

Efecto hepatoprotector de una mezcla de siete plantas en cirrosis inducida con tetracloruro de carbono

Hepatoprotective effect of a mixture of seven plants in carbon tetrachloride induced cirrhosis

Carmen Gabriela Rosales Muñoz,^I César Soria Fregozo,^I María Isabel Pérez Vega,^I Leila Yadira Cedillo Cruz,^{II} Luis Huacuja Ruiz,^{II} María de la Luz Miranda Beltrán^I

^ICentro Universitario de los Lagos. Universidad de Guadalajara. México.

^{II}Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Universidad de Guadalajara. México.

RESUMEN

Introducción: las plantas medicinales han sido utilizadas con fines terapéuticos desde tiempos antiguos sobre diversas enfermedades, en este sentido, se han reportado por la medicina tradicional una gran variedad de plantas con actividad gastrointestinal y efecto hepatoprotector. Las plantas utilizadas en este estudio fueron *Bidens odorata* Cav. L., *Tecoma stans* L., *Equisetum hyemale* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Cynaya scolymus* L., *Peumus boldus* L. y *Linum usitatissimum* L.

Objetivo: demostrar el efecto hepatoprotector de una mezcla de siete plantas (EHAM₇) en ratas cirróticas inducidas con tetracloruro de carbono (CCl₄).

Métodos: se utilizaron las semillas de *L. usitatissimum* y las hojas y flores secas del resto de las plantas. Se formaron grupos de ratas control y ratas cirróticas con y sin tratamiento con la mezcla. A los animales cirróticos se les indujo el daño hepático intraperitonealmente con 0,2 mL de una mezcla de CCl₄ y aceite mineral. Por otra parte, se les administraron oralmente 200 mg/kg del EHAM₇ re-suspendido en solución salina durante una semana y posteriormente cada tercer día durante ocho semanas. Los animales fueron sacrificados y se determinó el perfil hepático (transaminasas, bilirrubina y proteínas) y lipídico (triglicéridos, colesterol y lipoproteínas) en muestras de suero sanguíneo; el hígado se utilizó para los estudios histológicos.

Resultados: el EHAM₇ mostró efecto hepatoprotector en los animales cirróticos sobre los parámetros séricos correspondientes al perfil hepático y al perfil lipídico, lo cual se correlaciona con las características histológicas del hígado.

Conclusión: el EHAM₇ presenta efecto hepatoprotector en ratas cirróticas inducidas con CCl₄, debido a que dicha mezcla presenta compuestos polifenólicos con actividad antioxidante.

Palabras clave: cirrosis hepática; tetracloruro de carbono; plantas medicinales; efecto hepatoprotector.

ABSTRACT

Introduction: Medicinal plants have been used for therapeutic purposes against a great variety of diseases since ancient times. A large number of plants with gastrointestinal activity and hepatoprotective effect have been used in traditional medicine. The plants examined in the present study were *Bidens odorata* Cav. L., *Tecoma stans* L., *Equisetum hyemale* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Cynaya scolymus* L., *Peumus boldus* L. and *Linum usitatissimum* L.

Objective: Demonstrate the hepatoprotective effect of a mixture of seven plants (EHAM₇) in carbon tetrachloride (CCl₄) induced cirrhotic rats.

Methods: The study used seeds of *L. usitatissimum* and dry flowers and leaves of the remaining plants. Groups were formed of control and cirrhotic rats with and without treatment with the mixture. Hepatic damage was induced intraperitoneally into the cirrhotic animals with 0.2 ml of a mixture of CCl₄ and mineral oil. The rats were also administered 200 mg/kg EHAM₇ resuspended in saline solution orally during a week and then every third day during eight weeks. The animals were sacrificed and determination was made of the hepatic profile (transaminases, bilirubin and proteins) and lipid profile (triglycerides, cholesterol and lipoproteins) in blood serum samples. The liver was preserved for histological examination.

Results: EHAM₇ was found to have an hepatoprotective effect on the serum parameters corresponding to the hepatic and lipid profiles of cirrhotic animals, which correlates with the histological characteristics of the liver.

Conclusion: EHAM₇ has a hepatoprotective effect in CCl₄ induced cirrhotic rats, since the mixture contains polyphenolic compounds with antioxidant activity.

Keywords: liver cirrhosis; carbon tetrachloride; medicinal plants; hepatoprotective effect.

INTRODUCCIÓN

En México la cirrosis se ubica como la quinta causa de mortalidad general.¹ Es una enfermedad crónica del hígado que cursa con destrucción irreversible de las células hepáticas; se caracteriza por áreas de fibrosis (cicatriz) y muerte de los hepatocitos. Sus consecuencias principales son fallas en la función hepática y el aumento de la presión sanguínea en la vena porta.² Es conocido que el alto consumo del alcohol está relacionado con la ocurrencia de esta enfermedad, y la mayoría de los tratamientos han sido orientados a la supresión o inactivación del agente dañino. Sin embargo, en algunos casos esto no se logra y la enfermedad progresa a cirrosis y otras complicaciones,³ por lo que se puede decir que hasta la fecha no existe un tratamiento efectivo para esta enfermedad. En este sentido, es

pertinente proponer a las plantas medicinales como una alternativa viable para resolver en buena medida los problemas de salud en México, además de una forma complementaria e integral.

Tanto la Etnobotánica como la medicina popular han reportado una variedad de plantas medicinales, utilizadas en las enfermedades gastrointestinales con efecto hepatoprotector debido a su alto contenido de compuestos polifenólicos.^{4,5} Por ejemplo, el *Silybum marianum* L. posee un efecto hepatoprotector debido a la presencia de flavolignan. Dicho compuesto es quizás el más utilizado por la Medicina Alternativa Complementaria (MAC) en los tratamientos de enfermedades hepáticas.^{4,6}

A partir del conocimiento del uso de las plantas medicinales por la población mexicana, nuestro laboratorio formuló una mezcla de siete plantas denominada EHAM₇, compuesta por *Bidens odorata* Cav. L. con actividad diurética y antidiarreica,^{7,8} *Tecoma stans* L. con efecto antiinflamatorio,⁹ *Linum usitatissimum* L. con efectos protectores contra una variedad de enfermedades crónicas y factores de riesgo incluyendo carcinogénesis de mama y colon,¹⁰ *Cynara scolymus* L. con actividad antimicrobiana y antioxidante,¹¹ además reduce los niveles de lípidos en el plasma,¹² *Equisetum hyemale* L. con actividad antioxidante, antimicrobiana y diurética,^{13,14} *Peumus boldus* L. con efectos coleréticos, colagogos, diuréticos, antioxidantes y antiateroescleróticos¹⁵ y *Rosmarinus officinalis* L. en la cual se ha reportado actividad antioxidante, antiinflamatoria, hepatoprotectora y neuroprotectora.¹⁶⁻¹⁹

El objetivo del presente trabajo fue demostrar el efecto hepatoprotector de la mezcla de siete plantas (EHAM₇), a través de la valoración de la funcionalidad del hígado mediante el análisis del perfil hepático y lipídico; así como, el análisis histológico en ratas cirróticas inducidas con CCl₄.

MÉTODOS

Animales de experimentación

Se utilizaron 48 ratas macho Wistar (80-90 g) suministradas por el Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara y el Centro de Investigación Biomédica de Occidente, las cuales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (25 ± 1 °C), humedad relativa (40-50 %) y ciclos alternos de luz-oscuridad de 12 h. Fueron provistos con la dieta comercial Chow Purina y agua *ad libitum* (sin tratamiento) para satisfacer sus requerimientos nutricionales.

Los animales se mantuvieron de acuerdo a las recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).²⁰ Las manipulaciones experimentales fueron realizadas conforme a los lineamientos éticos internacionales basados en la Guía de cuidado y uso de animales de laboratorio publicado por el National Research Council.²¹

Se formaron seis grupos de trabajo: control (C), sin tratamiento; solución salina (SS), se les administró 1 mL de SS vía oral; aceite mineral (AM), se les administraron intraperitonealmente (i. p.) 0,2 mL de AM durante ocho semanas; EHAM₇ (E₇), se les administraron oralmente 200 mg/kg de peso corporal del EHAM₇ en 1 mL de SS cada tercer día durante ocho semanas; cirrótico (CCl₄), se les

administraron i. p. 0,2 mL de una mezcla de CCl₄/AM cada tercer día durante ocho semanas, las proporciones (v/v) fueron la primer semana 1:6, segunda semana 1:5, tercer semana 1:4 y de la cuarta hasta la octava semana 1:3; cirrótico tratado con el EHAM₇ (E₇+CCl₄), se les administraron oralmente 200 mg/kg de EHAM₇ en 1 mL de SS durante una semana previa a la inducción del daño hepático, posteriormente cada tercer día durante ocho semanas, se indujo el daño hepático bajo el mismo esquema del grupo de CCl₄. 24 h después de concluidos los tratamientos, los animales fueron sacrificados bajo atmósfera de éter etílico (Avantor JT Baker), se obtuvo el suero a partir de la sangre para valorar la funcionalidad del hígado a través del perfil hepático y lipídico. El hígado fue utilizado para el análisis histopatológico.

Obtención y preparación del EHAM₇

Para la preparación del EHAM₇ se utilizaron plantas mexicanas, las cuales se recolectaron con apego estricto a los procedimientos de recolección (tabla 1). Se utilizaron las semillas de *L. usitatissimum* y las hojas y flores del resto de las plantas, se desinfectaron durante 3 min con cloro al 2 % para eliminar polvos, excretas y otros contaminantes. Los ejemplares fueron identificados en el herbario María Luisa Villarreal de Puga del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara por la Dra. Molie Harker (tabla 1).

Tabla 1. Porcentajes de preparación y número de registro de las plantas que componen el EHAM₇

Planta	Porcentaje de preparación	Número de registro	Lugar de recolección
<i>Bidens odorata</i> Cav L	13	IBUG189162	En los ejidos de Zapote del Valle, Jal. Roca Azul de Jocotepec, Jal. San Juan de Morelia, Mich. (Septiembre)
<i>Tecoma stans</i> L	13	IBUG189157	
<i>Equisetum hyemale</i> L	13	IBUG189159	
<i>Rosmarinus officinalis</i> L	13	IBUG189160	
<i>Cynara scolymus</i> L	11	IBUG189158	Por medio de distribuidores de plantas del mercado de Jamaica, México, D.F. (octubre-noviembre)
<i>Peumus boldus</i> L	11	IBUG189163	
<i>Linum usitatissimum</i> L (semillas)	26	IBUG189161	

A cada una de las plantas se les realizó, por triplicado, la determinación de sólidos expresados en rendimiento total, ácido siálico,²² carbohidratos,²³ polifenoles²⁴ y hexosaminas.²⁵ En todos los casos se estandarizaron las curvas de calibración de densidad óptica y los datos obtenidos se convirtieron a gramos por cada 100 g de hojas y flores secas. Todas las plantas se deshidrataron a la sombra a 22 °C, se molieron, se realizó una extracción con etanol al 60 % y posteriormente una re-extracción con etanol al 25 %, ambas con una duración de dos horas a 60 °C, se realizó la mezcla, se concentró en un evaporador rotatorio y se procedió a liofilizarla.

Perfil hepático y lipídico

En todos los grupos se realizaron estudios convencionales correspondientes al perfil hepático: alanino aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), proteínas totales (PT), albúmina (ALB), bilirrubina directa (BD) y bilirrubina total (BT), y para el perfil lipídico se determinaron triglicéridos (TG), colesterol (COL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) (kit Human-México).¹⁸ Estas pruebas se determinaron en un espectrofotómetro (Jenway).

Análisis histológico

Se obtuvieron las muestras de los tres lóbulos hepáticos. Posteriormente fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % en solución amortiguadora de fosfatos (0,1 M, pH= 7,2 ± 0,2), se deshidrataron con alcohol a diferentes concentraciones (40-100 %), se aclararon en xilol y se incluyeron en parafina.²⁶⁻²⁸ Se realizaron cortes de 14 µm de espesor utilizando un micrótopo (Leica),²⁹ los cuales fueron teñidos con la técnica tricrómica de Masson.^{30,31} El análisis se realizó a doble ciego en un microscopio óptico (Leica) con el objetivo de 20X.^{32,33}

Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media de los parámetros estudiados ± la desviación estándar. Las comparaciones fueron realizadas por análisis de varianza de una vía para grupos independientes, tomando como único factor los tratamientos seguido de la prueba Student-Newman/Keuls. Las diferencias se consideraron significativas cuando se encontró una $p < 0,05$.

RESULTADOS

Determinación fitoquímica del EHAM7

Del EHAM₇ se obtuvo un rendimiento de 14,8 g del liofilizado por cada 100 g de hojas y flores secas. La determinación fitoquímica mostró que el EHAM₇ contiene ácido siálico, carbohidratos, polifenoles y hexosaminas (tabla 2).

Tabla 2. Fitoconstituyentes encontrados en el EHAM₇

Plantas	Rendimiento total	Ácido Siálico	Carbohidratos	Polifenoles	Hexosaminas	Total
<i>Bidens odorata</i>	18,70	0,897	1,254	1,541	4,300	7,992
<i>Tecoma stans</i>	14,97	0,554	0,768	1,233	5,708	8,263
<i>Linum usitatissimum</i>	5,42	0,069	0,130	0,014	5,210	5,423
<i>Cynara scolymus</i>	23,88	1,000	6,460	3,200	0,391	11,051
<i>Equisetum hyemale</i>	16,72	0,641	2,174	0,040	3,880	6,735
<i>Peumus boldus</i>	22,97	3,420	4,650	2,848	1,121	12,039
<i>Rosmarinus officinalis</i> L	14,47	0,654	0,900	1,505	2,344	5,403

Los datos se presentan en g por cada 100 g de hojas y flores secas.

Perfil hepático y lipídico

Respecto al perfil hepático los niveles de las transaminasas (ALT $331,26 \pm 5,88$ U/L y AST $350,25 \pm 6,57$ U/L) se elevaron en el grupo de CCl₄ en comparación al grupo control (ALT $301,59 \pm 3,54$ U/L y AST $318,03 \pm 7,97$ U/L) y al resto de los grupos (SS, AM, EHAM₇). Además, las bilirrubinas (BD $2,26 \pm 0,15$ mg/dL y BT $7,92 \pm 0,53$ mg/dL) respecto al grupo control (BD $1,55 \pm 0,07$ mg/dL y BT $5,73 \pm 0,40$ mg/dL) mostraron el mismo comportamiento. En el grupo de E₇ + CCl₄ los niveles de las transaminasas (ALT= $311,13 \pm 4,14$ U/L y AST= $321,69 \pm 3,15$ U/L) y bilirrubinas (BD $1,71 \pm 0,03$ mg/dL y BT $6,18 \pm 0,42$ mg/dL) fueron similares a los animales de los grupos C, SS, AM y E₇. Por su parte, los niveles de proteínas (PT $11,08 \pm 0,36$ g/dL y ALB $4,12 \pm 0,10$ g/dL) en el grupo tratado con CCl₄ disminuyeron en comparación al resto de los grupos. En cuanto al tratamiento con el EHAM₇ se restablecen estos valores ($13,69 \pm 0,38$ g/dL y $4,89 \pm 0,12$ g/dL) respecto a los grupos C, SS, AM y E₇ (tabla 3).

Tabla 3. Efecto del EHAM₇ sobre el perfil hepático en ratas cirróticas

Grupos	Tratamiento	AST (U/L)	ALT (U/L)	PT (g/dL)	ALB (g/dL)	BT (mg/dL)	BD (mg/dL)
I	Control	$318,03 \pm 7,97$	$301,59 \pm 3,54$	$13,69 \pm 0,38$	$4,89 \pm 0,12$	$5,73 \pm 0,40$	$1,55 \pm 0,07$
II	Solución Salina	$318,11 \pm 6,72$	$298,74 \pm 4,21$	$13,55 \pm 0,51$	$4,84 \pm 0,12$	$5,54 \pm 0,44$	$1,61 \pm 0,14$
III	Aceite Mineral	$317,33 \pm 5,82$	$300,66 \pm 6,66$	$13,57 \pm 0,51$	$4,84 \pm 0,12$	$5,73 \pm 0,56$	$1,57 \pm 0,06$
IV	EHAM ₇	$315,93 \pm 4,32$	$302,10 \pm 7,35$	$13,65 \pm 0,55$	$4,77 \pm 0,12$	$5,73 \pm 0,54$	$1,60 \pm 0,07$
V	CCl ₄	$350,25 \pm 6,57$ *	$331,26 \pm 5,88$ *	$11,08 \pm 0,36$ *	$4,12 \pm 0,10$ *	$7,92 \pm 0,53$ *	$2,26 \pm 0,15$ *
VI	EHAM ₇ +CCl ₄	$321,69 \pm 3,15$ ***	$311,13 \pm 4,17$	$13,41 \pm 0,24$	$4,69 \pm 0,10$ **	$6,18 \pm 0,42$	$1,71 \pm 0,13$

Los valores representan la media \pm la desviación estándar de la media $p < 0,05$.

* CCl₄ vs C, SS, AM, EHAM₇, EHAM₇ + CCl₄

** EHAM₇ + CCl₄ vs SS, AM

*** EHAM₇ + CCl₄ vs SS, EHAM₇

Por otro lado, en el perfil lipídico los niveles de TG ($63,26 \pm 3,41$ mg/dL), COL ($129,01 \pm 4,55$ mg/dL), LDL ($52,71 \pm 1,50$ mg/dL) y HDL ($37,12 \pm 1,27$ mg/dL) disminuyeron en el grupo de animales cirróticos en comparación al grupo control (TG $77,34 \pm 2,85$ mg/dL, COL $181,25 \pm 9,31$ mg/dL, LDL $63,61 \pm 0,95$ mg/dL y HDL $43,64 \pm 1,74$ mg/dL). En tanto que el tratamiento del EHAM₇ en animales cirróticos restablece dichos valores respecto a los grupos control (TG $74,20 \pm 1,67$ mg/dL, COL $150,24 \pm 5,15$ mg/dL, LDL $61,60 \pm 2,35$ mg/dL y HDL $42,84 \pm 1,60$ mg/dL) (tabla 4).

Tabla 4. Efecto del EHAM₇ sobre el perfil lipídico en ratas cirróticas

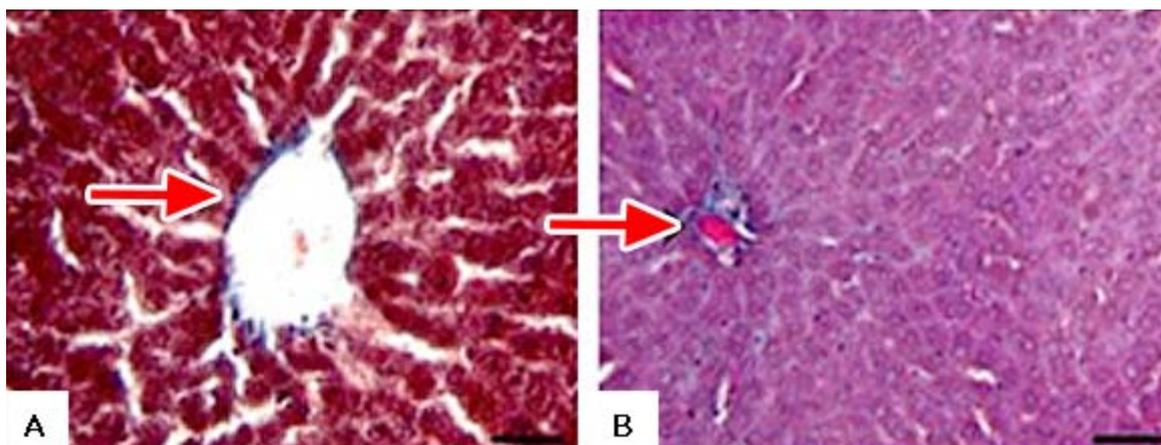
Grupos	Tratamiento	COL (mg/dL)	TG (mg/dL)	LDL (mg/dL)	HDL (mg/dL)
I	Control	$181,25 \pm 9,31$	$77,34 \pm 2,85$	$63,61 \pm 0,95$	$43,64 \pm 1,74$
II	Solución Salina	$156,25 \pm 2,88$	$75,82 \pm 0,73$	$62,23 \pm 0,33$	$42,90 \pm 1,00$
III	Aceite Mineral	$152,29 \pm 7,65$	$77,20 \pm 1,26$	$62,47 \pm 1,31$	$42,81 \pm 0,89$
IV	EHAM ₇	$155,24 \pm 6,24$	$77,15 \pm 2,67$	$62,35 \pm 1,88$	$43,58 \pm 1,40$
V	CCl ₄	$129,01 \pm 4,55^*$	$63,26 \pm 3,41^*$	$52,71 \pm 1,50^*$	$37,12 \pm 1,27^*$
VI	EHAM ₇ +CCl ₄	$150,24 \pm 5,15$	$74,20 \pm 1,67$	$61,60 \pm 2,35$	$42,84 \pm 1,60$

Los valores representan la media \pm la desviación estándar de la media $p < 0,05$

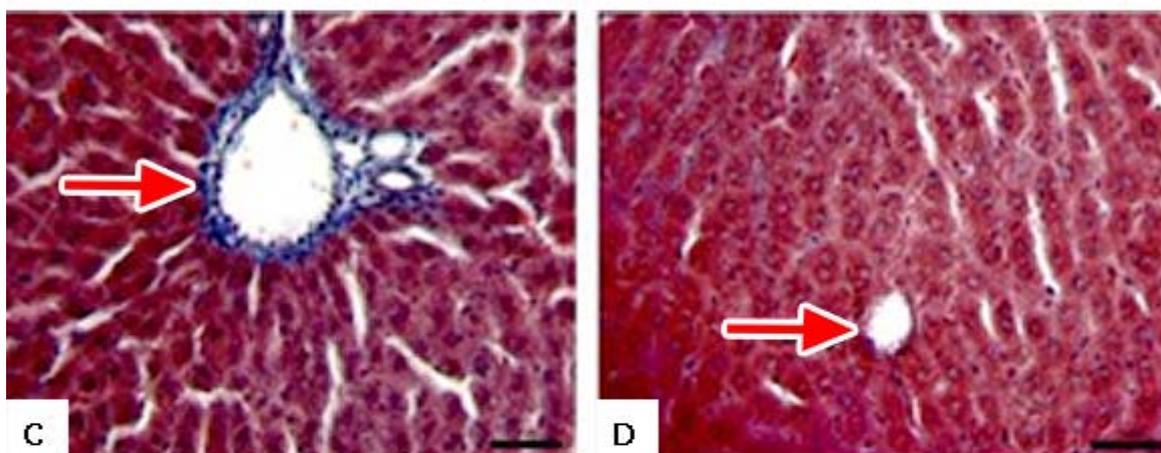
*CCl₄ vs C, SS, AM, EHAM₇, EHAM₇ + CCl₄

Análisis histológico

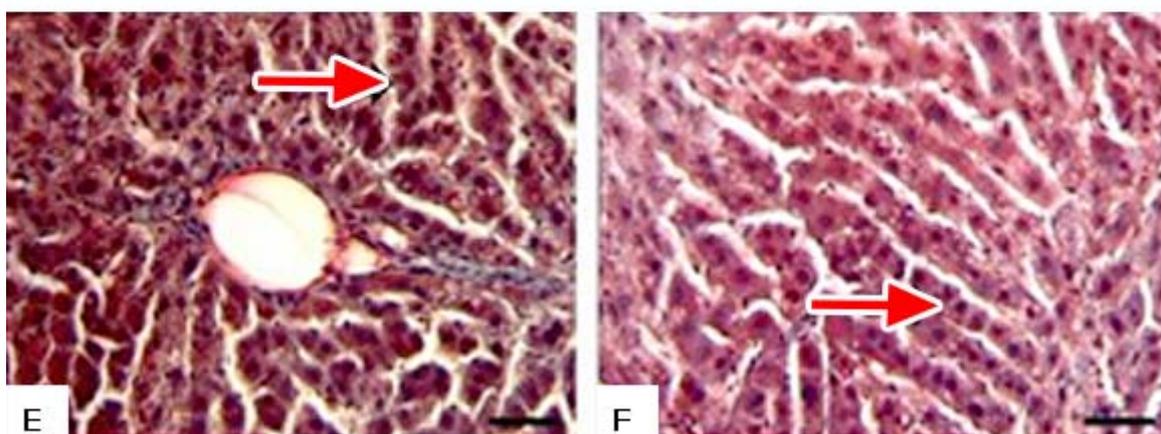
El análisis histopatológico de los animales cirróticos mostró distorsión total del parénquima con necrosis difusa, degeneración vacuolar confluyente en hepatocitos, pequeños nódulos de regeneración y bandas de tejido fibroso (colágeno) en espacios porta y alrededor de las venas centrilobulillares, así como la formación de tabiques de tejido conjuntivo (fig. G-H); en comparación con las características histológicas de los grupos control, los cuales mostraron hepatocitos normales con citoarquitectura conservada (fig. A-D). En cuanto al hígado de los animales cirróticos tratados con el EHAM₇ mostró una citoarquitectura conservada, con pocas bandas de fibrosis y tabiques delgados de tejido conjuntivo, además de esteatosis de gota fina moderadamente confluyente. Se aprecian espacios porta y venas centrolbulillares de aspecto normal, sin nódulos de regeneración (fig. E-F).



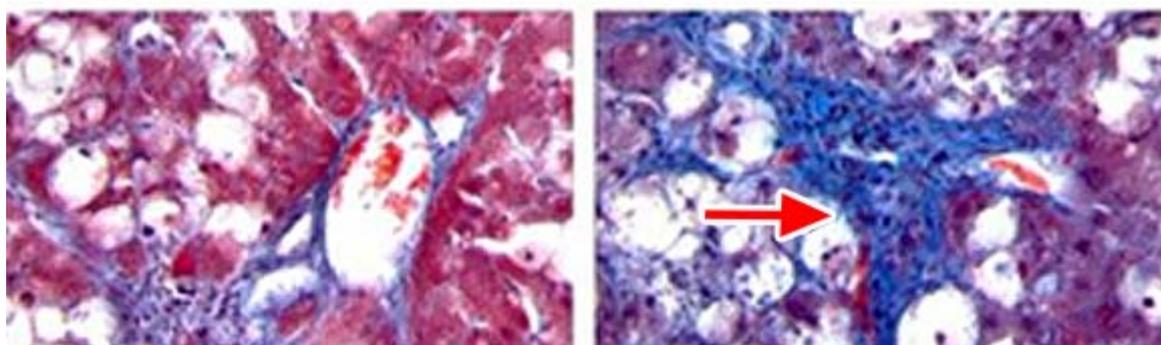
A. Ratas sin tratamiento y **B.** Ratas tratadas con aceite mineral. Se observa estructura normal sin nódulos de regeneración, integridad de la arquitectura en los hepatocitos, la triada portal y la zona centrilobulillar (→).



C. Ratas tratadas con solución salina y **D.** Ratas tratadas con EHAM7. Se observa estructura normal sin nódulos de regeneración, integridad de la arquitectura en los hepatocitos, la triada portal y la zona centrilobulillar (→).



E-F. Ratas cirróticas tratadas con el EHAM7. Los cortes muestran hepatocitos sanos (→) con tejido fibroso mínimo y ausencia de tejido graso en el área porta.



DISCUSIÓN

Debido a que el hígado es uno de los principales blancos de intoxicación por xenobióticos y drogas,³⁴ en el presente trabajo se evaluó el efecto del EHAM₇ sobre el hígado de ratas cirróticas. En nuestro estudio se observó que en el grupo de animales cirróticos que recibieron el tratamiento con el EHAM₇, los niveles de ALT y AST se mantuvieron de manera similar a los niveles de los grupos C, SS, AM y E₇, posiblemente mediante la estabilización de la membrana plasmática, ya que se ha demostrado que los niveles altos de ALT y AST se correlacionan de forma directa con el número de células afectadas ante el daño hepático.³⁵ También se sabe que los altos niveles de estas enzimas son indicativos de infiltración celular y pérdida de la integridad funcional de la membrana celular en el hígado cuando hay un daño hepático,³⁵ tal y como se observó en las ratas cirróticas. Los niveles de PT y ALB en el grupo de ratas cirróticas tratadas con el EHAM₇ no mostraron cambios respecto a los grupos C, SS, AM y E₇.

Estos resultados indican que probablemente existe una cantidad suficiente de hepatocitos funcionales debido al tratamiento con el EHAM₇, por lo que la síntesis de proteínas no se ve afectada, a diferencia de los animales cirróticos. Dichos resultados concuerdan con lo reportado por Arroyo³⁶ y El-gengaihi.³⁷ Así mismo, los niveles de BT y BD en el grupo de animales cirróticos tratados con el EHAM₇ no mostraron cambio respecto a los animales del grupo control, ya que en este caso el hígado conjuga y excreta la bilirrubina de manera normal,³⁵ a diferencia de cuando existe un daño hepático como lo demostrado en el grupo de animales cirróticos en los cuales los niveles de BT y BD se encuentran elevados, debido a que las células hepáticas pierden su capacidad para conjugar la bilirrubina indirecta, que a su vez no permite que se conjugue con una molécula de glucorónido y se forme la BD, con el fin de ser liberada a los canalículos intrahepáticos, el colédoco y los intestinos. Además, su distribución es determinada por el contenido proteínico (en particular albúmina),³⁸ lo que se correlaciona con la disminución de proteínas en el grupo de animales cirróticos de nuestro estudio.

Respecto al perfil lipídico, los niveles de colesterol del grupo de animales cirróticos tratados con el EHAM₇ no mostraron diferencias respecto a los grupos C, SS, AM y E₇, por lo que dicha mezcla contribuye a normalizar estos niveles y además previene la disminución de las lipoproteínas (LDL y HDL) y TG. Dichos resultados sugieren que el tratamiento con el EHAM₇ protege a las células hepáticas manteniendo su función y metabolismo. Algo que no sucede en el grupo de animales cirróticos cuyos niveles están disminuidos. En este sentido, se sabe que en el transcurso de una cirrosis hepática puede producirse una depresión importante de colesterol debido a que los hepatocitos dañados son incapaces de convertir las proteínas y los carbohidratos a grasas.³⁸ Cabe mencionar que el colesterol es un constituyente primario de las LDL, pero puede encontrarse también en las HDL,³⁸ lo cual sugiere que las disminuciones en los niveles de estas lipoproteínas están relacionados con la baja síntesis de colesterol en el hígado. Probablemente el EHAM₇ es capaz de inhibir la lipo-peroxidación de la membrana de los hepatocitos, como se reportó con un extracto de *Eucommia ulmoides*.³⁹ Además, se han utilizado mezclas como el sho-saiko-to, cuya formulación está basada en siete plantas y el cual presentó efecto quimiopreventivo en el desarrollo de cáncer de hígado en pacientes con cirrosis,⁴⁰ además el sho-saiko-to inhibió la proliferación de la línea celular HUH-7 de carcinoma hepatocelular humano y, se comprobó que dicha mezcla exhibió mayor efecto antiproliferativo que cualquiera de cada uno de sus constituyentes en forma individual; es decir, el máximo efecto

se presentó con todos los constituyentes de la mezcla, lo que indica un sinergismo o efecto aditivo.⁴¹

Por otro lado, el CCl₄ es un hepatotóxico capaz de generar estados de estrés oxidativo induciendo necrosis y daño hepatocelular,³⁶ características que concuerdan con lo observado en los animales cirróticos, a diferencia de los animales cirróticos tratados con el EHAM₇ donde se observa una citoarquitectura mejor conservada, por lo que la mezcla podría estar presentando un efecto protector. En este sentido, los compuestos polifenólicos encontrados en el tamizaje fitoquímico pueden sustentar dicho efecto. Así mismo, se sabe que en el grupo de polifenoles se encuentran los flavonoides, para los cuales se ha reportado, que tanto *in vitro* e *in vivo*, presentan actividad hepatoprotectora mediante la disminución del estrés oxidativo.^{42,43} Es importante resaltar que se ha reportado que las plantas que conforman el EHAM₇ presentan efectos inmunomoduladores, anti-inflamatorios, antifibróticos, sequestradores de radicales libres y estabilizadores de membrana,^{9-16,19} los cuales pudieran estar contrarrestando el estrés oxidativo, la peroxidación lipídica y los cambios moleculares en el tejido hepático, provocados por el CCl₄. Sin embargo, se desconoce el mecanismo específico por el cual el EHAM₇ ejerce dicho efecto protector sobre el tejido hepático. Cabe mencionar que la acción de una planta a veces no puede deberse a uno solo de sus principios activos, si no a la interacción sinérgica de las moléculas presentes e incluso suele ser más efectiva en forma de mezcla que cuando se utilizan de forma individual. Finalmente, se puede concluir que el extracto hidroalcohólico denominado EHAM₇ presenta efecto hepatoprotector en ratas cirróticas inducidas con CCl₄, y que las plantas utilizadas son candidatas a resolver o tratar los problemas de salud que se presentan en las enfermedades del hígado.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó durante el periodo de estudios de la Maestría en Ciencia y Tecnología del Centro Universitario de los Lagos de la Universidad de Guadalajara) del primer autor, el cual recibió apoyo por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT- 511479) durante el periodo 2013-2016.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos no tener ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) [sitio de internet]. México: Causas de defunción; Defunciones generales totales por principales causas de mortalidad, 2013 [actualizado 2015 sep 18, consultado 2016 mar 15]. Disponible en: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=23587> .
2. Carithers RL, McClain C. Alcoholic liver disease. En: Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ, Gastrointestinal and Liver Disease. Pathophysiology/Diagnosis/Management. 8Va edición. Philadelphia: Saunders Elsevier. 2006;2:1771-92.

3. García L, Hernández I, Sandoval A, Salazar A, Garcia J, Vera J, *et al.* Pirfenidone effectively reverses experimental liver fibrosis. *J Hepatol.* 2002;37:797-05.
4. Fogden E, Neuberger J. Alternative medicines and the liver. *Liver Int.* 2003;23:213-20.
5. Shimizu I. Sho-saiko-to: Japanese herbal medicine for protection against hepatic fibrosis and carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000;15(Suppl D84-D90).
6. Kuklinsky C. Farmacognosia/estudio de las drogas y sustancias de medicamentos de origen natural. Barcelona: Ediciones omega. 2000:292-06.
7. Zavala Mendoza D, Alarcon-Aguilar FJ, Pérez-Gutierrez S, Escobar-Villanueva MC, Zavala-Sánchez MA. Composition and antidiarrheal activity of *Bidens odorata* Cav. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2013;2013:1-7.
8. Astudillo Vázquez A, Dávalos Valle H, De Jesús L, Herrera G, Navarrete A. Investigation of *Alternanthera repens* and *Bidens odorata* on gastrointestinal disease. *Fitoterapia.* 2008;79:577-80.
9. Kameshwaran S, Suresh V, Arunachalam G, Frank PR, Manikandan V. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory potential of flower extract *Tecoma stans*. *Indian Journal of Pharmacology.* 2012;44(4):543-4.
10. Hu C, Yuan YV, Kitts DD. Antioxidant activities of the flaxseed lignin secoisolariciresinol diglucoside, its aglycone secoisolariciresinol and the mammalian lignans enterodiol and enterolactone *in vitro*. *Food Chem Toxicol.* 2007;45:2219-27.
11. Nomikos T, Detopoulou P, Fragopoulou E, Pliakis E, Antonopoulou S. Boiled wild artichoke reduces postprandial glycemic and insulinemic responses in normal subjects but has no effect on metabolic syndrome patients. *Nutrition Research.* 2007;27:741-9.
12. Bundy R, Walker AF, Middleton RW, Wallis C, Simpson HCR. Artichoke leaf extract (*Cynara scolymus*) reduces plasma cholesterol in otherwise healthy hypercholesterolemic adults: a randomized, double blind placebo controlled trial. *Phytomedicine.* 2008;15:668-75.
13. de Queiroz GM, Politi FA, Rodrigues ER, Souza Moreira TM, Moreira RR, Cardoso CR, *et al.* Phytochemical Characterization, Antimicrobial Activity, and Antioxidant Potential of *Equisetum hyemale* L. (Equisetaceae) Extracts. *J Med Food.* 2015;18(7):830-4.
14. Aguilar A, Camacho JR, Chino S, Jacquez P, López ME. Monografías sucintas. En: Plantas medicinales del herbario IMSS. Cuadros básicos por aparatos y sistemas del cuerpo humano. 1ª reimpresión. México, D.F. Publicación del IMSS. 1996:109.
15. Yu B, Santanam N. Effect of a novel antioxidant on adiponectin gene expression in 3T3 cell lines. *Antioxidants, nutrition & health.* 2006:S18-S31.
16. Poeckel D, Greiner C, Verhoff M, Rau O, Tausch L, Hörnig C, *et al.* Carnosic acid and carnosol potently inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Pharmacol.* 2008;76:91-7.

17. Huang SC, Ho CT, Lin Shiau SY, Lin JK. Carnosol inhibits the invasion of B16/F10 mouse melanoma cells by suppressing metalloproteinase-9 through down-regulating nuclear factor-kappaB and c-Jun. *Biochem Pharmacol.* 2005;69:221-32.
18. Miranda Beltrán ML. Efecto hepatoprotector de un extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. Evaluada mediante pruebas de funcionalidad hepática, estudios histológicos y la expresión del gen de la colágena 1 α (I) en ratas cirróticas inducidas con tetracloruro de carbono (Tesis). México: Universidad de Guadalajara. 2005.
19. Soria-Fregozo C, Miranda-Beltrán ML, Flores-Soto ME, Pérez-Vega MI, Rodríguez-Rodríguez RY, López-Velázquez AL, *et al.* Protective effect of *Rosmarinus officinalis* L. on the expression of the glutamate transporter (GLT-1) and neuronal damage in the frontal cortex of CCl₄-induced hepatic damage. *J Med Plant Res.* 2012;6:5886-94.
20. Sydow G. A simplified quick method for determination of sialic acid in serum. *Biochem Act.* 1985;44:1721-3.
21. Hewitt BR. Spectrophotometric determination antrona of total carbohydrates. *Natural.* 1958;182:246-52.
22. Cliffe S, Fawer MS, Maier G, *et al.* Enzyme assays for the phenolic content of natural juices. *J. Agric. Food Chem.* 1994;42:1824-28.
23. Lane-Smith R, Gilkerson E. Quantitation of glycosaminoglycan hexosamine using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazine hydrochloride. *Anal. Biochem.* 1979;98:478-80.
24. Hall J. Inclusión. En: Heffess CS, Mullick FG, Ed. Métodos histotecnológicos. 2da edición. Washington: Registro de patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). 1995:41-6.
25. Mills B. Orientación del espécimen. En: Heffess CS, Mullick FG, Ed. Métodos histotecnológicos. 2da edición. Washington: Registro de patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). 1995:35-40.
26. Prophet EB. Fijación de tejidos. En: Heffess CS, Mullick FG, Ed. Métodos histotecnológicos. 2da edición. Washington: Registro de patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). 1995:27-30.
27. Achstetter VA. Microtomía. En: Heffess CS, Mullick FG, Ed. Métodos histotecnológicos. 2da edición. Washington: Registro de patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). 1995:47-54.
28. Simile MM, Banni S, Angioni E, Carta G, De Miglio MR, Muroni MR, *et al.* 5'-Methylthioadenosine administration prevents lipid peroxidation and fibrogenesis induced in rat liver by carbon-tetrachloride intoxication. *J Hepatol.* 2001;34:386-94.
29. McElroy DA. Tejido conectivo. Coloración tricrómica de Masson. En: Heffess CS, Mullick FG, Ed. Métodos histotecnológicos. 2da edición. Washington: Registro de patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). 1995:135-6.

30. Xu Z, Chen L, Gu W, Gao Y, Lin L, *et al.* The performance of docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles targeted to hepatocellular carcinoma. *Biomaterials*. 2009;30:226-32.
31. Thieringer F, Maass T, Czochra P, Klopčič B, Conrad I, Friebe D, *et al.* Spontaneous hepatic fibrosis in transgenic mice overexpressing PDGF-A. *Gene*. 2008;423:23-8.
32. Bhattacharjee R, Sil PC. Protein isolate from the herb, *Phyllanthus niruri* L. (*Euphorbiaceae*), plays hepatoprotective role against carbon tetrachloride induced liver damage via its antioxidant properties. *Food Chem Toxicol*. 2007;45:817-26.
33. Reyes-Gordillo K, Segovia J, Shibayama M, Vergara P, Moreno MG, Muriel P. Curcumin protects against acute liver damage in the rat by inhibiting NF- κ B, proinflammatory cytokines production and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1770:989-96.
34. Das S, Sarma G. Study of the hepatoprotective activity of the ethanolic extract of the pulp of *Eugenia Jambolana* (Jamun) in albino rats. *J Clin Diagn Res*. 2009;3:1466-74.
35. Arroyo J, Almora Y, Quino M, Ruez E, Martínez J, *et al.* Efecto protector en cirrosis hepática inducida en ratas del extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum* comparado con silimarina. *An Fac Med*. 2012;73(2):85-91.
36. El-gengaihi S, Mossa AH, Refaie AA, Aboubaker D. Hepatoprotective efficacy of *Cichorium intybus* L extract against carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Journal of Dietary Supplements*. 2016:1-15.
37. Treseler KM. Pruebas de química sanguínea. En: Lemus Gamboa A Ed. Laboratorio clínico y pruebas de diagnóstico. México: El manual moderno. 1998:42-66.
38. Chang-Feng J, Bo L, Shun-Mei L, Raj-Kumar Y, Hyung-Ryong K, *et al.* Mechanism of the inhibitory effects of *Eucommia ulmoides* Oliv. cortex extracts (EUCE) in the CCl₄-induced acute liver lipid accumulation in rats. *International Journal of Endocrinology*. 2013:1-11.
39. Kim KH, Lee KR. Isolation of quinic acid derivatives and flavonoids from the aerial parts of *Lactuca indica* L. and their hepatoprotective activity *in vitro*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007;17(24):6739-43.
40. Perez-Gutierrez RM, Anaya-Sosa I, Hoyo-Vadillo C, Victoria TC. Effect of flavonoids from *Prosthechea michuacana* on carbon tetrachloride induced acute hepatotoxicity in mice. *Pharm Biol*. 2011;49(11):1121-7.
41. Ohtsuka M, Fukuda K, Yaho H, Kojiro M. Effects of nine active ingredients in chinese herbal medicine Sho Saiko To on 2 (2-furyl)-3-(nitro-2-furyl) acrylamide mutagenicity. *Jpn. J. Cancer Res*. 1995;86:1131-5.
42. Shimizu I. Sho-saiko-to: Japanese herbal medicine for protection against hepatic fibrosis and carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2000;15S:D84-D90.

43. Kim KH, Lee KR. Isolation of quinic acid derivatives and flavonoids from the aerial parts of *Lactuca indica* L. and their hepatoprotective activity *in vitro*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007;17(24):6739-43.

44. Pérez-Gutiérrez RM, Anaya-Sosa I, Hoyo-Vadillo C, Victoria TC. Effect of flavonoids from *Prosthechea michuacana* on carbon tetrachloride induced acute hepatotoxicity in mice. *Pharm Biol*. 2011;49(11):1121-7.

Recibido: 29 de junio de 2016.

Aprobado: 13 de diciembre de 2016.

Carmen Gabriela Rosales Muñoz. Centro Universitario de los Lagos, Universidad de Guadalajara. México. Correo electrónico: gaby.rosales.m@gmail.com