorar la comprensión del origen y desarrollar nuevas herramientas de diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las enfermedades hepáticas, persiste el interés en utilizar modelos animales que reproduzcan las características clínicas, bioquímicas e histológicas de las enfermedades hepáticas en humanos, planteándose tres enfoques generales: las técnicas quirúrgicas las cuales incluyen resecciones hepáticas y desvascularización parcial o total del hígado, el uso de un agente químico el cual incluye la administración de hepatotoxinas y el uso de agentes infecciosos (Manibur Rahman & Hodgson, 2001), donde el uso de cada uno de estos modelos estará indicado para representar en gran medida una etiología en particular.

Los agentes químicos, han sido ampliamente utilizados para poder representar un daño hepático general y evaluar la actividad hepatoprotectora de algún fármaco o producto natural por medio de un tratamiento establecido. Con el empleo de agentes hepatotóxicos se ha evidenciado el daño por medio de la medición de marcadores bioquímicos, de estrés oxidativo y la evaluación histológica (tabla II), siendo el tetracloruro de carbono (CCl₄) la hepatotoxina más empleada, cuyo mecanismo de daño se basa en la formación del radical tóxico triclorometilo ($\bullet\text{CCl}_3$) producido por el citocromo P450E1 en los hepatocitos, el cual induce la peroxidación lipídica y daño a la membranas, provocando una necrosis centrolobulillar grave (Liu *et al.*, 2013).

Otro agente tóxico utilizado ha sido el acetaminofén o también conocido como paracetamol. Cuando existe un exceso de acetaminofén en el organismo se ven saturadas las vías de glucuronidación y sulfatación por las cuales se metaboliza el fármaco, al no ser posible esto se altera su metabolismo por medio del citocromo P450 a N-acetil-p-benzoquinoneimina, el cual interrumpe el flujo de calcio mitocondrial e induce daño celular por la formación de radicales hidroxilo, nitritos y nitratos, lo que lleva a la apoptosis y necrosis celular (Tuñón *et al.*, 2009).

Tabla II. Agentes químicos utilizados para inducir daño hepático en modelos animales.

Hepatotoxina	Dosis usada	Daño evidenciado	Referencia
--------------	-------------	------------------	------------

Tetracloruro de carbono	2 mL/kg disuelto en aceite de oliva	AST↑, ALT↑, Bilirrubina total↑, Citocinas proinflamatorias↑, Alteraciones histopatológicas	Amer <i>et al.</i> , 2022
Tetracloruro de carbono	1 mL/kg disuelto en aceite de oliva	Alteraciones histopatológicas (acumulación de grasa y cambios en la configuración interna de las células)	Otrubova <i>et al.</i> , 2018
Acetaminofén	600 mg/kg	Hallazgos histopatológicos revelaron áreas necróticas	Gokkaya <i>et al.</i> , 2022
Acetaminofén	3 g /kg	AST↑, ALT↑, Presencia de necrosis centrolobulillar, hemorragia, inflamación y exudados inflamatorios, y esteatosis.	Zakaria <i>et al.</i> , 2021
Tioacetamida	400 mg/kg	AST↑, ALT↑, ALP↑, Bilirrubina total↑, Bilirrubina directa↑, GGT↑, LDH↑	Urrutia- Hernández <i>et al.</i> , 2019
Tioacetamida	50 mg/kg	AST↑, ALT↑, ALP↑, Bilirrubina total↑, Se mostró inflamación lobulillar, esteatosis hepática, fibrosis, distensión hepatocelular y necrosis.	Kaur <i>et al.</i> , 2019
Dietilnitrosamina	100 mg/kg	AST↑, ALT↑, ALP↑, GGT↑, Alteraciones histopatológicas	Saber <i>et al.</i> , 2021
Dietilnitrosamina	20 mg/kg	ALT↑, Alteraciones	Abdel-Aziz

ALP: fosfatasa alcalina, ALT: Alanina aminotransferasa, AST: Aspartato aminotransferasa, GGT: gamma-glutamil transferasa, LDH: lactato deshidrogenasa, ↓disminución, ↑elevación.

A pesar de que existe una gran cantidad de modelos de daño hepático, cada uno de ellos presenta ciertas desventajas donde hace que su uso se vea limitado, principalmente por el riesgo que representan para el personal que manipulan estas hepatotoxinas y por la falta de reproducibilidad reportada entre estudios. Debido a esto se ha tenido la necesidad de optar por nuevos agentes hepatotóxicos que cubran estos puntos.

Durante los últimos años se ha visto un aumento considerable en el uso del ácido valproico (AVP) en modelos de daño hepático (Figura 2). El AVP es un fármaco indicado para el tratamiento de epilepsias y controlar las convulsiones, donde su principal acción va sobre los niveles del ácido gamma-aminobutírico (GABA) en el cerebro, generando un aumento de este neurotransmisor (Ghodke-Puranik *et al.*, 2013, Woolley & Mills, 2022), también se ha visto implicado en la modulación de los canales de sodio, calcio y potasio y aumenta el nivel extracelular de serotonina y dopamina (Perucca, 2002, Romoli *et al.*, 2019).

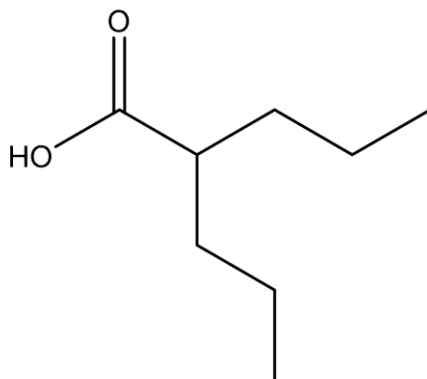


Figura 2. Estructura química del ácido valproico.

A pesar de su eficacia médica, se han notificado complicaciones graves después de una administración prolongada, incluida la hepatotoxicidad (Ezhilarasan & Mani, 2022). El mecanismo de hepatotoxicidad por AVP es atribuido a el estrés oxidativo y una actividad antioxidante desequilibrada que juegan un papel importante en la toxicidad a través de la alteración oxidativa de macromoléculas (Jafarian *et al.*, 2013), además, se ha demostrado que interfiere con la enzima carnitina palmitoil-transferasa I, la cual es clave en la β -oxidación de ácidos grasos mitocondriales y, por lo tanto, induce hepatotoxicidad y aumento de peso en pacientes bajo tratamiento con este medicamento (Begrache *et al.*, 2011).

Debido a esto, diversos estudios han establecido modelos de daño hepático usando el AVP, evidenciando su efecto principalmente a nivel histológico y bioquímico (Abdelkader *et al.*, 2020, Khodavar *et al.*, 2021), desplazando cada vez más el uso de los agentes hepatotóxicos convencionales; asimismo, este modelo de daño ha sido empleado para valorar el potencial efecto

hepatoprotector de extractos de plantas en modelos experimentales *in vivo* (Koroglu *et al.* 2021, Omidipour *et al.* 2021).

1.4 Uso de extractos de plantas para el tratamiento de enfermedades hepáticas

En la actualidad hay pocos medicamentos disponibles para la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades hepáticas, además de ser bajo el porcentaje de pacientes que se ven beneficiados con el tratamiento y de que el uso prolongado de estos medicamentos pueden provocar resistencia, toxicidad y/o baja de eficiencia (Anwanwan *et al.*, 2020), lo que genera la necesidad de desarrollar agentes hepatoprotectores seguros y efectivos, donde los productos naturales han sido una alternativa importante para el descubrimiento de nuevos compuestos con alguna actividad farmacológica.

Se sabe que los compuestos o extractos de productos naturales que presentan un efecto antioxidante pueden contribuir a prevenir y/o tratar enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo al eliminar la gran cantidad de ROS producidas y además de aumentar los niveles de enzimas antioxidantes propias del cuerpo (Singh *et al.*, 2016, Li *et al.*, 2015), debido a esto, diversas plantas y productos naturales han sido objeto de estudio para evidenciar su posible actividad hepatoprotectora frente a un modelo de daño hepático en animales (tabla III).

Tabla III. Extractos de plantas con efecto hepatoprotector en modelos animales.

Planta	Dosis usada	Resultado a tratamiento	Referencia
Extracto etanólico de <i>Justicia spicigera</i>	100 mg/mL durante 30 días	Disminución de la función hepática y aumento de la actividad de la catalasa y superóxido dismutasa.	Murillo-Villicaña <i>et al.</i> , 2022
Extracto etanólico de <i>Croton hypoleucus</i>	300 mg/kg/día durante 4 días	Reducción de marcadores de daño hepático y aumento de la expresión génica de superóxido dismutasa y catalasa	Urrutia-Hernández <i>et al.</i> , 2019
Extracto acetónico y metanólico de <i>Heterotheca inuloides</i>	100 mg/kg de ambos extractos por separado durante 6 días	Ambos extractos atenuaron el aumento de AST y ALT, el extracto metanólico previno el aumento de 4-hidroxinonenal y 3-nitrotirosina en hígado y aumento la actividad de superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión transferasa y glutatión reductasa.	Coballase-Urrutia <i>et al.</i> , 2011
Extracto metanólico de <i>Leucophyllum frutescens</i>	100 y 200 mg/kg 3 veces a la semana durante 28 días	Ambas concentraciones disminuyeron AST y ALT y mostraron una arquitectura hepática más conservada, sin fibrosis y menor inflamación en comparación con el grupo de daño	Balderas-Renteria <i>et al.</i> , 2007
Extracto	70 mg/kg	Disminución de AST y ALT	Delgado-

metanólico de	durante 3	Montemayor
Turnera diffusa	días	<i>et al.</i> , 2022
Cápsulas de	Disminución de AST y ALT en el	Cordero-
Hepatisan,	grupo tratado con Hepavida. El	Pérez <i>et al.</i> ,
Boldo,	tratamiento con Hepatisan mostró	2013
Hepavida,	un porcentaje más bajo de células	
infusión de	necróticas en comparación con los	
Boldo y	demás productos naturales.	
suplemento de		
cardo mariano		
(80% de		
silimarina)		

ALT: Alanina aminotransferasa, AST: Aspartato aminotransferasa.

Esto ha conllevado a generar una línea de investigación en la Unidad de Hígado para comprobar la actividad hepatoprotectora de distintos compuestos y extractos de productos naturales tanto en modelos *in vivo* (Delgado-Montemayor *et al.*, 2022, Cordero-Pérez *et al.*, 2013) como *in vitro* (Torres-González *et al.*, 2011). Por lo cual en este estudio se evaluó la actividad hepatoprotectora de una planta típica de la flora del noreste de México conocida como *Flourensia cernua*.

1.4.1 *Flourensia cernua* (Hojasén)

Flourensia cernua o más comúnmente llamada como hojase u hojaseén, es un arbusto de sabor amargo con un olor a lúpulo que crece en los desiertos al

norte de México (Figura 3). Esta planta ha sido utilizada en la medicina tradicional mexicana principalmente para el tratamiento de diversas enfermedades o complicaciones gastrointestinales como dolor de estómago, indigestión, diarrea y disentería (Mata *et al.*, 2003, Torres-León *et al.*, 2023), además, ha sido evidenciada su actividad antifúngica y bactericida (Tellez *et al.*, 2001, Molina-Salinas *et al.*, 2006, Molina-Salinas *et al.*, 2011).

Diversos estudios han puesto en evidencia también la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de esta planta mediante ensayos *in vitro*, además de reportar que posee un alto contenido en fenoles (Salazar *et al.*, 2008, Wong-Paz *et al.*, 2015), lo que sugiere que estos podrían ser los responsables de su actividad antioxidante, de esta forma, haciéndola candidata potencial para poder estudiar su posible efecto hepatoprotector.



Figura 3. *Flourensia cernua*.

1.5 Impacto de los extractos de plantas sobre la microbiota intestinal

La microbiota intestinal (MI) puede ser definida como un ecosistema diverso de microorganismos que residen en el tracto digestivo, la cual está comprendida principalmente por bacterias (Gomaa, 2020), donde en sujetos sanos, la MI cumple numerosas funciones que benefician al huésped, tales como regulación en el metabolismo de nutrientes, en el metabolismo y absorción de fármacos, producción de moléculas bioactivas, entre otras (Ding *et al.*, 2020, Silva *et al.*, 2020). La composición de la MI es compleja y abundante, con aproximadamente 10^{13} microorganismos siendo tres los filos dominantes en el intestino humano, los cuales son Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacterias que en conjunto comprenden más del 90% de las bacterias intestinales (Tabla IV) (Tumani *et al.*, 2021). La proporción de estos filos puede ser influenciada por distintos factores, tanto internos como externos, de los cuales los más comunes son debido al consumo de medicamentos, la alimentación, el estado fisiológico de la persona y en la aparición y desarrollo de enfermedades (Berding *et al.*, 2021).

Tabla IV. Principales microorganismos en el intestino humano.

Filo	Clases	Géneros representativos
Firmicutes	Bacili	Ruminococcus, Peptococcus,
	Clostridia	Peptostreptococcus, Clostridium, Lactobacillus, Enterococcus, Eubacterium, Fealibacterium

Bacteroidetes	Bacteroidia Flavobacteria Sphingobacteria	Bacteroides, Fusobacterium, Prevotella
Actinobacterias	Actinobacteria	Bifidobacterium, Actinomyces

Extracto de tabla tomada de Tumani *et al.*, 2021

Diversos estudios han evidenciado un cambio en la composición de la MI normal asociada con la aparición y el desarrollo de las enfermedades hepáticas, mostrando una diversidad reducida de especies benéficas para el organismo y un mayor desarrollo de especies patógenas no deseadas, causando alteraciones en la barrera intestinal, haciéndola más permeable a componentes bacterianos como lipopolisacáridos que pasan al hígado a través de los vasos sanguíneos del intestino, donde si el flujo es constante puede sobrecargarlo, provocando alteraciones metabólicas e inmunitarias (Bajaj & Khoruts, 2020, Xu *et al.*, 2022).

Se ha evidenciado tanto en modelos experimentales como en el humano, que el uso de productos naturales representa un tratamiento potencial para la restauración de la MI debido a su mezcla diversa de compuestos con efectos antioxidantes y antiinflamatorios como los polifenoles, promoviendo el crecimiento de bacterias benéficas que contribuyen a la salud en general y además restauran la composición de la barrera intestinal, evitando así el paso de componentes patógenos al hígado y disminuyendo así la inflamación (Merra

et al., 2020, Baslam *et al.*, 2023). Por lo anterior, se el interés de evaluar el efecto del extracto de *F. cernua* sobre la MI en el daño inducido por AVP.

1.6 Justificación

Las enfermedades crónicas del hígado representan un problema de salud a nivel mundial y nacional asociadas a comorbilidades con alta prevalencia como la diabetes y la obesidad, aumentando así las tasas de morbilidad y mortalidad atribuidas en gran medida a las complicaciones de la cirrosis. Actualmente de las enfermedades hepáticas más prevalentes solo la hepatitis C es curable, por lo que es esencial la búsqueda de nuevos tratamientos antifibróticos y antiinflamatorios, para dar en etapas más tempranas de la enfermedad hepática. Debido a esto, el uso de plantas medicinales ha representado una alternativa viable en la búsqueda de nuevos compuestos que muestren actividad hepatoprotectora. *Flourensia cernua* ha demostrado poseer compuestos que presentan actividad antioxidante, por lo que pudiera tener un efecto benéfico para el hígado, además es de interés establecer su impacto sobre la microbiota intestinal aeróbica y ver si favorece su efecto hepatoprotector por este extracto y desarrollar a futuro un fitobiótico.

1.7 Objetivo general

Evaluar la actividad hepatoprotectora de *Flourensia cernua* y su impacto sobre la microbiota intestinal aeróbica en un modelo de daño inducido por ácido valproico en ratas Wistar.

1.8 Objetivos específicos

1. Establecer un modelo de daño hepático por ácido valproico en ratas Wistar mediante la medición de marcadores bioquímicos y evaluación morfológica de los grupos de estudio.
2. Evaluar la no toxicidad y actividad hepatoprotectora del extracto hidroalcohólico de *Flourensia cernua* mediante la medición de marcadores bioquímicos, marcadores de estrés oxidativo y evaluación morfológica de los grupos de estudio.
3. Evaluar el impacto de la exposición de ácido valproico y el extracto hidroalcohólico de *Flourensia cernua* sobre la microbiota intestinal aeróbica empleando MALDI-TOF.

CAPÍTULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Clasificación del estudio

Estudio experimental, prospectivo y transversal.

2.2 Tamaño de muestra

Para llevar a cabo este proyecto de investigación, se realizó un estudio no probabilístico en base a la experiencia del equipo de investigación de la Unidad de Hígado del Hospital Universitario “Dr. José E. González”, se utilizaron 7 grupos de ratas Wistar con una $n=6$ en cada grupo de ambos sexos y con un peso de 200-300 g.

2.3 Materiales y reactivos

2.3.1 Materiales

- Camas para cirugía
- Pinzas hemostáticas
- Pinzas Adson con dientes
- Pinzas Alice
- Hojas de bisturí
- Tijeras
- Porta agujas
- Jeringas de 1 y 5 mL

- Guantes
- Tubos rojos
- Microtubos
- Varillas de vidrio estériles
- Histocassettes
- Tubos cónicos estériles de 1.5 mL
- Puntillas estériles de 1-10, 20-200, 100-1000 μL
- Pipetas automáticas de 1-10, 20-200 y 100-1000 μL
- Tubos cónicos estériles de 0.6 y 1 mL

2.3.2 Anestésicos y antisépticos

- Ketamina
- Xilazina
- Solución Microdacyn® 60 (OCULUS)

2.3.3 Reactivos

- Ácido valproico (Sigma Aldrich)
- Silibinina (Sigma Aldrich)
- Solución salina

2.3.4 Equipos

- ILab Aries (Instrumentation Laboratory, Werfen Company, USA)
- Lector espectrofotométrico de placas de ELISA

- μ Drop Plate
- BD Bruker Maldi Biotyper
- Multiskan Go
- Microcentrífuga refrigerada
- Agitador vortex
- Cabina de seguridad serie 1300 de Clase II, Tipo A2

2.4 Estrategia General

Para poder llevar a cabo el proceso general se realizó un esquema enlistando cada una de las tareas a realizar hasta la obtención y manejo de resultados (Figura 4).

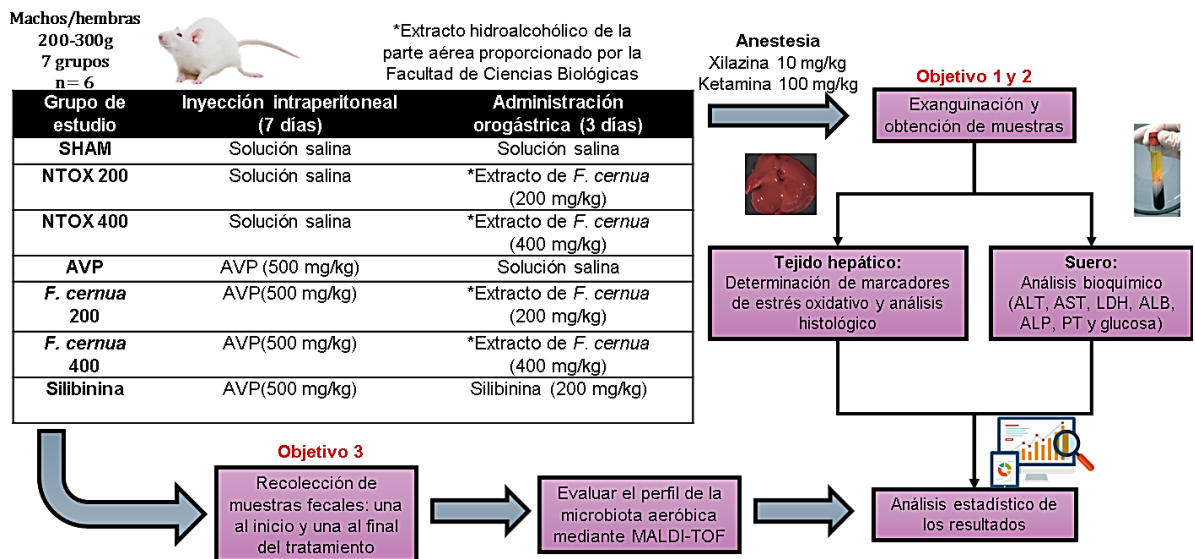


Figura 4. Esquema de la estrategia general del estudio. SHAM: control sano; AVP: ácido valproico; *F. cernua*: tratamiento; NTOX: no toxicidad. ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; ALB: albúmina; ALP: fosfatasa alcalina; LDH: lactato deshidrogenasa; PT: proteínas totales; mg/kg: miligramos por kilogramo.

2.5 Diseño experimental

Se emplearon 42 ratas Wistar las cuales fueron alojadas en jaulas de policarbonato en condiciones de temperatura y humedad adecuadas y bajo ciclos de luz/12h y oscuridad/12h y con libre acceso a agua y alimento estándar para roedores (Nutricubo, Nutrimix S.A de C.V). Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con el uso y cuidado adecuados de los animales de laboratorio, según lo aprobado por el Comité de Ética en investigación de nuestra institución registro **QA24-00001** y de acuerdo con las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Los grupos de estudio fueron:

- Grupo control sano (SHAM) se administró de manera intraperitoneal (i.p) 1 mL/día de NaCl 0.9% durante 7 días, además de la administración con sonda orogástrica de 1 mL/día de NaCl 0.9% durante los 3 días posteriores.
- Grupos control de daño por *F. cernua* (NTOX 200 y 400) se les administró 1 mL/día/i.p de NaCl 0.9% durante 7 días, además de la administración con sonda orogástrica de 200 mg/kg/día o 400 mg/kg/día de un extracto hidroalcohólico de *F. cernua* en un volumen máximo de aplicación de 1 mL durante los 3 días posteriores.
- Grupo control de daño por ácido valproico (AVP) se administró AVP en una dosis de 500 mg/kg/día/i.p durante 7 días, además de la

administración con sonda orogástrica de 1 mL/día de NaCl 0.9% durante los 3 días posteriores.

- Grupos para evaluar la actividad hepatoprotectora de *F. cernua* (*F. cernua* 200 y 400) se administró AVP a una dosis de 500 mg/kg/día/i.p durante 7 días, posteriormente de forma orogástrica se administró 200 mg/kg/día o 400 mg/kg/día de un extracto hidroalcohólico de *F. cernua* en un volumen máximo de aplicación de 1 mL durante los 3 días posteriores.
- Grupo de control positivo (Silibinina) se administró AVP a una dosis de 500 mg/kg/día/i.p durante 7 días, posteriormente de forma orogástrica se administró 200 mg/kg/día de silibinina (Sigma Aldrich) en un volumen máximo de aplicación de 1 mL durante los 3 días posteriores.

Los animales de todos los grupos, tras los 10 días de administración, se anestesiaron por vía i.p con 10 mg/kg de xilacina (Sedaject, Vedilab S.A. de C.V. Reg. SAGARPA Q-0088-122) y 100 mg/kg de ketamina (Anesket, PiSA Agropecuaria, S.A. de C.V. Reg. SAGARPA Q7833-028) y se sometieron a una laparotomía sobre mesa quirúrgica. Se realizó una incisión en el abdomen, se localizó el hígado, se disecó y extrajo. Tras este tiempo se procedió a obtener las muestras por exanguinación por punción de la arteria abdominal para obtener un volumen máximo de 5mL, posterior a este procedimiento se realizó eutanasia de acuerdo con las recomendaciones de la NOM-062-ZOO-1999. Finalmente, las muestras de sangre fueron centrifugadas por 15 min a 3500 rpm

y posteriormente el suero fue separado en alícuotas y congeladas hasta su posterior análisis. El tejido hepático fue dividido en 2 fragmentos, uno para el análisis histológico, el cual se colocó en formol al 10% y otro para la determinación de marcadores de estrés oxidativo el cual se congeló a -70°C en crioviales hasta su posterior análisis.

2.5.1 Análisis bioquímico

Las muestras de suero fueron analizadas en un equipo ILab Aries (Instrumentation Laboratory, Werfen Company, USA). Se evaluaron los marcadores bioquímicos ALT, AST, ALB, ALP, LDH, PT y glucosa utilizando kits comerciales y siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.5.2 Determinación de marcadores de estrés oxidativo

Se pesaron 200 mg de tejido hepático en un tubo cónico de 1 mL, se agregaron 500 μL de Tris-EDTA-DTT y se trituró utilizando una varilla de vidrio y en un sonicador con agua fría. Hasta tener un aspecto homogéneo, se le agregaron nuevamente 500 μL de Tris-EDTA-DTT. Posteriormente, se centrifugaron según lo indicado en los insertos y se separó el sobrenadante. Para la determinación de superóxido dismutasa (SOD) y malondialdehído (MDA) en homogenizados de tejido se utilizaron kits comerciales (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante para cada una de las determinaciones. La absorbancia se midió de acuerdo con las especificaciones de cada kit utilizando un lector de microplacas (Thermo Scientific Multiskan FC,

Waltham, USA). Se realizó la normalización de los resultados por el método de Bradford (Kruger NJ).

2.5.3 Análisis histológico

Se evaluó el daño hepático mediante un análisis histológico a partir del tejido hepático previamente recolectado en histocassetes y conservados en formaldehído al 10%. Se llevaron a cabo los cortes de los hígados recolectados y posteriormente se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina y Tricromicro de Masson, donde los cortes histológicos ya una vez teñidos, se observaron en un microscopio óptico para observar cambios morfológicos.

2.5.4 Análisis de microbiota

Para el análisis de la MI aeróbica se recolectaron las heces fecales de cada animal en los diferentes grupos de estudio pre y postratamiento, llevándose a cabo posteriormente dos etapas, la primera de ellas fue que a partir de las muestras fecales recolectadas se tomó su peso exacto y se diluyeron en 1 mL de NaCl 0,9% estéril y se mezclaron completamente mediante vórtice. Posteriormente se realizó la siembra con asas calibradas de 1 y 10 μ L sobre los medios de cultivo EMB (eosina y azul de metileno), TCBS (Tiosulfato-citrato-bilis sacarosa), MacConkey y XLD (xilosa, lisina, desoxicolato), donde las placas inoculadas e incubadas bajo condiciones aeróbicas a 37 °C durante 72 h. Luego de darse el crecimiento de las colonias se realizó el conteo correspondiente a cada morfología distinta observada y los resultados fueron

expresados como unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g). Como segunda etapa se llevó a cabo la preparación de espectros MALDI-TOF, donde una vez dado el crecimiento de bacterias se identificaron las distintas colonias y se aisló cada una de estas en una nueva placa de EMB, esto para poder tomar una colonia más pura donde posteriormente con ayuda de un aplicador de madera se dispone cada una de las colonias en la placa del MALDI donde se adiciona la matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico y se deja secar. Finalmente la placa se introdujo en el equipo BD Bruker Maldi Biotyper y se obtuvo el espectro de masas correspondiente a la bacteria identificada, el cual es comparado con el espectro que más corresponda en la base de datos del equipo, donde se obtiene un puntaje dado por el fabricante correspondiente al grado de confianza para la identificación, donde una puntuación de 2.0 fue indicativa de identificación a nivel de especie con alta confianza, puntuaciones entre 1.7 y 1.9 sugirieron identificación a nivel de género, y puntuaciones inferiores a 1.7 no se asignaron identidades.

2.5.5 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante el Software GraphPad Prism 8.0. Dependiendo del resultado de la prueba de normalidad de los datos se usó una prueba estadística ANOVA de una vía y Kruskal-Wallis con post hoc de Tukey y Dunn respectivamente, con el objetivo de determinar la existencia de diferencias significativas entre los grupos. Los resultados fueron expresados como media \pm desviación estándar, así como mediana con rango intercuartil

según el caso. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Establecimiento del modelo agudo de daño hepático inducido por AVP

Se estableció el modelo de daño hepático inducido por AVP a través de la evaluación de los marcadores bioquímicos, donde se encontró un aumento significativo en los niveles de ALT y AST en el grupo AVP (144.8 ± 23.41 U/L, 269.5 ± 79.53 U/L respectivamente) respecto al grupo SHAM (66.50 ± 16.10 U/L, 159.0 ± 51.64 U/L respectivamente), además de encontrar una disminución significativa en los valores de PT en el grupo AVP (5.550 ± 0.295 g/L) respecto al SHAM (6.283 ± 0.365 g/L), el resto de los marcadores bioquímicos evaluados no mostró cambios entre los grupos de estudio (Figura 5).

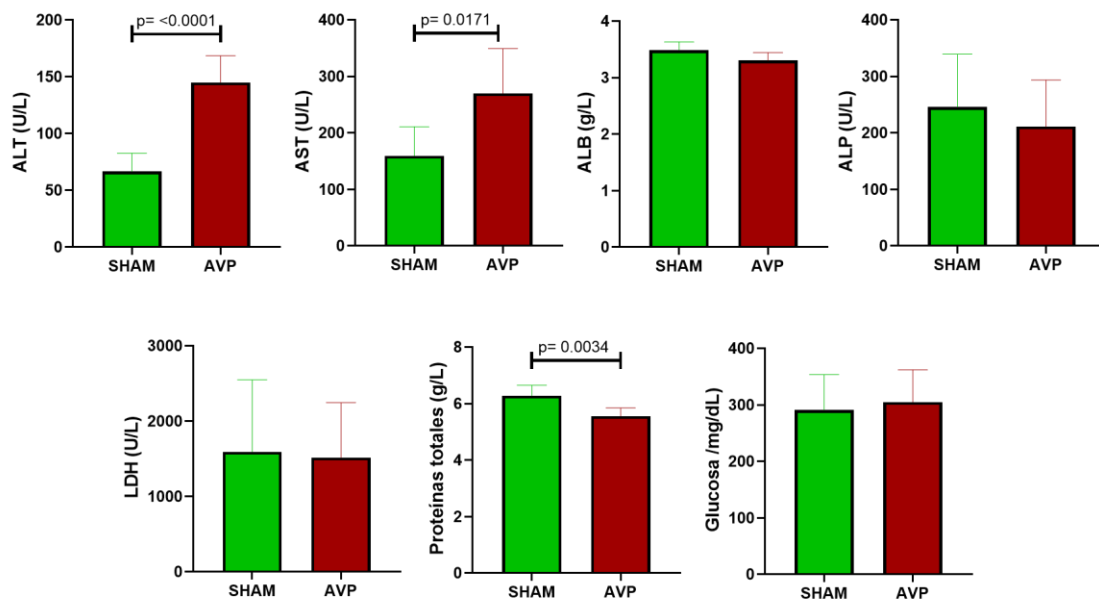


Figura 5. Marcadores bioquímicos en los grupos SHAM y AVP. SHAM: control sano; AVP: ácido valproico; ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; ALB: albúmina; ALP: fosfatasa alcalina; LDH: lactato deshidrogenasa; PT: proteínas

totales; mg/kg: miligramos por kilogramo. Valores expresados como media \pm desviación estándar.

Se realizó un análisis histológico de los grupos SHAM y AVP empleando una tinción convencional de hematoxilina y eosina, donde se apreció una arquitectura normal del hígado en ambos grupos, sin mostrar cambios patológicos en el tratado con AVP (Figura 6).

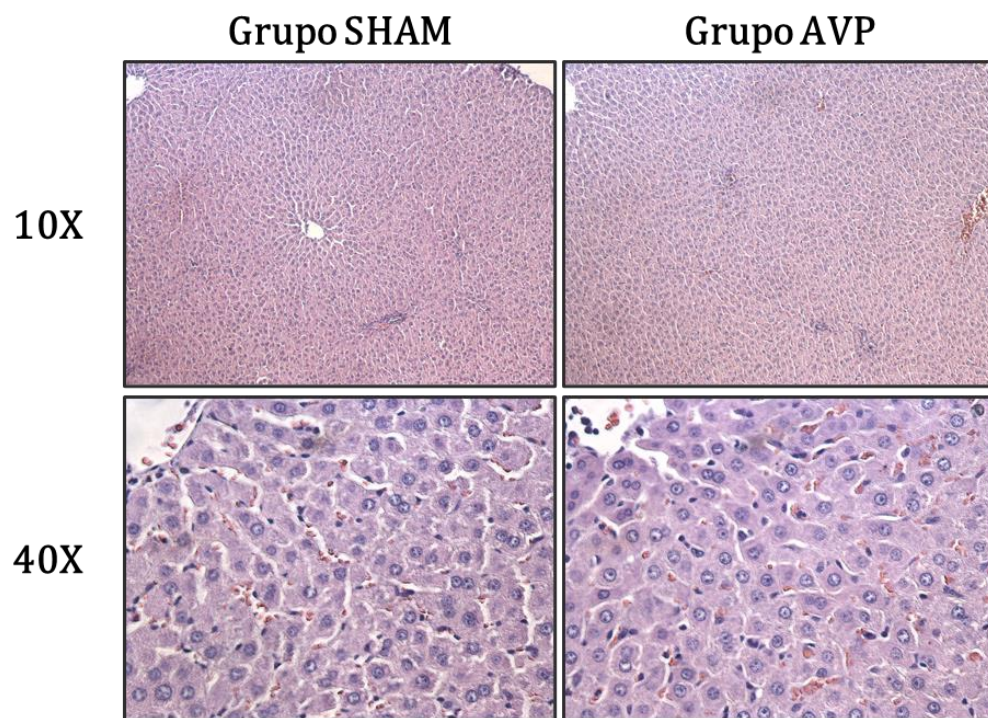


Figura 6. Evaluación de daño hepático mediante análisis histológico.

3.2 Evaluación de la no toxicidad y actividad hepatoprotectora del extracto hidroalcohólico de *Flourensia cernua* mediante la medición de marcadores bioquímicos

Se analizaron las concentraciones séricas de ALT, AST, ALB, ALP, LDH, PT y glucosa en los distintos grupos de estudio, se encontró una disminución

significativa en PT en el grupo AVP (5.550 ± 0.295 g/L) con respecto al SHAM (6.283 ± 0.365 g/L). En el caso de ALT y AST se obtuvo un aumento significativo en su concentración en el grupo AVP (144.8 ± 23.41 U/L, 269.5 ± 79.53 U/L respectivamente) respecto al grupo SHAM (66.50 ± 16.10 U/L, 159.0 ± 51.64 U/L respectivamente). Al analizar los resultados obtenidos de los grupos de no toxicidad a las dosis trabajadas del extracto, se observó que no hubo diferencia significativa en las enzimas hepáticas ALT y AST comparando el grupo NTOX 200 (61.00 ± 17.10 U/L, 123.2 ± 34.30 U/L respectivamente) y NTOX 400 (67.83 ± 19.15 U/L, 137.2 ± 47.41 U/L respectivamente) con el grupo SHAM (66.50 ± 16.10 U/L, 159.0 ± 51.64 U/L respectivamente). Además, en los grupos de tratamiento con el extracto, se observó que el grupo *F. cernua* 200 no pudo revertir el daño producido por AVP como lo muestran la elevación de las enzimas hepáticas ALT (150.0 ± 27.57 U/L) y AST (253.3 ± 80.66 U/L), obteniendo valores muy similares al grupo AVP, sin embargo, al evaluar el extracto en una dosis de 400 mg/kg/día de *F. cernua*, si se observó un efecto hepatoprotector disminuyendo significativamente los valores de estas enzimas hepáticas ALT (56.67 ± 25.97 U/L) y AST (115.5 ± 41.03 U/L) en comparación al grupo AVP y además, asemejándose en gran medida a los resultados obtenidos por el grupo de control positivo de hepatoprotección tratado con Silibinina, que mostró una concentración de ALT (53.0 ± 7.874 U/L) y AST (96.83 ± 13.51 U/L) sin diferencia significativa con esta última dosis del extracto de *F. cernua* (Figura 7).

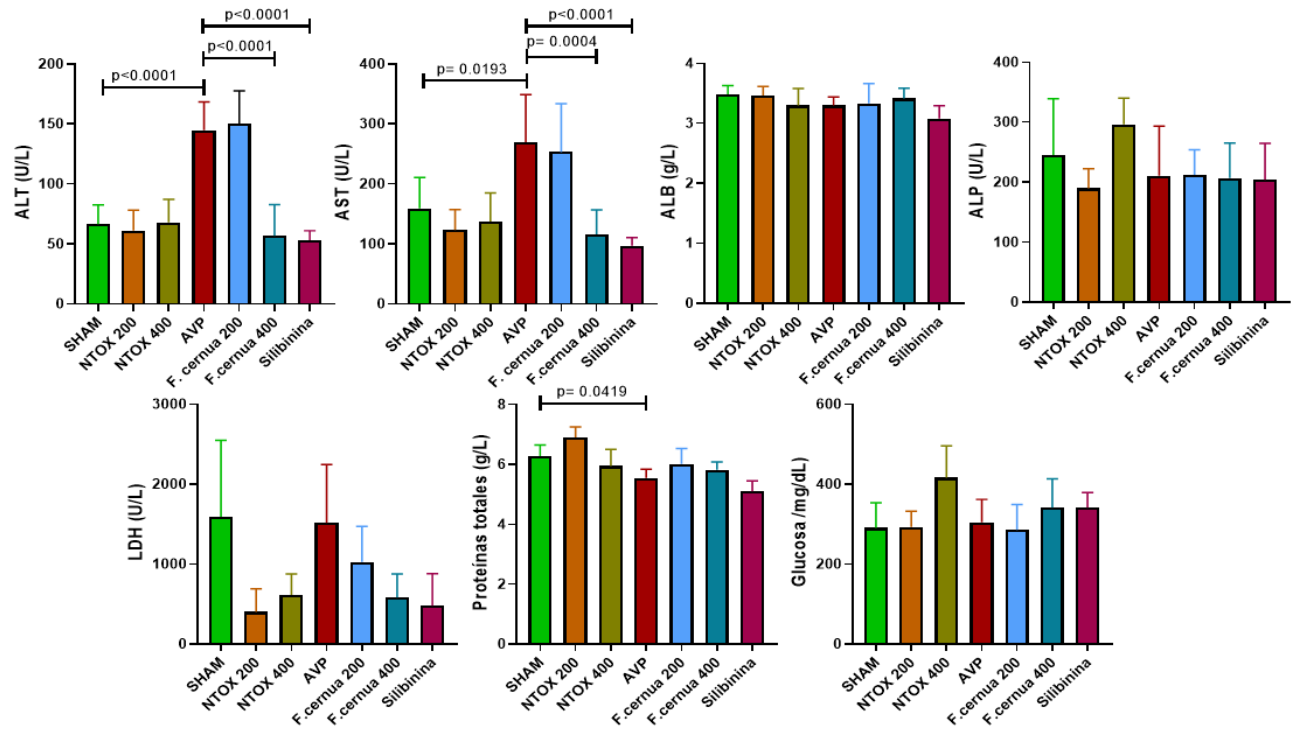


Figura 7. Comparación de los marcadores bioquímicos entre los diversos grupos de estudio. ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; ALB: albúmina; ALP: fosfatasa alcalina; LDH: lactato deshidrogenasa; U/L: unidades por litro; SHAM: control sano; AVP: ácido valproico; *F. cernua*: tratamiento; NTOX: no toxicidad. Valores expresados como media \pm desviación estándar.

3.3 Evaluación de la no toxicidad y actividad hepatoprotectora del extracto hidroalcohólico de *Flourensia cernua* mediante la medición de marcadores de estrés oxidativo

Se analizaron los niveles de MDA y SOD en los diversos grupos de estudio, mostrando un aumento significativo de MDA en el grupo AVP ($89.57 \pm 3.505 \mu\text{M}/\text{mg}$) contra SHAM ($39.83 \pm 2.483 \mu\text{M}/\text{mg}$), además, se observó una disminución significativa en los valores de MDA en el grupo AVP contra el grupo *F. cernua* 200 ($59.17 \pm 5.981 \mu\text{M}/\text{mg}$) y *F. cernua* 400 ($51.00 \pm 3.406 \mu\text{M}/\text{mg}$), donde puede observarse que este último grupo se asemeja a los resultados

obtenidos por el grupo tratado con Silibinina ($52.00 \pm 5.060 \mu\text{M}/\text{mg}$). Respecto a SOD se observó un aumento significativo en la actividad de esta enzima en el grupo AVP ($6.720 \pm 0.4752 \mu\text{M}/\text{mg}$) en comparación al grupo SHAM ($1.050 \pm 0.1986 \mu\text{M}/\text{mg}$), además, se observó una disminución significativa en los valores de SOD en los grupos *F. cernua* 200 ($3.917 \pm 0.4347 \mu\text{M}/\text{mg}$) y *F. cernua* 400 ($2.428 \pm 0.6122 \mu\text{M}/\text{mg}$) en comparación con el grupo AVP, donde se observó que este último grupo de tratamiento se asemeja a los resultados obtenidos por el grupo tratado con Silibinina ($2.233 \pm 0.3670 \mu\text{M}/\text{mg}$). Adicionalmente, se observó también un aumento significativo en la actividad de esta enzima en los grupos de NTOX 200 ($1.848 \pm 0.2717 \mu\text{M}/\text{mg}$) y NTOX 400 ($3.998 \pm 0.5537 \mu\text{M}/\text{mg}$) en comparación con el grupo SHAM (Figura 8).

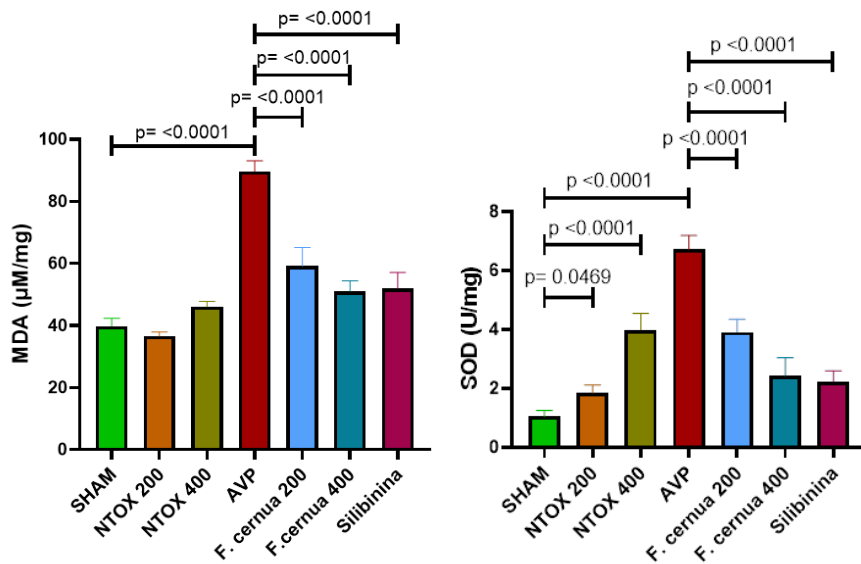


Figura 8. Comparación de los marcadores de estrés oxidativo en los diversos grupos de estudio. MDA: malondialdeído; SOD: superóxido dismutasa; $\mu\text{M}/\text{mg}$: micromolar por miligramo; U/mg: unidades por miligramo; SHAM: control sano; AVP: ácido valproico; *F. cernua*: tratamiento; NTOX: no toxicidad. Valores expresados como media \pm desviación estándar.

3.4 Evaluación de la no toxicidad y actividad hepatoprotectora del extracto hidroalcohólico de *Flourensia cernua* mediante la evaluación morfológica de los grupos de estudio

Se realizó el análisis histológico en los diversos grupos de estudio a través de la tinción de H&E y tricrómico de Masson y no se mostraron cambios estructurales importantes en los diversos grupos tratados en comparación al grupo SHAM (Figura 9 y 10).

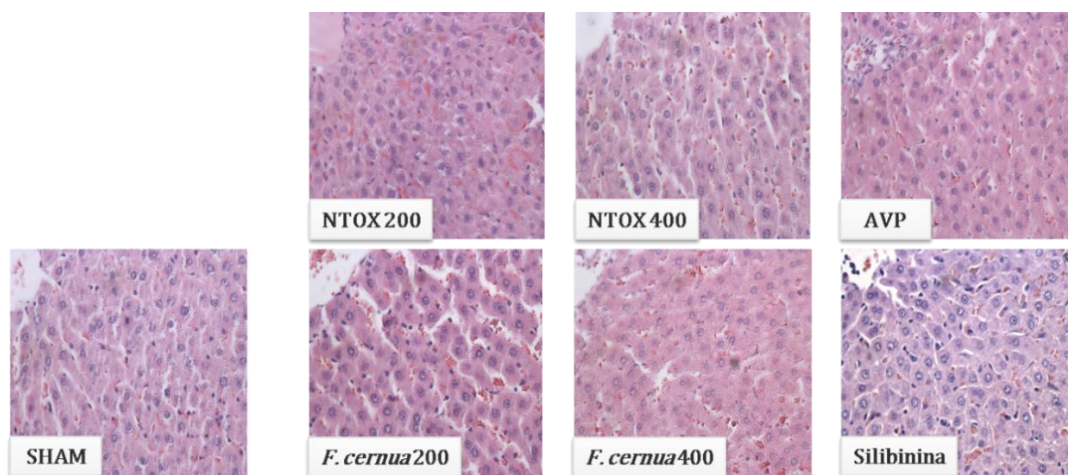


Figura 9. Evaluación morfológica de los grupos de estudio empleando tinción HyE. 40X.

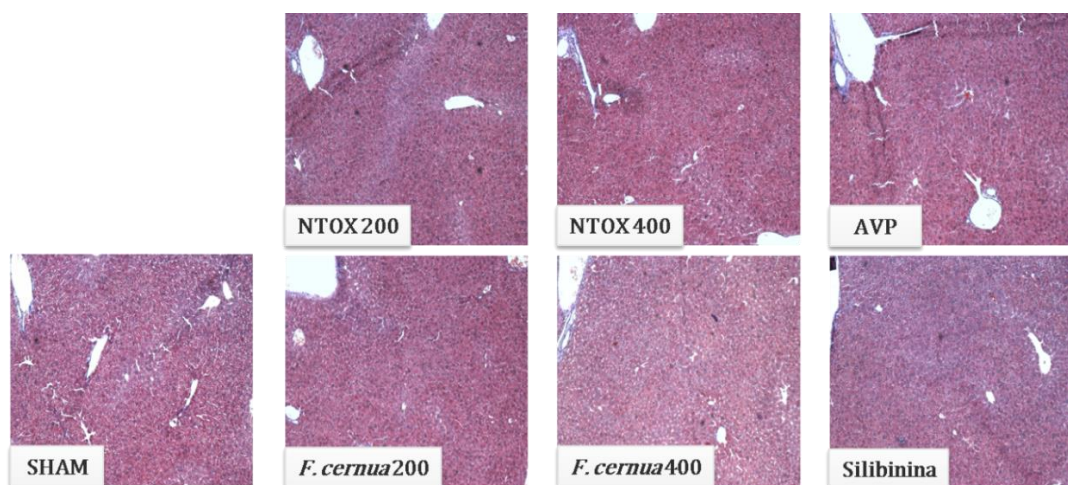


Figura 10. Evaluación morfológica de los grupos de estudio empleando tinción tricrómico de Masson. 40X.

Por otro lado, se realizó el conteo de células binucleadas en dos zonas específicas, en la zona centrolobulillar y periportal donde no se mostró una diferencia significativa entre el grupo AVP y el grupo SHAM, sin embargo, se mostró un aumento significativo en la abundancia de células binucleadas en la zona centrolobulillar en ambos grupos tratados con *F. cernua* vs AVP (Figura 11).

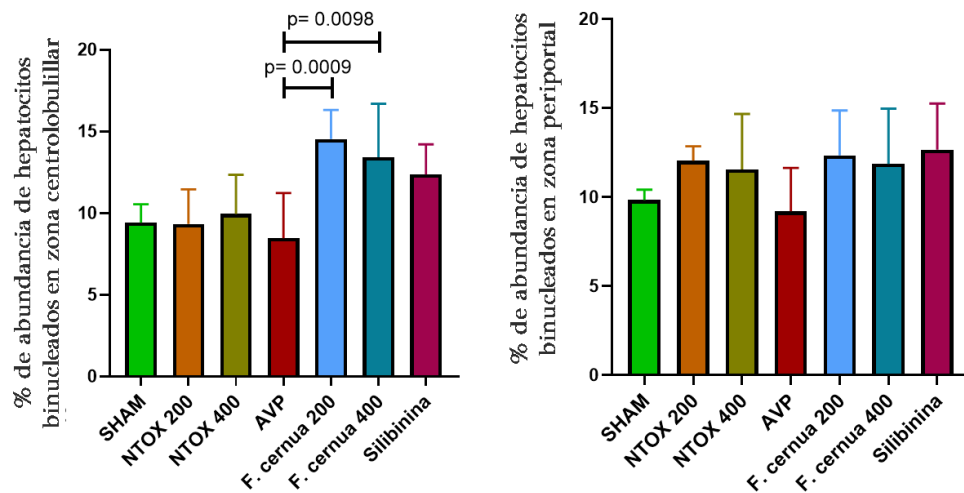


Figura 11. Comparación del porcentaje de abundancia de hepatocitos binucleados en dos distintas zonas en los diversos grupos de estudio.

3.5 Evaluación del impacto de la exposición de AVP y el extracto hidroalcohólico de *F. cernua* sobre la microbiota intestinal aeróbica empleando MALDI-TOF

En la evaluación del impacto del AVP y los extractos de *F. cernua* sobre la MI aeróbica en los diversos grupos de estudio se hizo la identificación de 15 especies distintas de bacterias con puntuaciones de identificación de alta confianza, siendo *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Escherichia coli y *Ochrobactrum intermedium* las que tuvieron una mayor frecuencia en todos los grupos de estudio (Figura 12).

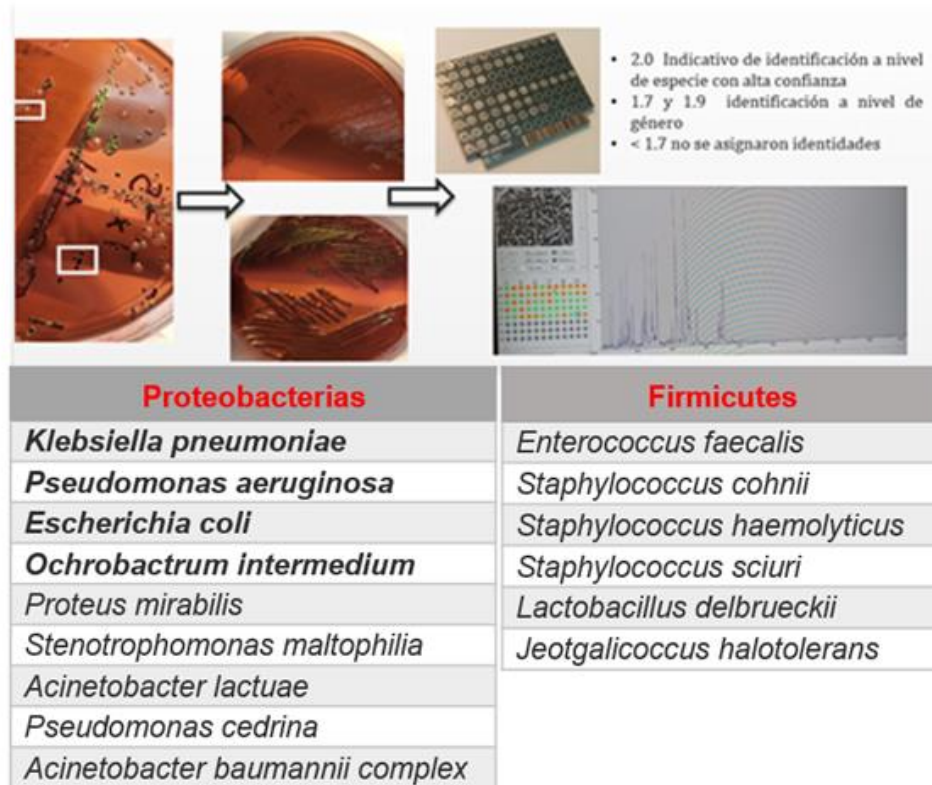


Figura 12. Especies bacterianas identificadas con alta confianza en heces fecales de los grupos de estudio por MALDI-TOF.

Una vez obtenida la identificación bacteriana correspondiente a cada una de las distintas colonias crecidas se procedió a relacionarlas con el conteo previamente realizado de las UFC/g, donde se realizó la comparación de la carga bacteriana total después del tratamiento correspondiente a cada uno de los grupos de estudio no encontrándose diferencia significativa, sin embargo, se observó que el grupo AVP presentó una disminución considerable en el conteo de bacterias totales, por otro lado, en los grupos *F. cernua* 200 y 400 mg/kg/día se mostró una tendencia en el incremento de la carga bacteriana y de

proteobacterias conforme aumento la concentración del extracto, esto mismo se observó en el grupo tratado con silibinina quien también mostró un mayor conteo de ambos parámetros evaluados (Figura 13).

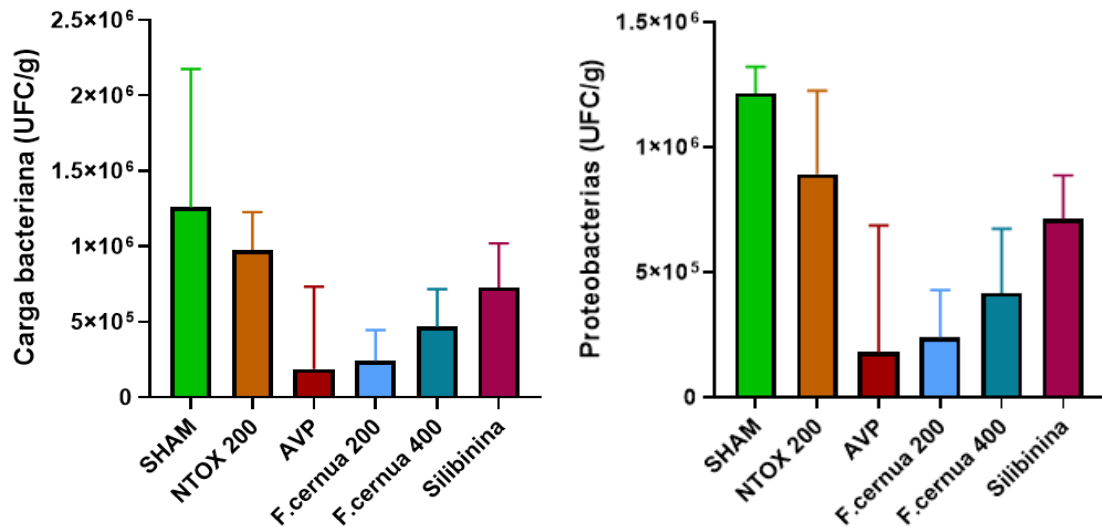


Figura 13. Comparación de la carga bacteriana y proteobacterias en los diversos grupos de estudio. UFC/g: unidades formadoras de colonia por gramo; SHAM: control sano; AVP: ácido valproico; *F. cernua*: tratamiento; NTOX: no toxicidad. Valores expresados como mediana \pm rango intercuartil.

Se realizó un mapa de calor para observar las distintas intensidades de color relacionadas a la cantidad de UFC/g en los distintos grupos de estudio en base a las bacterias de mayor frecuencia. Se observó que el grupo AVP mostró las intensidades de color más baja, mientras que en los grupos de tratamiento con *F. cernua* se mostró una restauración parcial en el conteo de estas bacterias acentuándose más este efecto en el grupo tratado con Silibinina (Figura 14).

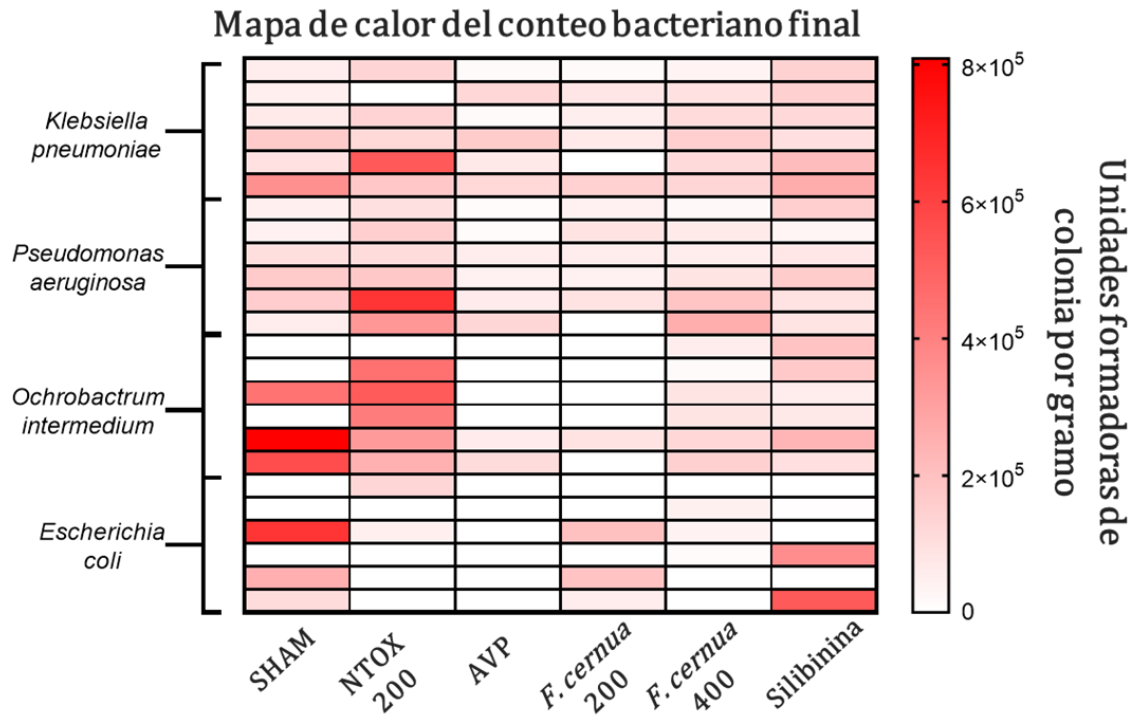


Figura 14. Mapa de calor del conteo bacteriano total en los distintos grupos de estudio. SHAM: control sano; AVP: ácido valproico; *F. cernua*: tratamiento; NTOX: no toxicidad.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

Las enfermedades hepáticas han representado un impacto significativo a la salud a nivel mundial, donde en México, estas enfermedades se encuentran dentro de las 10 principales causas de muerte según datos proporcionados por el INEGI durante el periodo de enero-junio del 2022, donde las muertes han sido atribuibles en gran medida a las hepatitis virales, la hepatopatía alcohólica y EHGNA.

El uso de modelos experimentales en animales que reflejen daño hepático ha tenido el enfoque de representar en gran medida las características clínicas que conlleva la enfermedad hepática en los humanos y de esta manera desarrollar nuevas herramientas de tratamiento. El AVP ha sido ampliamente utilizado durante los últimos años en diversos estudios para la inducción de daño hepático agudo, donde han sido reportadas altas concentraciones de ALT y AST que reflejan daño a nivel de lisis celular, tal como en un estudio donde se reportó un aumento significativo de estas enzimas al utilizar AVP a una dosis de 500 mg/kg durante 7 días 2 veces al día, (Nazmy *et al.*, 2017), estos resultados concuerdan con los encontrados en este trabajo donde se tuvo un aumento significativo de las enzimas hepáticas ALT y AST al comparar el grupo AVP vs SHAM, demostrando que hubo un daño hepático a la dosis utilizada de AVP. Por otro lado, se conoce que la disminución de proteínas totales es

indicativa de daño a nivel de síntesis hepática debido a una biosíntesis de proteínas defectuosa (Pareek *et al.*, 2013), tal como se reporta en el estudio previo donde la intoxicación por tetracloruro de carbono provocó una reducción en la biosíntesis de proteínas al ser utilizado durante una semana a una concentración de 1 mL/kg, estos resultados son similares a los encontrados en el presente estudio donde se mostró una disminución significativa en los niveles de PT en el grupo AVP en comparación al grupo SHAM. En el análisis histológico no se mostraron cambios patológicos importantes en el grupo AVP en comparación al grupo SHAM.

Los productos naturales han sido una alternativa importante para el descubrimiento de nuevos compuestos con alguna actividad farmacológica, entre ellas, aquellas plantas donde se reporta su efecto hepatoprotector. *Flourensia cernua* ha sido utilizada ampliamente en la medicina tradicional mexicana principalmente para tratar malestares gastrointestinales [56, 57], además de reportar actividad antifúngica, antibacteriana, anticancerígena, antiinflamatoria, antidiabética y una marcada actividad antioxidante (Linares-Braham *et al.*, 2023), sin embargo, aún no existen reportes publicados acerca de su posible actividad hepatoprotectora. En el presente estudio se puso en evidencia el posible efecto hepatoprotector de un extracto metánolico de la parte aérea de la planta a dos distintas concentraciones, donde se observó que a una concentración de 200 mg/kg el extracto no pudo revertir el daño producido por el AVP, obteniendo valores de ALT y AST muy similares al grupo

AVP, sin embargo, al evaluar el mismo extracto en una dosis de 400 mg/kg se observó un efecto hepatoprotector, disminuyendo significativamente los valores de estas enzimas hepáticas en comparación al grupo AVP y asemejándose así al grupo SHAM. Los grupos de NTOX no presentaron diferencia significativa comparados con el grupo SHAM, siendo indicativo que el extracto de *F. cernua* no presenta toxicidad a las dosis evaluadas, lo que concuerda con lo reportado por otros estudios (Linares-Braham *et al.*, 2023, Zavala *et al.*, 2010) . En el análisis histológico no se mostraron cambios patológicos importantes en los grupos de tratamiento en comparación al grupo SHAM.

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la generación de especies oxidantes y la capacidad de neutralización de los sistemas endógenos antioxidantes, el cual participa por distintos mecanismos como la oxidación de las principales clases de biomoléculas, llevando a la producción de especies reactivas provocando un daño (Sienes Bailo *et al.*, 2022). La peroxidación lipídica se considera un proceso donde los radicales libres atacan a los lípidos y se conduce a la formación de productos que incluyen radicales lipídicos peroxilo e hidroperóxidos, así como de productos secundarios predominantes. Entre éstos se encuentra el MDA (Aguilar Diaz De Leon & Borges, 2020), el cual ha sido ampliamente utilizado como un marcador de peroxidación lipídica, donde se ha reportado en diversos estudios un aumento significativo de este producto con el uso del AVP en modelos de daño agudo (Jamshidzadeh *et al.*, 2023, RAZA *et al.*, 1997). Estos resultados son similares a los encontrados en el presente estudio, donde se observó un aumento significativo de esta molécula

en el grupo AVP en comparación con el grupo SHAM, también se observó que ambos grupos de tratamiento con el extracto de *F. cernua* además del control positivo con silibinina, mostraron niveles significativamente menores del contenido de MDA hepático.

Por otro lado, la medición de SOD el cual es una enzima de tipo endógeno con actividad antioxidante, es considerada como el principal recurso de la célula para combatir el estrés oxidativo, donde se ha reportado en estudios previos su incremento significativo en el grupo tratado con AVP de manera aguda, lo que puede explicarse como un mecanismo compensatorio que combate el aumento del estrés oxidativo observado con la aparición de la hepatotoxicidad inducida (Nazmy *et al.*, 2017); estos resultados concuerdan a los encontrados en el presente estudio, donde se observó un aumento significativo en su actividad en el grupo AVP respecto al SHAM, además de observar que en ambos grupos de tratamiento con el extracto de *F. cernua* se restableció la actividad de SOD, es de destacar que el grupo de *F. cernua* 400 presentó la misma actividad que el grupo tratado con silibinina, un conocido compuesto hepatoprotector. Se observó un aumento significativo en la actividad de SOD en ambos grupos de NTOX de una forma dosis dependiente, estos resultados son comparables con lo reportado en otros estudios donde la administración oral de extractos hidroalcohólicos de diversas plantas aumenta por sí solo la actividad de la enzima de una forma dosis dependiente (Bahekar & Kale, 2016, Onoja *et al.*, 2014), sugiriendo que el extracto de *F. cernua* posee una actividad antioxidante *in vivo* y es capaz de mejorar el efecto de las ROS en el sistema biológico,

además, se ha reportado que las plantas contienen diversas isoformas de SOD las cuales desempeñan un papel importante en la tolerancia al estrés de las plantas (Stephenie *et al.*, 2020), pudiendo inferirse que el aumento de la actividad de la enzima es propia del contenido ya existente de la planta y que su aumento no se debe a una toxicidad, si no a una manera de preservar la actividad de la enzima, considerándose un mecanismo de protección del extracto.

Los resultados obtenidos por el análisis histológico no mostraron diferencias significativas sobre los grupos tratados en comparación con el grupo SHAM, estos resultados pueden deberse a que el tiempo de exposición al daño no es el suficiente para que se vean reflejados estos cambios a nivel histológico. En diversos estudios donde es utilizado el AVP como agente inductor de daño hepático por un tiempo de exposición mayor, se hace evidente el daño mediante dilatación y congestión sinusoidal hepática, así como infiltración de células inflamatorias (Cui *et al.*, 2024). El conteo de células binucleadas es de importancia debido a que, durante la regeneración hepática tras haber estado expuesto a un daño, los hepatocitos se someten a una o dos rondas de regeneración para restaurar la masa hepática perdida (Celton-Morizur & Desdouets, 2010). Sin embargo, no se observó una diferencia significativa en el grupo AVP contra el grupo SHAM, ya que se hubiera esperado un menor número de células binucleadas en este primer grupo a causa de la hepatotoxicidad inducida. Por otro lado, se mostró un aumento significativo en la abundancia de células binucleadas en la zona centrolobulillar en ambos

grupos tratados con *F. cernua*, con lo cual se infiere que el extracto hidroalcohólico de esta planta induce la división hepática, lo que pudiera indicar un mecanismo de protección a nivel hepático. Además, no se mostraron cambios estructurales importantes al emplear la tinción de tricromicro de Masson, ya que un daño evidente hubiera sido encontrar tejido cicatricial en el parénquima hepático lo cual no se evidenció y solo se tiñó la adventicia de los vasos sanguíneos considerado como algo normal.

Por otra parte, la composición de la MI puede ser influenciada por distintos factores, tanto internos como externos, siendo uno de los más comunes el consumo de medicamentos, incluyendo los indicados para tratar convulsiones como el AVP, donde se ha reportado que su uso en pacientes afecta la composición y diversidad de la MI (Amlerova *et al.*, 2021). A pesar de que no ha sido puesto en evidencia el papel del AVP sobre la MI en modelos de daño hepático, lo que más se asemeja y en el cual existen numerosos estudios son el uso del AVP en los modelos de autismo, donde se ha reportado una reducción en la diversidad microbiana fecal y un cambio en su composición (Liu *et al.*, 2018), lo cual concuerda con lo observado en el presente estudio donde el grupo tratado con AVP presentó una reducción considerable en la carga bacteriana total en comparación con el grupo SHAM. Además, se ha evidenciado que el uso de productos naturales es un tratamiento potencial para la restauración de la MI, atribuyéndose principalmente al efecto antioxidante y antiinflamatorio que poseen los polifenoles (Merra *et al.*, 2020, Baslam *et al.*,

2023), esto concuerda con los resultados del presente estudio donde en ambos grupos de tratamiento se observó una tendencia en restablecer los niveles normales de la MI en comparación con el grupo SHAM y siendo este mas marcado en el grupo tratado con silibinina.

4.1 Conclusiones

- Se estableció el modelo de daño hepático inducido por ácido valproico evidenciado a través de marcadores bioquímicos.
- El extracto hidroalcohólico de *F. cernua* no mostró toxicidad a las dosis evaluadas y mostró un efecto hepatoprotector solo a la dosis de 400 mg/kg evidenciado a través de marcadores bioquímicos y de estrés oxidativo.
- A nivel histológico no se observaron cambios en los distintos grupos de estudio.
- El análisis por MALDI-TOF identificó principalmente como microbiota intestinal aeróbica a *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Ochrobactrum intermedium*, en los distintos grupos de estudio.
- El ácido valproico disminuyó considerablemente el conteo total de bacterias y el extracto hidroalcohólico de *F. cernua* mostró una tendencia a restablecer parcialmente el conteo normal de bacterias.

5. REFERENCIAS

1. Abdel-Aziz, N., El-Sonbaty, S. M., & Hegazy, M. G. A. (2021). Ameliorative potential of manganese nanoparticles with low-level ionizing radiation against experimentally induced hepatocarcinogenesis. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(46), 65474–65486. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15571-1>
2. Abdelkader, N. F., Elyamany, M., Gad, A. M., Assaf, N., Fawzy, H. M., & Elesawy, W. H. (2020). Ellagic acid attenuates liver toxicity induced by valproic acid in rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, 143(1), 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2020.01.007>
3. Aguilar Diaz De Leon, J., & Borges, C. R. (2020). Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. *Journal of Visualized Experiments*, 159. <https://doi.org/10.3791/61122>
4. Amer, M. A., Othman, A. I., EL-Missiry, M. A., Farag, A. A., & Amer, M. E. (2022). Proanthocyanidins attenuated liver damage and suppressed fibrosis in CCl₄-treated rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(60), 91127–91138. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22051-7>
5. Amlerova, J., Šroubek, J., Angelucci, F., & Hort, J. (2021). Evidences for a Role of Gut Microbiota in Pathogenesis and Management of Epilepsy. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5576. <https://doi.org/10.3390/ijms22115576>
6. Andrade, R. J., Chalasani, N., Björnsson, E. S., Suzuki, A., Kullak-Ublick, G. A., Watkins, P. B., Devarbhavi, H., Merz, M., Lucena, M. I., Kaplowitz, N., &

- Aithal, G. P. (2019). Drug-induced liver injury. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 58. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0105-0>
7. Anwanwan, D., Singh, S. K., Singh, S., Saikam, V., & Singh, R. (2020). Challenges in liver cancer and possible treatment approaches. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1873(1), 188314. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.188314>
 8. Asociación Mexicana de hepatología. (2020). *Medicina de precisión en hepatología* (Castro Narro Graciela Elia, Cerda Reyes Eira, Flores Calderón Judith, Moreno Alcántar Rosalba, & Ruiz Velasco José Antonio Velarde, 1a. edición. México: Arquitónica.).
 9. Bahekar, S., & Kale, R. (2016). Evaluation of antioxidant activity of *Manihot esculenta* Crantz in wistar rats. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, 8(2), 119. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.171697>
 10. Bajaj, J. S., & Khoruts, A. (2020). Microbiota changes and intestinal microbiota transplantation in liver diseases and cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 72(5), 1003–1027. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.01.017>
 11. Balderas-Renteria, I., Camacho-Corona, M. D. R., Carranza-Rosales, P., Lozano-Garza, H. G., Castillo-Nava, D., Alvarez-Mendoza, F. J., & Tamez-Cantú, E. M. (2007). Hepatoprotective effect of *Leucophyllum frutescens* on Wistar albino rats intoxicated with carbon tetrachloride. *Annals of Hepatology*, 6(4), 251–254.
 12. Baslam, A., Aitbaba, A., Lamrani Hanchi, A., Tazart, Z., Aboufatima, R., Sora, N., Ait-El-Mokhtar, M., Boussaa, S., Baslam, M., & Chait, A. (2023). Modulation of Gut Microbiome in Ecstasy/MDMA-Induced Behavioral and

- Biochemical Impairment in Rats and Potential of Post-Treatment with *Anacyclus pyrethrum* L. Aqueous Extract to Mitigate Adverse Effects. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), 9086. <https://doi.org/10.3390/ijms24109086>
13. Begriche, K., Massart, J., Robin, M.-A., Borgne-Sanchez, A., & Fromenty, B. (2011). Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: Mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *Journal of Hepatology*, 54(4), 773–794. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.11.006>
14. Berding, K., Vlckova, K., Marx, W., Schellekens, H., Stanton, C., Clarke, G., Jacka, F., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2021). Diet and the Microbiota–Gut–Brain Axis: Sowing the Seeds of Good Mental Health. *Advances in Nutrition*, 12(4), 1239–1285. <https://doi.org/10.1093/advances/nmaa181>
15. Björnsson, E. S. (2019). Global Epidemiology of Drug-Induced Liver Injury (DILI). *Current Hepatology Reports*, 18(3), 274–279. <https://doi.org/10.1007/s11901-019-00475-z>
16. Caligiuri, A., Gentilini, A., Pastore, M., Gitto, S., & Marra, F. (2021). Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Liver Fibrosis Regression. *Cells*, 10(10), 2759. <https://doi.org/10.3390/cells10102759>
17. Celton-Morizur, S., & Desdouets, C. (2010). Polyploidization of liver cells (pp. 123–135). https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6199-0_8
18. Cheng, M. L., Nakib, D., Perciani, C. T., & MacParland, S. A. (2021). The immune niche of the liver. *Clinical Science*, 135(20), 2445–2466. <https://doi.org/10.1042/CS20190654>

19. Coballase-Urrutia, E., Pedraza-Chaverri, J., Cárdenas-Rodríguez, N., Huerta-Gertrudis, B., Edna García-Cruz, M., Ramírez-Morales, A., Javier Sánchez-González, D., María Martínez-Martínez, C., Camacho-Carranza, R., & Javier Espinosa-Aguirre, J. (2011). Hepatoprotective effect of acetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl₄-induced toxicity in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63(4), 363–370. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.02.012>
20. Cordero-Pérez, P., Aguirre-Garza, M., Camara-Lemarro, C., Alarcón-Galván, G., Cantú-Sepúlveda, D., Bernal-Ramírez, J., Torres-González, L., Guzmán-de la Garza, F., Zapata-Chavira, H., Sotelo-Gallegos, M. J., Torres-Esquível, C., Sánchez-Fresno, E., González-Saldivar, G., & Muñoz-Espinosa, L. (2013). Hepatoprotective effect of commercial herbal extracts on carbon tetrachloride-induced liver damage in Wistar rats. *Pharmacognosy Research*, 5(3), 150. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.112417>
21. Cotter, T. G., & Rinella, M. (2020). Nonalcoholic Fatty Liver Disease 2020: The State of the Disease. *Gastroenterology*, 158(7), 1851–1864. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.01.052>
22. Cui, Z., Xu, L., Zhao, M., & Zhou, L. (2024). *Akkermansia muciniphila* <scp>MucT</scp> attenuates sodium valproate-induced hepatotoxicity and upregulation of *Akkermansia muciniphila* in rats. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 28(1). <https://doi.org/10.1111/jcmm.18026>
23. Delgado-Montemayor, C., Cordero-Pérez, P., Torres-González, L., Salazar-Cavazos, M. de la L., Saucedo, A. L., Paniagua-Vega, D., & Waksman-Minsky, N. H. (2022). Development of a Hepatoprotective Herbal Drug from

- Turnera diffusa. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2022, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2022/5114948>
24. Devarbhavi, H., Asrani, S. K., Arab, J. P., Nartey, Y. A., Pose, E., & Kamath, P. S. (2023). Global burden of liver disease: 2023 update. *Journal of Hepatology*, 79(2), 516–537. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.03.017>
25. Ding, J.-H., Jin, Z., Yang, X.-X., Lou, J., Shan, W.-X., Hu, Y.-X., Du, Q., Liao, Q.-S., Xie, R., & Xu, J.-Y. (2020). Role of gut microbiota via the gut-liver-brain axis in digestive diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 26(40), 6141–6162. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i40.6141>
26. Dukić, M., Radonjić, T., Jovanović, I., Zdravković, M., Todorović, Z., Krašnik, N., Arandžević, B., Mandić, O., Popadić, V., Nikolić, N., Klašnja, S., Manojlović, A., Divac, A., Gačić, J., Brajković, M., Oprić, S., Popović, M., & Branković, M. (2023). Alcohol, Inflammation, and Microbiota in Alcoholic Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3735. <https://doi.org/10.3390/ijms24043735>
27. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 2018. Presentación de resultados. https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf
28. Ezhilarasan, D., & Mani, U. (2022). Valproic acid induced liver injury: An insight into molecular toxicological mechanism. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 95, 103967. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103967>
29. Ghodke-Puranik, Y., Thorn, C. F., Lamba, J. K., Leeder, J. S., Song, W., Birnbaum, A. K., Altman, R. B., & Klein, T. E. (2013). Valproic acid pathway.

Pharmacogenetics and Genomics, 23(4), 236–241.

<https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32835ea0b2>

30. Gokkaya, E. O., Yesilot, S., Ozgocmen, M., Aslankoc, R., & Aydin Acar, C. (2022). Protective effects of resveratrol and avocado oil against paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 45(5), 2131–2139. <https://doi.org/10.1080/01480545.2021.1908716>
31. Gomaa, E. Z. (2020). Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(12), 2019–2040. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7>
32. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (2024, enero 24). Estadística de defunciones registradas de enero a junio de 2022 (preliminar). [Estadísticas de Defunciones Registradas \(EDR\) de enero a junio de 2023 \(preliminar\) \(inegi.org.mx\)](https://inegi.org.mx)
33. Jafarian, I., Eskandari, M. R., Mashayekhi, V., Ahadpour, M., & Hosseini, M.-J. (2013). Toxicity of valproic acid in isolated rat liver mitochondria. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 23(8), 617–623. <https://doi.org/10.3109/15376516.2013.821567>
34. Jamshidzadeh, A., Heidari, R., Shams, M., Ebrahimi-Sharghi, M., & Marashi, S. M. (2023). Carnitine in Alleviation of Complications Caused by Acute Valproic Acid Toxicity; an Experimental Study on Mice. *Archives of academic emergency medicine*, 12(1), e20. <https://doi.org/10.22037/aaem.v12i1.2146>
35. Kaur, S., Sharma, D., Singh, A. P., & Kaur, S. (2019). Amelioration of hepatic function, oxidative stress, and histopathologic damages by Cassia fistula L. fraction in thioacetamide-induced liver toxicity. *Environmental Science and*

- Pollution Research, 26(29), 29930–29945. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06158-y>
36. Khodayar, M. J., Kalantari, H., Khorsandi, L., Ahangar, N., Samimi, A., & Alidadi, H. (2021). Taurine attenuates valproic acid-induced hepatotoxicity via modulation of RIPK1/RIPK3/MLKL-mediated necroptosis signaling in mice. *Molecular Biology Reports*, 48(5), 4153–4162. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06428-4>
37. Kisseleva, T., & Brenner, D. (2021). Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(3), 151–166. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00372-7>
38. Koroglu, O. F., Gunata, M., Vardi, N., Yildiz, A., Ates, B., Colak, C., Tanriverdi, L. H., & Parlakpinar, H. (2021). Protective effects of naringin on valproic acid-induced hepatotoxicity in rats. *Tissue and Cell*, 72, 101526. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2021.101526>
39. Kruger NJ. The Bradford Method for Protein Quantitation. In: *The Protein Protocols Handbook*. 2nd ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc; p. 15–21.
40. Lanini, S., Ustianowski, A., Pisapia, R., Zumla, A., & Ippolito, G. (2019). Viral Hepatitis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 33(4), 1045–1062. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2019.08.004>
41. Li, S., Tan, H.-Y., Wang, N., Zhang, Z.-J., Lao, L., Wong, C.-W., & Feng, Y. (2015). The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26087–26124. <https://doi.org/10.3390/ijms161125942>

42. Linares-Braham, A., Palomo-Ligas, L., & Nery-Flores, S. D. (2023). Bioactive Compounds and Pharmacological Potential of Hojasen (*Flourensia cernua*): A Mini review. *Plant Science Today*. <https://doi.org/10.14719/pst.2546>
43. Liu, F., Horton-Sparks, K., Hull, V., Li, R. W., & Martínez-Cerdeño, V. (2018). The valproic acid rat model of autism presents with gut bacterial dysbiosis similar to that in human autism. *Molecular Autism*, 9(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13229-018-0251-3>
44. Liu, S.-Y., Tsai, I.-T., & Hsu, Y.-C. (2021). Alcohol-Related Liver Disease: Basic Mechanisms and Clinical Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), 5170. <https://doi.org/10.3390/ijms22105170>
45. Liu, Y., Meyer, C., Xu, C., Weng, H., Hellerbrand, C., ten Dijke, P., & Dooley, S. (2013). Animal models of chronic liver diseases. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 304(5), G449–G468. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00199.2012>
46. Manibur Rahman, T., & Hodgson. (2001). Animal models of acute hepatic failure. *International Journal of Experimental Pathology*, 81(2), 145–157. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.2000.00144.x>
47. Mata, R., Bye, R., Linares, E., Macías, M., Rivero-Cruz, I., Pérez, O., & Timmermann, B. N. (2003). Phytotoxic compounds from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry*, 64(1), 285–291. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00217-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00217-6)
48. Merra, G., Noce, A., Marrone, G., Cintoni, M., Tarsitano, M. G., Capacci, A., & De Lorenzo, A. (2020). Influence of Mediterranean Diet on Human Gut Microbiota. *Nutrients*, 13(1), 7. <https://doi.org/10.3390/nu13010007>

49. Molina-Salinas, G. M., Peña-Rodríguez, L. M., Mata-Cárdenas, B. D., Escalante-Erosa, F., González-Hernández, S., Torres de la Cruz, V. M., Martínez-Rodríguez, H. G., & Said-Fernández, S. (2011). Flourensia cernua : Hexane Extracts a Very Active Mycobactericidal Fraction from an Inactive Leaf Decoction against Pansensitive and Panresistant Mycobacterium tuberculosis. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2011/782503>
50. Molina-Salinas, G. M., Ramos-Guerra, M. C., Vargas-Villarreal, J., Mata-Cárdenas, B. D., Becerril-Montes, P., & Said-Fernández, S. (2006). Bactericidal Activity of Organic Extracts from Flourensia cernua DC against Strains of Mycobacterium tuberculosis. Archives of Medical Research, 37(1), 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.04.010>
51. Murillo-Villicaña, M., Noriega-Cisneros, R., Peña-Montes, D. J., Huerta-Cervantes, M., Aguilera-Méndez, A., Cortés-Rojo, C., Salgado-Garciglia, R., Montoya-Pérez, R., Riveros-Rosas, H., & Saavedra-Molina, A. (2022). Antilipidemic and Hepatoprotective Effects of Ethanol Extract of Justicia spicigera in Streptozotocin Diabetic Rats. Nutrients, 14(9), 1946. <https://doi.org/10.3390/nu14091946>
52. Nazmy, E. A., El-Khouly, O. A., Atef, H., & Said, E. (2017). Sulforaphane protects against sodium valproate–induced acute liver injury. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 95(4), 420–426. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0447>
53. Omidipour, R., Zarei, L., Boroujeni, M. B., & Rajabzadeh, A. (2021). Protective Effect of Thyme Honey against Valproic Acid Hepatotoxicity in

- Wistar Rats. *BioMed Research International*, 2021, 1–11.
<https://doi.org/10.1155/2021/8839898>
54. Onoja, S. O., Omeh, Y. N., Ezeja, M. I., & Chukwu, M. N. (2014). Evaluation of the In Vitro and In Vivo Antioxidant Potentials of *Aframomum melegueta* Methanolic Seed Extract. *Journal of Tropical Medicine*, 2014, 1–6.
<https://doi.org/10.1155/2014/159343>
55. Otrubova, O., Jerigova, M., Halaszova, S., Turecky, L., Muchova, J., & Velic, D. (2018). Rat liver intoxication with CCl₄: biochemistry, histology, and mass spectrometry. *General Physiology and Biophysics*, 37(05), 527–535.
https://doi.org/10.4149/gpb_2018011
56. Pafili, K., & Roden, M. (2021). Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) from pathogenesis to treatment concepts in humans. *Molecular Metabolism*, 50, 101122. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101122>
57. Pareek, A., Godavarthi, A., Issarani, R., & Nagori, B. P. (2013). Antioxidant and hepatoprotective activity of *Fagonia schweinfurthii* (Hadidi) Hadidi extract in carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in HepG2 cell line and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(3), 973–981.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.048>
58. Parola, M., & Pinzani, M. (2019). Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. *Molecular Aspects of Medicine*, 65, 37–55. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.09.002>
59. Perucca, E. (2002). Pharmacological and Therapeutic Properties of Valproate. *CNS Drugs*, 16(10), 695–714. <https://doi.org/10.2165/00023210-200216100-00004>

60. Pisano, M. B., Giadans, C. G., Flichman, D. M., Ré, V. E., Preciado, M. V, & Valva, P. (2021). Viral hepatitis update: Progress and perspectives. *World Journal of Gastroenterology*, 27(26), 4018–4044. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i26.4018>
61. RAZA, M., AL-BEKAIRI, A. M., AGEEL, A. M., & QURESHI, S. (1997). BIOCHEMICAL BASIS OF SODIUM VALPROATE HEPATOTOXICITY AND RENAL TUBULAR DISORDER: TIME DEPENDENCE OF PEROXIDATIVE INJURY. *Pharmacological Research*, 35(2), 153–157. <https://doi.org/10.1006/phrs.1997.0134>
62. Razavi, H. (2020). Global Epidemiology of Viral Hepatitis. *Gastroenterology Clinics of North America*, 49(2), 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2020.01.001>
63. Roehlen, N., Crouchet, E., & Baumert, T. F. (2020). Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells*, 9(4), 875. <https://doi.org/10.3390/cells9040875>
64. Romoli, M., Mazzocchetti, P., D'Alonzo, R., Siliquini, S., Rinaldi, V. E., Verrotti, A., Calabresi, P., & Costa, C. (2019). Valproic Acid and Epilepsy: From Molecular Mechanisms to Clinical Evidences. *Current Neuropharmacology*, 17(10), 926–946. <https://doi.org/10.2174/1570159X17666181227165722>
65. Saber, S., Nasr, M., Saad, A. S., Mourad, A. A. E., Gobba, N. A., Shata, A., Hafez, A.-M., Elsergany, R. N., Elagamy, H. I., El-Ahwany, E., Amin, N. A., Girgis, S., Elewa, Y. H. A., Mahmoud, M. H., Batiha, G. E.-S., El-Rous, M. A., Kamal, I., Kaddah, M. M. Y., & Khodir, A. E. (2021). Albendazole-loaded

- cubosomes interrupt the ERK1/2-HIF-1 α -p300/CREB axis in mice intoxicated with diethylnitrosamine: A new paradigm in drug repurposing for the inhibition of hepatocellular carcinoma progression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, 112029. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112029>
66. Salazar, R., Pozos, M. E., Cordero, P., Perez, J., Salinas, M. C., & Waksman, N. (2008). Determination of the Antioxidant Activity of Plants from Northeast Mexico. *Pharmaceutical Biology*, 46(3), 166–170. <https://doi.org/10.1080/13880200701498952>
67. Seen, S. (2021). Chronic liver disease and oxidative stress – a narrative review. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 15(9), 1021–1035. <https://doi.org/10.1080/17474124.2021.1949289>
68. Sienes Bailo, P., Llorente Martín, E., Calmarza, P., Montolio Brea, S., Bravo Gómez, A., Pozo Giráldez, A., Sánchez-Pascuala Callau, J. J., Vaquer Santamaría, J. M., Dayaldasani Khialani, A., Cerdá Micó, C., Camps Andreu, J., Sáez Tormo, G., & Fort Gallifa, I. (2022). Implicación del estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas y posibles terapias antioxidantes. *Advances in Laboratory Medicine / Avances En Medicina de Laboratorio*, 3(4), 351–360. <https://doi.org/10.1515/almed-2022-0022>
69. Silva, Y. P., Bernardi, A., & Frozza, R. L. (2020). The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Frontiers in Endocrinology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00025>
70. Singh, D., Cho, W. C., & Upadhyay, G. (2016). Drug-Induced Liver Toxicity and Prevention by Herbal Antioxidants: An Overview. *Frontiers in Physiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00363>

71. Smith, A., Baumgartner, K., & Bositis, C. (2019). Cirrhosis: Diagnosis and Management. *American Family Physician*, 100(12), 759–770.
72. Stephenie, S., Chang, Y. P., Gnanasekaran, A., Esa, N. M., & Gnanaraj, C. (2020). An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement. *Journal of Functional Foods*, 68, 103917. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103917>
73. Tellez, M., Estell, R., Fredrickson, E., Powell, J., Wedge, D., Schrader, K., & Kobaisy, M. (2001). Extracts of *Flourensia cernua* (L): Volatile Constituents and Antifungal, Antialgal, and Antitermite Bioactivities. *Journal of Chemical Ecology*, 27(11), 2263–2273. <https://doi.org/10.1023/A:1012283005014>
74. Tokushige, K., Ikejima, K., Ono, M., Eguchi, Y., Kamada, Y., Itoh, Y., Akuta, N., Yoneda, M., Iwasa, M., Yoneda, M., Otsuka, M., Tamaki, N., Kogiso, T., Miwa, H., Chayama, K., Enomoto, N., Shimosegawa, T., Takehara, T., & Koike, K. (2021). Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis 2020. *Journal of Gastroenterology*, 56(11), 951–963. <https://doi.org/10.1007/s00535-021-01796-x>
75. Torres-González, L., Muñoz-Espinosa, L. E., Rivas-Estilla, A. M., Trujillo-Murillo, K., Salazar-Aranda, R., Waksman De Torres, N., & Cordero-Pérez, P. (2011). Protective effect of four Mexican plants against CCl₄-induced damage on the Huh7 human hepatoma cell line. *Annals of Hepatology*, 10(1), 73–79.
76. Torres-León, C., Rebolledo Ramírez, F., Aguirre-Joya, J. A., Ramírez-Moreno, A., Chávez-González, M. L., Aguillón-Gutierrez, D. R., Camacho-

- Guerra, L., Ramírez-Guzmán, N., Hernández Vélez, S., & Aguilar, C. N. (2023). Medicinal plants used by rural communities in the arid zone of Viesca and Parras Coahuila in northeast Mexico. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 31(1), 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2022.11.003>
77. Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current Biology*, 27(21), R1147–R1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>
78. Tumaní, M. F., Tapia, G., Aguirre, C., Obregón, A. M., & Pettinelli, P. (2021). Rol de la microbiota intestinal en el desarrollo del hígado graso no alcohólico. *Revista Médica de Chile*, 149(4), 570–579. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872021000400570>
79. Tuñón, M. J., Alvarez, M., Culebras, J. M., & González-Gallego, J. (2009). An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure. *World Journal of Gastroenterology*, 15(25), 3086. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.3086>
80. Urrutia-Hernández, T. A., Santos-López, J. A., Benedí, J., Sánchez-Muniz, F. J., Velázquez-González, C., De la O-Arciniega, M., Jaramillo-Morales, O. A., & Bautista, M. (2019). Antioxidant and Hepatoprotective Effects of *Croton hypoleucus* Extract in an Induced-Necrosis Model in Rats. *Molecules*, 24(14), 2533. <https://doi.org/10.3390/molecules24142533>
81. Urrutia-Hernández, T. A., Santos-López, J. A., Benedí, J., Sánchez-Muniz, F. J., Velázquez-González, C., De la O-Arciniega, M., Jaramillo-Morales, O. A., & Bautista, M. (2019). Antioxidant and Hepatoprotective Effects of *Croton hypoleucus* Extract in an Induced-Necrosis Model in Rats. *Molecules*, 24(14), 2533. <https://doi.org/10.3390/molecules24142533>

82. Wong-Paz, J. E., Contreras-Esquivel, J. C., Rodríguez-Herrera, R., Carrillo-Inungaray, M. L., López, L. I., Nevárez-Moorillón, G. V., & Aguilar, C. N. (2015). Total phenolic content, in vitro antioxidant activity and chemical composition of plant extracts from semiarid Mexican region. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(2), 104–111. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60299-6](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60299-6)
83. Woolley, B., & Mills, J. (2022). Versatile Valproic Acid. *Issues in Mental Health Nursing*, 43(11), 1072–1074. <https://doi.org/10.1080/01612840.2022.2122431>
84. Xiao, J., Wang, F., Wong, N.-K., Lv, Y., Liu, Y., Zhong, J., Chen, S., Li, W., Koike, K., Liu, X., & Wang, H. (2020). Epidemiological Realities of Alcoholic Liver Disease: Global Burden, Research Trends, and Therapeutic Promise. *Gene Expression*, 20(2), 105–118. <https://doi.org/10.3727/105221620X15952664091823>
85. Xu, M., Luo, K., Li, J., Li, Y., Zhang, Y., Yuan, Z., Xu, Q., & Wu, X. (2022). Role of Intestinal Microbes in Chronic Liver Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12661. <https://doi.org/10.3390/ijms232012661>
86. Zakaria, Z. A., Sahmat, A., Azmi, A. H., Nur Zainol, A. S., Omar, M. H., Balan, T., Sulistyorini, L., Azizah, R., & Abdullah, M. N. H. (2021). Polyphenolics and triterpenes presence in chloroform extract of *Dicranopteris linearis* leaves attenuated paracetamol-induced liver intoxication in rat. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-03200-2>

87. Zavala C., D., Carrillo I., M. L., Alvarado S., B., & Sánchez Ch., A. O. (2010). Evaluación de la toxicidad aguda de un extracto alcohólico de hojas de hojásén (*Flourensia cernua*). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(3),50-54.[fecha de Consulta 28 de Junio de 2024]. ISSN: 1870-0195. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57916078007>