



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**Gobernadora (*Larrea tridentata*) y ácido
nordehidroguaiarético en la secreción biliar del hámster
(*Mesocricetus auratus*).**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

BIÓL. SILVIA ARTEAGA HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos:

El desarrollo de este estudio fue apoyado por una beca otorgada por CONACYT y por la DGEP, UNAM.

Se otorgan agradecimientos a los miembros del Comité Tutoral y el Jurado por las sugerencias para mejorar el trabajo a:

Dr. René Cárdenas Vázquez

Dr. Gil Alfonso Magos Guerrero

Dr. Adolfo Andrade Cetto

Dr. José Pedraza Chaverri

Dr. Rolando Hernández Muñoz

Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza

Dra. Ma. Cristina Pérez Amador Barrón

Asimismo agradezco al personal del Bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM: MVZ Mario Soriano, M. en C. Agustín Carmona, Biol. Dora Salazar y Biol. Isabel Antúnez, por la asistencia técnica y el mantenimiento de los animales empleados para el estudio.

Índice

I Resumen	4
I.1 Abstract	5
I. 2 Abreviaturas	6
II Introducción	7
III Antecedentes	10
3.1 <i>Larrea tridentata</i> (Gobernadora)	10
3.1.1 Biología	10
3.1.2 Etnobotánica	11
3.1.3 Fitoquímica	12
3.1.3.1 Efectos farmacológicos	13
3.1.3.2 Efectos tóxicos	13
3.2 Ácido nordehidroguaiarético	14
3.2.1 Efectos farmacológicos	15
3.2.2 Efectos tóxicos	16
3.2.3 Metabolismo hepático de <i>L. tridentata</i> y NDGA	16
3.3 El Hígado: aspectos anatómicos y fisiológicos	17
3.3.1 La bilis	18
3.3.1.1 Composición	18
3.3.1.2 Secreción	19
3.4 Metabolismo intestinal y circulación enterohepática de ácidos biliares	21
3.5 Colestasis	22
3.6 Colelitiasis	24
3.7 El hámster como modelo de litiasis	29
IV Planteamiento del problema	31
V Hipótesis	31
VI Objetivos	32
6.1 General	32
6.2 Particulares	32
VII Material y Métodos	32
7.1.1 Animales	32
7.1.2 Extracto de la planta	32
7.1.3 NDGA	33

7.1.4 Dietas	33
7.1.5 Infusión de la planta	33
7.1.6 Medio y Equipo de perfusión	33
7.2 Efecto colestático sobre la secreción biliar del hámster	35
7.3 Efecto sobre el perfil de ácidos biliares y la composición de lípidos biliares de hámsteres con dieta litogénica	36
7.4 Análisis de lípidos biliares	36
7.5 Efecto sobre la cantidad y el perfil de ácidos biliares fecales	37
7.6 Extracción de ácidos biliares fecales	37
7.7 Determinación de ácidos biliares fecales	38
7.8 Análisis estadístico	38
VIII Resultados	39
8.1 Efecto directo hepático del extracto de <i>L. tridentata</i>	39
8.1.1 Perfusiones preliminares y efecto del vehículo	39
8.1.2. Efecto colestático del extracto de <i>L. tridentata</i> y el NDGA	40
8.2. Efecto sobre la secreción biliar del extracto de <i>L. tridentata</i> y de NDGA en hígados perfundidos de hámsteres alimentados con dieta litogénica	41
8.2.1 Efecto sobre el flujo biliar	41
8.2.2 Efecto sobre la composición de lípidos biliares	42
8.2.3 Efecto sobre el perfil de ácidos biliares	43
8.3. Efecto del té de <i>L. tridentata</i> sobre la secreción biliar de animales alimentados con dieta litogénica	44
8.4 Efecto sobre la cantidad y el perfil de ácidos biliares fecales	45
VIII Discusión	47
IX Conclusiones	53
X Bibliografía	54

I. RESUMEN

La *Larrea tridentata* (Sesse & Moc. ex DC.) Coville es una planta medicinal mexicana empleada para el tratamiento de cálculos biliares, diabetes, esterilidad y como antiséptico, entre otros. El principal metabolito secundario de la planta es el ácido nordehidroguaiarético (NDGA), el cual es un reconocido antioxidante e inhibidor de la 5 lipoxigenasa. En estudios anteriores se demostró que el extracto etanólico de *L. tridentata* previene la colelitiasis de colesterol y pigmentaria en el hámster. Sin embargo, también se ha publicado sobre los efectos hepatotóxicos en humanos debidos al consumo crónico de *L. tridentata* y efectos nocivos del NDGA. En el presente trabajo se estableció el efecto del extracto etanólico de *L. tridentata* y del NDGA sobre el flujo y la composición biliar, empleando como modelo experimental el hígado perfundido de hámster. Se encontró que ambos compuestos producen un efecto colestático (disminución del flujo de bilis), estableciéndose concentraciones efectivas 50 (EC₅₀) de 34 mg dL⁻¹ y 28 mg dL⁻¹ (926µM) para el extracto de *L. tridentata* y el NDGA, respectivamente. Empleando dosis por debajo de la EC₅₀ (10 mg dL⁻¹) se estudió el efecto de la administración del extracto de *L. tridentata* y de NDGA sobre la composición biliar del hígado perfundido de hámsteres alimentados con dieta comercial para roedores (Purina) y con dieta inductora de cálculos biliares de colesterol (dieta litogénica). Sólo en los hígados de animales alimentados con dieta litogénica se encontró una reducción significativa en la concentración de colesterol biliar al perfundirlos tanto con extracto de *L. tridentata* como con NDGA. En estos hígados el extracto de *L. tridentata* también produjo un incremento significativo en los ácidos biliares totales, y en el perfil de ácidos biliares se incrementó el ácido quenodesoxicólico y disminuyó el desoxicólico. Este último se ha asociado con una mayor secreción biliar de colesterol y a litiasis en humanos y modelos animales.

Por otra parte, debido al conocido efecto antibiótico de *L. tridentata*, lo cual puede modificar la microbiota intestinal y reducir así la producción de ácidos biliares secundarios, se analizaron los ácidos biliares fecales de hámsteres alimentados con dieta litogénica a los que se les suministró *L. tridentata* en forma de extracto etanólico adicionado a la dieta (al 0.125%) y en forma de té (15 g L⁻¹) *ad libitum* en vez de agua. Se encontró una tendencia a la reducción en la formación de ácidos biliares secundarios con ambas formas de suministrar *L. tridentata*, aunque no alcanzaron a ser significativas. El grupo con extracto etanólico y el que recibió té presentaron un menor porcentaje de litiasis biliar, menor concentración y porcentaje molar de colesterol biliar, y un mayor tamaño del ciego intestinal, que los alimentados sólo con la dieta litogénica.

La integración de los resultados muestra que tanto el extracto de *L. tridentata* como el NDGA a dosis por debajo de la EC₅₀ favorecen una menor litogenicidad de la bilis al reducir el porcentaje molar de colesterol y modificar el perfil de ácidos biliares. Estos efectos benéficos ocurren a través de mecanismos tanto a nivel hepático como intestinal. Ambos compuestos podrían ser empleados en el tratamiento de la colelitiasis, manteniendo cuidado en las dosis empleadas debido a la hepatotoxicidad que pueden llegar a producir.

1.1 ABSTRACT

Larrea tridentata (Sesse and Moc. ex DC.) Coville is a Mexican medicinal plant used in the treatment of gallstones, diabetes, sterility and as antiseptic, among other uses. The main secondary metabolite of the plant is nordihydroguaiaretic acid (NDGA), which is a recognized antioxidant and a 5-lipoxygenase inhibitor. Previous studies demonstrated that the ethanolic extract of *L. tridentata* prevents cholesterol and pigment gallstones in the hamster. However, hepatotoxic effects in humans due to chronic consumption of *L. tridentata* and noxious effects of NDGA have also been reported. In the present work the effect of the ethanolic extract of *L. tridentata* and NDGA on the bile flow and composition were established using the experimental model of the perfused hamster liver. It was found that both compounds produced a cholestatic effect (reduction of bile flow). Effective concentrations 50 (EC₅₀) of 34 mg dL⁻¹ and 28 mg dL⁻¹ (926 μM) for the extract of *L. tridentata* and NDGA, respectively, were established. Using doses below the EC₅₀ (10 mg dL⁻¹), the effect of the extract of *L. tridentata* and NDGA on bile composition of perfused livers from hamsters fed commercial rodent chow (Purina) and a cholesterol gallstones inducing diet (lithogenic diet) were studied. A significant reduction of biliary cholesterol was found in the livers from animals fed lithogenic diet when perfused with the extract of *L. tridentata* and NDGA. In these livers the extract of *L. tridentata* also produced a significant increase in total bile acids, and the bile acid profile showed a significant increase in chenodeoxycholic acid and a decrease of deoxycholic acid. The latter has been associated with a higher secretion of cholesterol and gallstones in humans and animal models.

On the other hand, due to the well know antibiotic effect of *L. tridentata*, that can modify the intestinal microbiota and so reduced the production of secondary bile acids, faecal bile acids from hamsters fed a lithogenic diet added with *L. tridentata* extract at 0.125%, or as infusion (15 g L⁻¹) *ad libitum* instead of water were analyzed. A tendency towards the reduction of secondary bile acid formation was found with both forms of *L. tridentata* administration, although it did not reach statistical significance. The group with the ethanolic extract and the infusion exhibited a lower percentage of gallstones, a lower concentration and molar percentage of biliary cholesterol, and a bigger intestinal caecum, than those fed only the lithogenic diet.

Taken together these results show that both the *L. tridentata* extract as well as the NDGA at doses below the EC₅₀ favor a lower lithogenicity of bile by reducing cholesterol molar percent and modifying the bile acid profile. These beneficial effects occur through both hepatic and intestinal mechanisms. Both compounds could be used in the treatment of cholelithiasis, taking care in the used doses, due to the hepatotoxicity that they can produce.

Abreviaturas

3αHSD	3 alfa dehidrogenasa hidroxidesteroides
ACAT	Colesterol aciltransferasa acil CoA
BSEP	Bomba exportadora de sales biliares
DSHEA	Acta de educación y suplementos dietéticos para la salud
EC₅₀	Concentración efectiva 50
FDA	Administración de drogas y alimentos
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HMG-CoA	Hidroximetilglutaril CoA
K-H	Krebs-Henseleit
LDL	Lipoproteína de baja densidad
MDR	Proteína de multi resistencia a drogas
NCTP	Transportador de taurocolato dependiente de sodio
NDGA	Ácido nordehidroguaiarético
OATPs	Proteína transportadora de aniones orgánicos
OCTs	Transportador de cationes orgánicos
TLC	Cromatografía de capa fina

I. INTRODUCCIÓN

Los productos naturales, sus derivados y análogos, representan aproximadamente el 50% de medicamentos de uso clínico; de éstos el 25% corresponden a plantas superiores, entre las que se encuentran especies conocidas como *Discorea mexicana* (diosgenina), *Ephedra equisetina* (ephedrina), *Atropa belladonna* (atropina), entre otras. Se sabe que sólo del 5 al 15% de las 250,000 especies vegetales han sido evaluadas para determinar sus compuestos biológicamente activos (Verporte et al, 2000). Como parte de los esfuerzos por identificar productos naturales con actividad biológica potencialmente útil en la clínica se ha estudiado a la planta *L. tridentata*, comúnmente llamada Gobernadora. El principal producto extraído de esta planta es el potente antioxidante ácido nordehidroguaiarético (NDGA por sus siglas en inglés), el cual forma entre 5-10% del peso seco de las hojas (Hyder et al, 2002). Desde hace tiempo se conoce a *L. tridentata* por poseer propiedades curativas contra diversas enfermedades, entre las cuales se incluyen, los cálculos biliares y renales (Díaz, 1976). En otros estudios también se ha reportado que un extracto etanólico de las hojas de *L. tridentata* presenta actividad antimicrobial (Mabry et al, 1979a; Argueta, 1994; Verastegui et al, 1996). Del mismo modo, el NDGA ha mostrado efectos similares (Calzado-Flores et al, 1995).

La incidencia de colelitiasis es un problema de salud en México, ya que se ha reportado una prevalencia de 14.1% en la población, siendo más frecuente en el sexo femenino (19.7%) que en el masculino (5.8%) (González et al, 1997). Actualmente existen grandes progresos en el área de la investigación biomédica acerca de la fisiología y el tratamiento de la colelitiasis, sin embargo, aún falta más por estudiar sobre los mecanismos que lo generan. Respecto a su tratamiento existen varios métodos, que son generalmente invasivos, además de costosos.

En estudios previos se encontró que un extracto de *L. tridentata* previene la colelitiasis pigmentaria (Cárdenas y Arteaga, 1999) y la de colesterol en el hámster (Arteaga y Cárdenas, 1995; Arteaga et al, 1997). En esta última en la que se administró *L. tridentata* de forma crónica, la prevención se asocia con una reducción del porcentaje molar de colesterol biliar, y con cambios en la composición de ácidos biliares en la bilis. *L. tridentata* produce un aumento en la bilis de ácido quenodesoxicólico, el cual se emplea para disolver cálculos y disminuir la saturación de colesterol de la bilis en humanos.

El cambio en el perfil de ácidos biliares puede deberse a un efecto directo sobre el hígado, quizás por una diferente secreción de ácidos biliares en cada zona del lobulillo hepático, como resultado de un efecto colestático o hepatotóxico de *L. tridentata* que afecte preferentemente a la zona periportal, donde primero llega y es principalmente absorbida (Baumgartner, 1995).

Por los antecedentes sobre la prevención por *L. tridentata* de la colelitiasis de colesterol, de su efecto colestático sobre duplas de hepatocitos (Cárdenas et al, 2000) y su hepatotoxicidad, así como de su acción antibiótica a nivel intestinal, en el presente estudio se establecieron las dosis tóxicas efectivas, representando efecto colestático, para posteriormente estudiar si dosis por debajo de la Concentración

Efectiva 50 (EC₅₀) modifican la composición de la bilis, haciéndola menos litogénica, mediante la perfusión hepática, para establecer si existe una diferencia entre los niveles preventivo y tóxico de *L. tridentata*. De lo anterior depende el posible uso terapéutico de esta planta en la colelitiasis, puesto que existen publicaciones que señalan la toxicidad hepática de *L. tridentata* en humanos cuando se utiliza en exceso (Brent, 1999).

Inicialmente se estudió la acción colestática del extracto etanólico de *L. tridentata* y de su principal metabolito secundario, el NDGA, para establecer sus EC₅₀. Posteriormente se estudió el efecto del extracto etanólico de *L. tridentata* y del NDGA, a niveles por debajo de su EC₅₀, sobre la alteración de la composición de la bilis y el patrón de ácidos biliares en el hígado perfundido de hámsters que previamente recibieron dieta litogénica. Lo anterior con el fin de encontrar modificaciones que se puedan relacionar con la prevención de la litiasis de colesterol.

Por otra parte, puesto que la secreción biliar es fuertemente afectada por lo que ocurre a nivel intestinal y por la circulación enterohepática, se analizó el perfil de ácidos biliares fecales. Debido al efecto antibiótico publicado del extracto etanólico de *L. tridentata* (Zamora y Mora, 1985; Verástegui et al, 1996) puede esperarse una modificación de la microbiota intestinal y por consiguiente una reducción en la formación de ácidos biliares secundarios. Particularmente un ácido biliar secundario está relacionado con la litiasis, el desoxicolato, que es producido por bacterias en el intestino, por deshidroxilación del colato y es reabsorbido para volver al hígado, donde es secretado a la bilis nuevamente y estimula una mayor secreción de colesterol debido a su alta hidrofobicidad (Kullak-Ublick et al, 2000).

El presente trabajo es una contribución en las investigaciones relacionadas con la patofisiología y el tratamiento de la litiasis biliar. El uso de plantas medicinales es sin duda una opción menos usual dentro del área médico-quirúrgica, pero justamente sugiere otra alternativa de estudio, pese al gran debate que existe, no sólo en esta enfermedad, respecto a la utilización de plantas medicinales en la terapéutica. De este modo se indaga de manera diferente sobre los conocimientos de la medicina tradicional tan importante en nuestro país, lo cual puede enriquecer nuestros puntos de vista sobre la investigación biomédica, puesto que ésta no debería concebirse aislada del contexto biológico y cultural, sino aprovechar los recursos naturales y las capacidades científicas y tecnológicas para asignarlas a las necesidades y problemas que enfrenta la sociedad.

La presentación de este trabajo está organizada de la siguiente manera, inicialmente se tratan los principales aspectos de la biología y farmacología de la planta y su principal metabolito. Posteriormente se hace mención de algunos aspectos de la fisiología hepática así como la etiología e importancia de la colestasis y colelitiasis. Después se presenta la sección experimental que incluye la metodología para las diferentes partes del estudio, los resultados obtenidos, la discusión de los mismos y las conclusiones. Los resultados obtenidos señalan que la *L. tridentata* podría ser una buena opción para el tratamiento de los cálculos biliares

de colesterol. Sin embargo, debido a su efecto colestático, las dosis empleadas deberán ser finamente ajustadas, para evitar la toxicidad de la planta.

Se requieren más estudios con el objetivo de obtener un compuesto más eficiente y seguro para el tratamiento de la coleditiasis, por su condición natural sería de bajo costo, dando una mayor utilidad a esta abundante planta de México.

Este trabajo está como todos susceptible a la crítica, a ampliarse y enriquecerse con nuevas aportaciones teóricas y prácticas que permitan continuar con el proceso de investigación a fin de obtener resultados más fecundos para la biología experimental y la medicina conjuntamente. Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Animal Experimental de la Facultad de Ciencias, UNAM, bajo la dirección del Dr. René Cárdenas Vázquez, y se presentó en forma parcial en el Congreso Nacional de Gastroenterología (Arteaga et al, 2003) y en el 49th Annual Meeting of the Western Pharmacology Society y Congreso Nacional de Farmacología (Arteaga et al, 2006).

Las publicaciones derivadas de esta investigación son las siguientes:

Arteaga S, Andrade A, Cárdenas R. 2005. *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 231-239.

Arteaga S, Carmona A, Luis J, Andrade A, Cárdenas, R. 2005. Effect of *Larrea tridentata* (Creosote bush) in cholesterol gallstones and bile secretion in hamsters. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57, 1093-1099.

III ANTECEDENTES

3.1 *Larrea tridentata* (Gobernadora)

3.1.1 Biología

Larrea tridentata (Sesse & Moc. ex DC) Coville, es un arbusto muy ramificado y nudoso de 1 a 3 m, incluso 4 m de altura. Las hojas opuestas y brillantes son dos lunas asimétricas de aproximadamente 1 cm de largo y tienen una delgada cubierta de resina, secretada por la epidermis glandular de las estípulas localizadas en los nudos. Las ramas son leñosas, nudosas e inermes. Las flores solitarias sostenidas en un eje, son completas con cinco pétalos amarillos. El fruto en forma de cápsula redondeada, está cubierta con una densa concentración de pelos blancos (De la Cerda, 1967; Nellesen, 1997). La planta desprende un penetrante olor y tiene sabor amargo. Ésta es perenne, reteniendo la mayoría de sus hojas a través de la sequía y bajas temperaturas dentro de su rango de distribución, sin sufrir daños irreparables **Figura 1**.



Figura 1. *Larrea tridentata*

La familia Zygophyllaceae, a la cual pertenece *L. tridentata*, es una familia de más de treinta géneros y más o menos 250 especies (Jones, 1987). En el cuadro 1, se presenta la clasificación de la planta.

Cuadro 1. Clasificación de *L. tridentata*

Reino Plantae
División Magnoliophyta
Clase Magnoliopsida
Subclase Rosidae
Orden Sapindales
Familia Zygophyllaceae
Género Larrea
Especie tridentata Cav.

De acuerdo a Cronquist, 1987; Jones, 1987.

L. tridentata no es comestible para el ganado y ni para los animales silvestres, ya que es usualmente tóxica, causando algunas veces la muerte (Gay y Dwyer, 1998).

Se distribuye ampliamente en áreas desérticas del norte de México, abarcando los estados de San Luis Potosí, Zacatecas, Durango, Coahuila, Chihuahua, Sonora, Baja California Norte y Sur, asociada a bosque tropical caducifolio y matorral xerófilo (García, et al, 1961). También se distribuye en el sureste de los Estados Unidos en Arizona, California, Nevada, Texas y Nuevo México (Rzedowsky y Huerta, 1994). Especies similares se han encontrado en zonas áridas de Sudamérica, principalmente en Argentina y Bolivia. Se ha establecido que la planta es de origen sudamericano con una disyunción en su distribución (Lia et al, 2001). Su dominancia se ha incrementado a 19 millones de hectáreas de tierras previamente consideradas como pastizales desérticos en respuesta a disturbios como el pastoreo (Whitford et al, 2001).

3.1.2 Etnobotánica

L. tridentata se ha empleado en medicina tradicional para tratar más de 50 enfermedades, por lo que la planta y su principal metabolito son etnobotánicamente importantes (Arteaga et al, 2005a). Históricamente se han usado los extractos acuosos de *L. tridentata* por curanderos nativos de sureste de Norteamérica y es comúnmente conocido como “té chaparral”. En México, los usos más comunes de la planta son extractos acuosos o alcohólicos de hojas y talluelos en problemas de origen ginecológico y la disolución de cálculos renales y biliares (Martínez, 1969; Díaz, 1976; Arteaga et al, 2005b). La planta se usa en una variedad de formas, las hojas se emplean en infusiones, se consumen en cápsulas y la maceración en alcohol es de uso tópico.

Extractos de *L. tridentata* se han empleado externamente como antiséptico (Mabry et al, 1979b; Argueta, 1994; Lara y Márquez, 1996), como auxiliar en desórdenes cutáneos (Sheikh et al, 1997). Se le

atribuyen propiedades antimicóticas (Mabry et al, 1979a; Barragán et al, 1994; Brent, 1999), contra especies de *Aspergillus*, *Penicillium* *Fusarium* (Tequida et al, 2002) y propiedades antivirales. Se ha mencionado como antiamebiano a bajas dosis (Brent, 1999) y como antiparasitario contra helmintos (Mabry et al, 1979a). Un extracto alcohólico de las hojas mostró actividad antimicrobial contra microorganismos gram positivos como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus faecalis*, además de mohos y levaduras y también contra *Shigella dysenteriae* (Verastegui et al, 1996). Asimismo, los extractos etanólicos y clorofórmicos de *L. tridentata* mostraron una marcada inhibición sobre el crecimiento de *Entamoeba histolytica* y *E. invadens in vitro*, éstos resultados sugieren que la polaridad de la molécula del NDGA y la formación de ortoquinona está involucrada en su actividad antibiótica (Segura, 1978; Calzado-Flores et al, 1995). Se ha reportado también la actividad antiinflamatoria de *L. tridentata* y NDGA (Mabry et al, 1979b; Argueta, 1994; Lara y Márquez, 1996) posiblemente debida a su capacidad de inhibir a la enzima lipoxigenasa *in vitro* (Bokoch y Reed, 1981; Safayhi et al, 1992). Otra variedad de enfermedades gastrointestinales se han tratado con *L. tridentata* como dolor estomacal e intestinal y diarrea (Argueta, 1994; Sheikh et al, 1997).

Por otro lado, *L. tridentata* se ha introducido como suplemento dietético debido a su actividad antioxidante; sin embargo, han surgido reportes de hepatitis tóxica en algunos consumidores crónicos, presentando daño hepatocelular, inflamación peritoneal y necrosis. Ha sido también asociada con colangitis, daño a la función sintética y falla hepática fulminante (Brent, 1999), además de un caso de enfermedad quística renal (Smith, 1994), por lo que su uso debe ser muy cuidadoso.

3.1.3 Fitoquímica

L. tridentata es una fuente notable de productos naturales con aproximadamente 50% de peso seco de las hojas de éste género como material extractable. La resina que cubre las hojas contiene 19 flavonas aglicoides y diversos lignanos, incluyendo el ácido nordehidroguaiarético (NDGA por sus siglas en inglés) (Konno et al, 1990). Se han aislado algunos flavonoides glicosilados, saponinas, aceites esenciales, alcaloides halogénicos (Argueta, 1994) y ceras (Romo de Vivar, 1985). *L. tridentata* contiene cerca del 0.1% de aceites volátiles. Dentro de la fracción volátil, han sido identificados 67 compuestos, constituyendo más del 90% de los aceites conocidos de la planta. El 10% restante es una mezcla de más de 300 constituyentes, principalmente monoterpenos y sesquiterpenos aromáticos (Mabry y Bohnstedt, 1981; Xue et al, 1988). Son predominantes productos de los ácidos mevalónico, shikímico y de las vías de ácidos grasos. Aparte de un gran número de sustancias, las vinil y metil cetonas contribuyen significativamente al olor característico de *L. tridentata*. Se han identificado también el campesterol, stigmaterol y sitosterol, así como saponinas del tipo ursólico C₃₀, que representan menos del 1% del peso seco de esta especie (Mabry y Bohnstedt, 1981). Algunos alcaloides se han extraído de la corteza y raíz, pero no de las hojas y flores (Lara y Márquez, 1996). Tres nuevos lignanos y seis flavonoides, además de cuatro lignanos ya conocidos fueron aislados de la planta (Abou-Gazar et al, 2004). Los epoxilignanos

mostraron una fuerte actividad antioxidante. Por otro lado, los flavonoides funcionan como agentes antimicrobianos y la protegen contra los herbívoros, radiación UV y pérdida de agua (Mabry y Bohnstedt, 1981).

3.1.3.1 Efectos farmacológicos reportados

Se ha reportado que la adición del extracto hidroalcohólico de *L. tridentata* previene la formación de cálculos pigmentarios en hámsters (Granados y Cárdenas, 1994), y que el extracto etanólico previene la colelitiasis de colesterol, reduciendo el porcentaje molar de colesterol (Arteaga et al, 1997).

Los extractos de *L. tridentata* se han empleado en el tratamiento de la diabetes tipo II (Winkelman, 1989). En un estudio se reportó que el masoprocol (NDGA puro aislado de la planta), reduce significativamente la glucosa y triglicéridos plasmáticos en ratas tratadas con estreptozotocina, al incrementar la disposición de glucosa y disminuir la lipólisis (Luo et al, 1998; Reed et al, 1999). También disminuyó la secreción de triglicéridos y el contenido hepático de éstos, en ratas con hipertrigliceridemia asociado con resistencia a insulina e hiperinsulinemia inducida con fructuosa (Scribner et al, 2000).

Por otra parte, en diversos padecimientos, tales como envejecimiento, enfermedades cardíacas, cáncer, Alzheimer, enfermedades autoinmunes, inflamatorias (artritis reumatoide, lupus, diabetes), SIDA, síndromes respiratorios, etc., las especies reactivas de oxígeno tienen un papel causal (Frei, 1994). *L. tridentata* ha sido tradicionalmente usada en algunos de esos desórdenes (Arteaga et al, 2005a) y quizás su actividad antioxidante a través de NDGA y otros lignanos podrían ser responsables de este beneficio terapéutico.

A pesar del uso tradicional y varios estudios experimentales, los efectos benéficos en la mayoría de estos tratamientos no ha sido demostrada empleando modelos farmacológicos apropiados *in vivo* e *in vitro*, ni en estudios clínicos para confirmar esos resultados. Sin embargo, dos propiedades de *L. tridentata* y NDGA, las actividades antibiótica y antiinflamatoria, parecen ser relevantes en su utilidad (Rivero-Cruz et al, 2005; Verástegui et al, 1996; Das, et al, 2001; Kwon et al, 2005).

3.1.3.2 Efectos tóxicos

Algunos productos de *L. tridentata*, se han comercializado, principalmente en forma de tabletas y cápsulas que contienen hojas y tallos pulverizados como suplementos dietéticos, debido a sus propiedades antioxidantes; sin embargo, el abuso de esos productos genera daño hepático (Stickel et al, 2000). Se han reportado varios casos de hepatitis asociados al uso de la planta entre 1992 y 1994 (Obermeyer et al, 1995). Otro reporte mostró evidencia de hepatotoxicidad en 13 de 18 pacientes. El daño hepático fue caracterizado como toxicidad o hepatitis colestática inducida por drogas, ictericia y un incremento en los valores séricos de enzimas hepáticas; en cuatro individuos la progresión llegó a cirrosis y dos más a falla hepática fulminante, que requirió trasplante (Sheik et al, 1997). En otro caso, un paciente desarrolló síntomas después de tomar tabletas de *L. tridentata*, 160mg/día durante dos meses, mostrando colestasis severa y daño hepatocelular; los niveles de enzimas hepáticas en suero fueron elevados y los ductos

biliares se encontraron muy reducidos (Alderman et al, 1994). Otro paciente desarrolló hepatitis después de consumir dos a tres meses las hojas diariamente, de la cual se recuperó al cesar el consumo (Batchelor et al, 1995). Se reportó otro estudio atribuyendo falla hepática y renal al consumo prologado de cápsulas o tabletas de *L. tridentata* (Gordon et al, 1995). Seis pacientes más exhibieron evidencia clínica, bioquímica e histológica de hepatitis severa después de tomar remedios herbales, entre ellos, el té chaparral. Los síntomas fueron ictericia, fatiga, prurito y altos niveles de enzimas hepáticas, indicando daño hepatocelular, en todas las biopsias se encontró hepatitis portal y lobular (Whiting et al, 2002). En un reporte de un caso, una mujer de 56 años presentó quistes en el riñón, luego de consumir de tres a cuatro tazas de té de *L. tridentata* diariamente durante tres meses (Smith, 1994). *L. tridentata* también se ha reportado como un agente que produce daño a los ductos biliares, observado en colestasis inducida por fármacos (Chitturi y Farrel, 2000).

Algunos mecanismos señalados de las causas del daño provocado por *L. tridentata* incluyen inhibición de ciclooxigenasa o del citocromo P450 o un mecanismo inmune. *L. tridentata* contiene una mezcla de flavonoides, aminoácidos, lignanos, aceites volátiles y otras sustancias. El componente específico no es conocido, pero el daño colestático podría ser consistente con el efecto de un compuesto similar al estrógeno. Estrictamente hablando, *L. tridentata* no está clasificada como un fitoestrógeno, sin embargo, los lignanos tienen una estructura similar y éstos han sido asociados con efectos colestáticos (Chitturi y Farrel, 2000). No obstante, se ha publicado un estudio sobre la seguridad del tratamiento con *L. tridentata* a bajas concentraciones (Heron y Yarnell, 2001), en el cual, ninguno de los sujetos que utilizaron la planta hasta por 22 meses, ya fuera por vía oral o por aplicaciones tópicas, mostró signos o síntomas de hepatotoxicidad. Al parecer es preferible evitar el uso de cápsulas de *L. tridentata*, ya que han sido asociadas con peligrosas sobredosis.

3.2 Ácido Nordehidroguaiarético (NDGA)

En términos de sus productos naturales, *L. tridentata* es más conocida por la gran cantidad del lignano ácido nordehidroguaiarético (NDGA), ambos son altamente solubles en etanol **Figura 2**. El NDGA químicamente es el lignano 2,3-dimetil-1,4-bis(3,4-dihidroxifenil)butano, sintetizado a través de toda la planta y depositado en la superficie de las hojas (Lara y Márquez, 1996). Este es un potente antioxidante (Floriano-Sánchez et al, 2006) que constituye entre el 5 y 10% del peso seco de las hojas; de todos los fenoles de la resina el 80% corresponden a NDGA, distribuidos en altas concentraciones en hojas (38.3 mg/g) y ramas verdes (32.5 mg/g; Hyder et al, 2002). Biológicamente el NDGA y otros fenoles de la superficie de las hojas actúan como repelentes de herbívoros (Mabry y Bohnstedt, 1981). Debido a las numerosas actividades farmacológicas de NDGA, Gezginzi y Timmermann (2001) desarrollaron un método versátil para su síntesis y la obtención de una variedad de derivados.

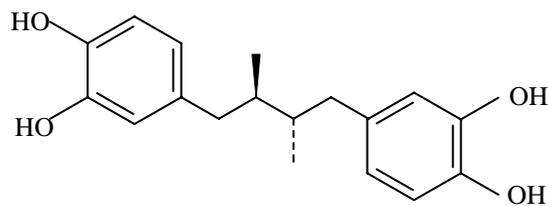


Figura 2. Ácido Nordehidroguaiarético

3.2.1 Efectos farmacológicos

En estudios experimentales con NDGA se ha informado que éste es convertido por la microbiota intestinal a compuestos estrogénicos que presentan actividad *in vitro* e *in vivo* (Fujimoto et al, 2004). La administración de NDGA a ratas redujo la tasa de ovulación y los niveles de prostaglandinas y leucotrienos de manera reversible (Mikuni et al, 1998). Se ha informado que NDGA y *L.tridentata* produjeron efecto antitumoral en un modelo de cáncer intestinal en ratas (Birkenfeld et al, 1987) y que a dosis de 2 mg/día por una semana, inhibe la toxicidad hepática y renal promovida por nitrilotriacetato férrico en ratón (Ansar et al, 1999). Por otro lado, es inhibidor del transporte vesicular intracelular a concentraciones entre 50-100 μM (Drecktrah et al, 1998) e interrumpe la vía endocítica en células dendríticas humanas (Ramoner et al, 1998). El reciclamiento protéico entre retículo endoplásmico y Golgi es bloqueado reversiblemente por NDGA a concentraciones de 30 μM , disgregando el aparato de Golgi; sin embargo, una dosis de 100 μM inhibe la síntesis de proteínas y altera irreversiblemente al aparato de Golgi (Fujiwara et al, 1998). Por otra parte, NDGA incrementa también el Ca^{2+} intracelular de manera dependiente de la concentración (10-100 μM), ésta acción es modulada por la fosfolipasa A_2 (Jan y Tseng, 2000).

El NDGA es un reconocido inhibidor de la 5 lipoxigenasa, enzima involucrada en la síntesis de leucotrienos desde ácido araquidónico. Este último provocó neurotoxicidad en neuronas corticales en cultivo, lo cual fue prevenido con la adición de NDGA (Kwon et al, 2005). En un estudio sobre el papel de leucotrienos en enfermedades respiratorias y defensa antimicrobial se encontró una sobreproducción de leucotrienos, células inmuno efectoras e inflamación que fueron disminuidas por el NDGA, así como la inhibición del crecimiento de células tumorales de pulmón (Peters-Golden, 2001) y recientemente se ha comprobado su actividad como antituberculoso (CIM 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Rivero-Cruz et al, 2005). Como inhibidor de la 5 lipooxigenasa, podría ser empleado en el tratamiento del síndrome de Sjogren-Larsson, un severo desorden neurocutáneo debido a la deficiencia de la deshidrogenasa de aldehído graso involucrada en la degradación de leucotrieno B4 (Willemsen, 2000). También existen lignanos derivados

de *L. tridentata* que muestran actividad anti-VIH, como el tetrametil o-NDGA ($IC_{50} = 43.5 \mu M$; Gnabre et al, 1996; Hwu et al, 1998). Se ha informado la inhibición por NDGA de la replicación del virus del herpes simple (Chen, et al, 1998) y la del virus del papilloma humano (Craig, et al, 2000) y ha mostrado actividad contra *Salmonella*, *Penicillium*, *Mpyri-forms*, *S. cerevisiae* y mohos (Oliveto, 1972). La invasión por *Escherichia coli* en células endoteliales microvasculares de cerebro fue inhibida por NDGA ($IC_{50} \sim 10 \mu M$) vía fosfolipasa A_2 al interferir con los precursores de la inflamación (Das et al, 2001). Dada su similitud al ácido araquidónico parece actuar como un falso sustrato para lipoxigenasas y ciclooxygenasas de ácido graso, previniendo así la formación de mediadores de la inflamación (Brent, 1999).

3.2.2 Efectos tóxicos

La extracción, cristalización y uso como antioxidante de alimentos del NDGA proveniente de la planta fue aprobada por la Meat Inspection Division of the US War Food Administration en 1943. Sin embargo, en 1970 prohibió su uso la Food and Drug Administration (FDA) (Timmermann, 1981; FDA, 2006). La FDA prohibió el uso del NDGA como aditivo de alimentos en los 70's al mostrar su efecto inhibitorio sobre varias enzimas hepáticas: peroxidasa, catalasa y alcohol deshidrogenasa, así como NADH-deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa (Timmermann, 1981). Se ha reportado también inhibición de fosfolipasa A_2 (Jacobson y Schrier, 1993), citocromo P-450 (Agarwal et al, 1991), carboxilesterasas (Sato y Hosokawa, 1998) lipoxigenasa y ciclooxygenasa (Safayhi et al, 1992).

3.2.3 Metabolismo hepático de *L. tridentata* y NDGA

La mayoría de las drogas y xenobióticos son lipofílicos convirtiéndose hidrofílicos por procesos bioquímicos en el hepatocito, hasta excretarse por la orina o la bilis. Esta transformación hepática involucra vías oxidativas mediante el sistema enzimático P450, posteriormente conjugación a glucurónido, sulfato o glutatión. El producto hidrofílico se exporta hacia el plasma o bilis por proteínas transportadoras de la membrana del hepatocito para su subsecuente excreción renal o gastrointestinal (Lee, 2003).

Acerca del metabolismo hepático de los componentes de *L. tridentata* se ha reportado que la inyección intravenosa de 50mg/kg de NDGA en ratones alcanzó una concentración plasmática de 14.7mg/ml, con una vida media de 135 min y una eliminación (clearance) de 201.9 ml/min/kg (Lambert et al, 2001). La rápida eliminación indica que ésta puede ser por mecanismos no renales. Se han identificado mono y diglucurónidos de NDGA en bilis de ratones inyectados intraperitonealmente con 120mg/kg de NDGA (Lambert et al, 2002). En este último estudio se estableció una LD_{50} de 75mg/kg, así como un incremento de alanina amino transferasa con 50 mg/kg de NDGA.

Del mismo modo, ratas del desierto alimentadas con comprimidos de alfalfa y una alto contenido de resina de *Larrea*, mostraron un incremento de conjugados con glucurónido y sulfatos. Al parecer estas

ratas del desierto de Mojave toleran mucho la resina debido a su gran capacidad para excretar glucurónico (Mangione et al, 2001).

Por otra parte se sabe que los lignanos son metabolizados a enterodiol y enterolactona por la microbiota intestinal, estos deben ser hidrolizados por enzimas intestinales o por la microflora colónica antes de que sean absorbidos. El proceso incluye metilación, sulfatación y glucuronidación, lo que facilita su eliminación biliar y urinaria (Manach, et al 2004).

3.3 El Hígado: aspectos anatómicos y fisiológicos

Las funciones básicas del hígado se pueden dividir en: 1) sus funciones vasculares para almacén y filtrado de la sangre; 2) sus funciones metabólicas que tienen que ver con la mayor parte de los sistemas metabólicos del organismo; y 3) sus funciones secretoras y excretoras responsables de formar la bilis que fluye a través de los conductos biliares al tubo digestivo. El hígado es el órgano más grande en el cuerpo humano, normalmente pesa entre 1.2 a 1.5Kg. Una división visual divide al hígado en un lóbulo derecho, que es mayor que el izquierdo por medio del ligamento falciforme, el cual lo conecta al diafragma y a la pared abdominal anterior. Sin embargo, funcionalmente, el hígado está dividido de acuerdo a sus principales canales vasculares y biliares. El hígado tiene un doble aporte sanguíneo, la arteria hepática, que trae sangre arterial bien oxigenada al hígado, la segunda fuente es la vena porta, la cual trae sangre venosa pobre en oxígeno pero rica en nutrientes, provenientes del intestino y del bazo, contribuyendo con el 70 al 80% del flujo sanguíneo. La vena porta, la arteria hepática y el ducto biliar común o colédoco ascienden al hilum del hígado donde cada una se bifurca hacia los lóbulos derecho e izquierdo y penetra progresivamente el parénquima hepático hasta alcanzar las triadas portales, en la periferia de los lobulillos hepáticos, en donde la sangre se vierte hacia los sinusoides en canales endoteliales que corren radialmente desde la vena central. En los sinusoides la sangre fluye centralmente hacia la vena central, mientras que la bilis secretada por los hepatocitos fluye en el canalículo en el sentido opuesto, viéndose vía el ducto de Hering hacia el ducto biliar interlobular en la triada portal. **Figura 3.** Las placas de hepatocitos de 1 a 2 células de grosor en los sinusoides están arregladas radialmente alrededor de una vénula hepática central. En la periferia de los lobulillos hay múltiples triadas portales, cada una contiene una vénula portal, una arteriola hepática y 1 a 2 ductos biliares intralobulares. La bilis es secretada por los hepatocitos a una red anastomosada de canalículos biliares, drenando entonces periféricamente hacia los ductos al margen de las triadas portales y de ahí hacia los ductos biliares interlobulares (Milner-Fenwick, 1989).

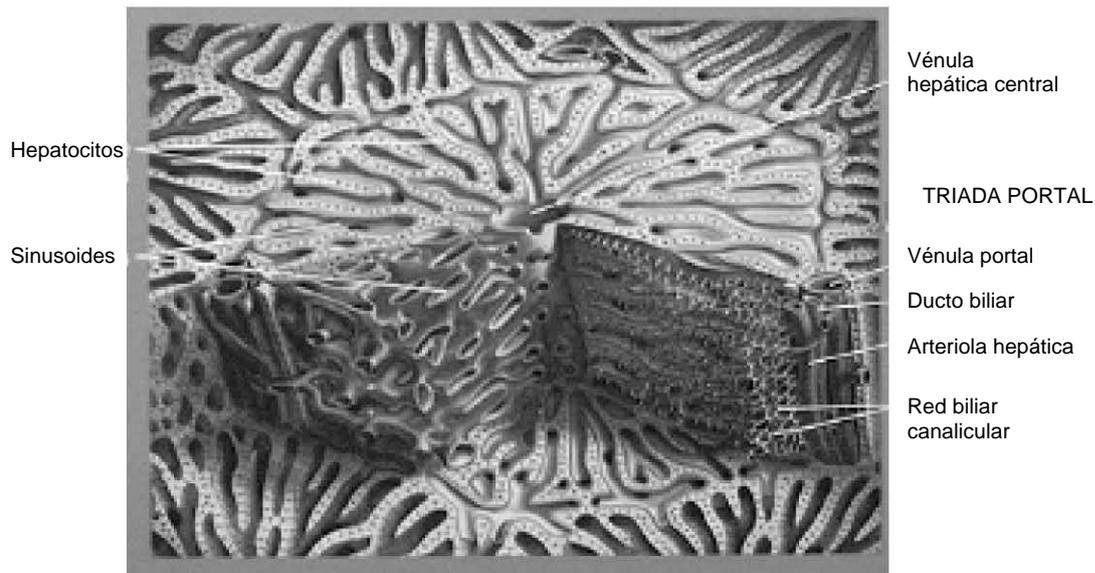


Figura 3. Anatomía de un lóbulo hepático tradicional, radialmente arreglado alrededor de la vénula hepática central con triadas portales hacia la periferia.

La unidad funcional básica del hígado es el lobulillo hepático, que es una estructura cilíndrica de varios mm de longitud y de 0.8 a 2mm de diámetro. El hígado humano contiene 50 000 a 100 000 lobulillos. El lobulillo hepático se construye alrededor de una vena central, que se vacía en las venas hepáticas y después en la vena cava. El propio lobulillo está compuesto principalmente de muchas placas celulares hepáticas que irradian de forma centrífuga desde la vena central. El flujo sanguíneo a través del hígado, es aproximadamente de 1100ml de sangre que fluyen desde la vena porta a los sinusoides hepáticos cada minuto. Además, aproximadamente unos 350ml adicionales fluyen a los sinusoides desde la arteria hepática, dando una medida total de unos 1450ml/min. Esta cantidad supone aproximadamente el 29% del gasto cardíaco en reposo, casi una tercera parte del flujo sanguíneo corporal total.

3.3.1 La bilis

La función de la bilis es dual, por un lado lleva sales biliares que son necesarias para una buena digestión y absorción de los lípidos de la dieta, y por otro es un vehículo de excreción de sustancias endógenas y exógenas.

3.3.1.1 Composición

La bilis es una secreción acuosa diluida producida por los hepatocitos. La bilis se modifica durante su pasaje por los ductos biliares. Esta es posteriormente concentrada en la vesícula biliar por absorción de agua y electrolitos. La bilis secretada por el hígado se denomina hepática y contiene de 1 a 4% de sólidos, mientras que la almacenada en la vesícula se denomina vesicular y contiene 5 a 16% de

sólidos (Smith, 1973). Los sólidos de la bilis son principalmente lípidos, pigmentos biliares, proteínas y electrolitos. Los lípidos están constituidos por sales biliares, fosfolípidos y colesterol. La concentración de ácidos biliares en bilis hepática humana está en el rango de 2-45 mM, presentes como aniones (sales biliares), en bilis hepática y vesicular están en forma micelar, así también en el duodeno y yeyuno. Los principales ácidos biliares del hombre son conjugados de ácidos biliares primarios cólico y quenodesoxicólico, i.e. sintetizados en el hígado desde colesterol, y secundarios desoxicólico y litocólico, i.e. sintetizados por modificación de los primarios en el intestino por la microflora. Las concentraciones de fosfolípidos y colesterol de la bilis hepática humana están en un rango de 25-810 mg/dl y de 60-320 mg/dl, o 0.3-11.0 mM y 1.6-8.3 mM, respectivamente. La secreción de fosfolípidos y colesterol es dependiente de los ácidos biliares, además de que éstos los mantienen en solución, mediante la formación de micelas mixtas. La bilirrubina es el principal pigmento biliar (20 a 200 mg/dl), la cual se encuentra di y mono conjugada con ácido glucurónico. Las proteínas (2 a 500 mg/dl) están representadas por proteínas plasmáticas, que se encuentran en muy bajos porcentajes respecto a su concentración en plasma, enzimas hepatocelulares, también en cantidades bajas y proteínas exclusivas de la bilis, e.g. mucina e IgA. Aproximadamente 40 proteínas diferentes han sido encontradas en la bilis (Reuben, 1984).

3.3.1.2 Secreción

La vía de entrada de sustancias endógenas y exógenas de la sangre hacia la bilis es por proteínas transportadoras específicas de la membrana sinusoidal. Algunos electrolitos pueden viajar a través de la vía paracelular por las uniones estrechas intercelulares.

La formación de bilis canalicular está referida como un flujo osmótico de agua en respuesta al transporte activo de soluto. Debido a la excelente correlación entre el flujo biliar y la secreción de ácidos biliares hacia la bilis, los ácidos biliares son considerados como uno de los principales solutos que generan el flujo biliar. Se utiliza el término flujo dependiente de ácidos biliares para describir esta fracción del flujo biliar. Sin embargo, el flujo biliar canalicular puede también ser generado a pesar de una baja producción de ácidos biliares o en ausencia de éstos. Esta fracción se denomina flujo independiente de ácidos biliares.

El transporte de solutos desde el plasma hacia el hepatocito está mediado por varios tipos de transportadores. En la membrana basolateral la captación de ácidos biliares está dada por el polipéptido cotransportador de sodio y taurocolato (NTCP) y las proteínas que transportan aniones orgánicos (OATPs). El primero depende del gradiente de Na⁺ mantenido por la Na⁺/K⁺ ATPasa, mientras que el segundo es independiente de este gradiente. Durante la fase de transporte intracelular los ácidos biliares son conjugados con taurina y glicina, esto se requiere para pasar a la bilis. Otro grupo de transportadores sinusoidales son los de cationes orgánicos (OCTs; Kullak-Ublick et al, 2000). Este grupo incluye a las proteínas de resistencia a múltiples drogas (MDR). El colesterol biliar proviene predominantemente del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), por lo que la captación de estas desde el plasma es

importante en su secreción biliar. Estas lipoproteínas son captadas por el receptor SR-B1, que cuando es sobre expresado incrementa la secreción biliar de colesterol (Arrese y Acatino, 2002).

El transporte a través de la membrana canalicular es el paso limitante para la secreción biliar de la mayoría de los constituyentes biliares y para la formación de bilis canalicular. Esto es dirigido principalmente por bombas exportadoras dependientes de ATP, las cuales funcionan unidireccionalmente y pertenecen a la superfamilia de transportadores con cassette ligador de ATP (ABC; Kullak-Ublick et al, 2000). Los ácidos biliares son transportados hacia la bilis principalmente por la bomba exportadora de sales biliares (BSEP o ABCB11), el colesterol por el heterodímero ABCG5/G8, que al parecer funciona como flipasa, lo mismo que ABCB4 (MDR3) que actúa sobre los fosfolípidos. Estas flipasas translocan estos lípidos de la parte interna de la membrana canalicular hacia la parte externa, de donde son extraídos por las micelas de sales biliares o forman vesículas (Marshall y Einarson, 2007) **Figura 4**.

Existe un gradiente de concentración lobular (periportal > centrilobular) para ácidos biliares y también hay un gradiente en el diámetro canalicular, sugiriendo que en condiciones fisiológicas la mayor secreción de ácidos biliares ocurre en la región periportal.

El flujo biliar canalicular está linealmente relacionado a la tasa de secreción de ácidos biliares. Existe la hipótesis de que los ácidos biliares incrementan el flujo biliar dado que dan una fuerza osmótica para la filtración de agua y electrolitos. Ciertos ácidos biliares tienen poca tendencia a formar micelas y su actividad osmótica es mayor, es decir, son coleréticos, por ejemplo, el ácido dehidrocólico y sus conjugados. Por otro lado, otros ácidos biliares que inducen hipercoleréisis se les asocia con un incremento en la concentración de bicarbonato, como el ursodesoxicólico, utilizado para la disolución de cálculos de colesterol.

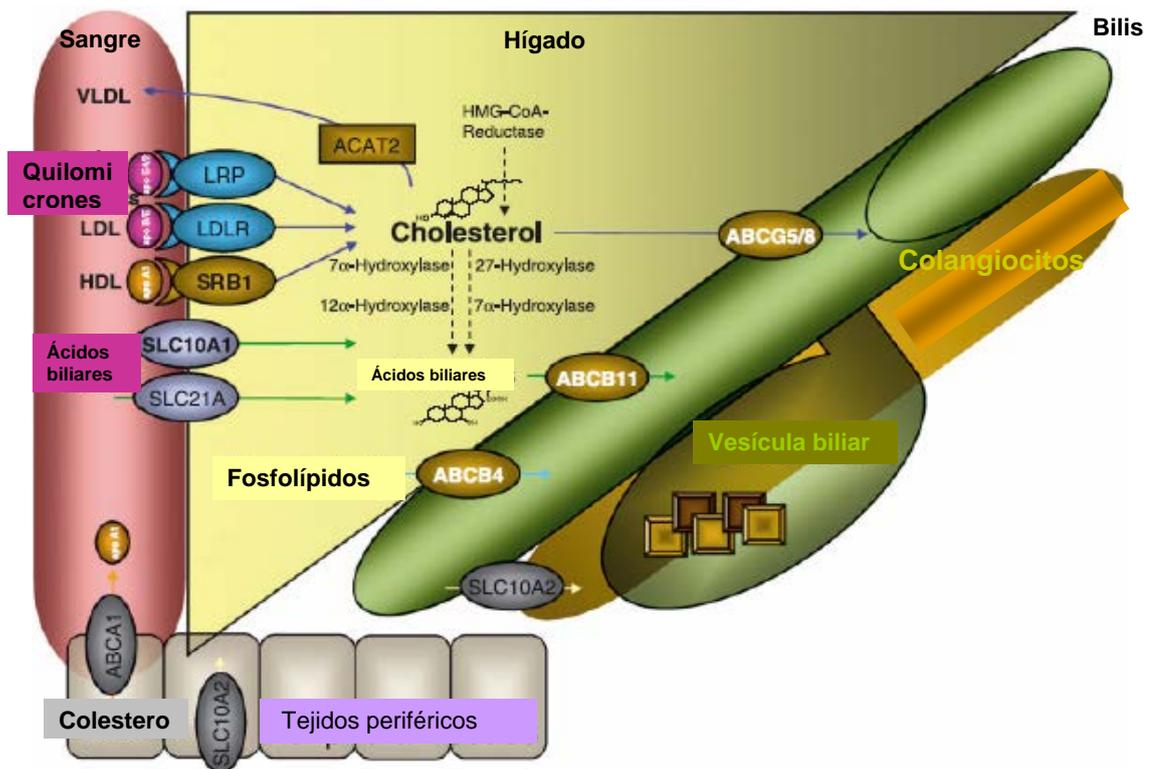


Figura 4. Principales componentes del metabolismo del colesterol y ácidos biliares y principales transportadores de la membrana basolateral y canalicular. Lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), proteína relacionada al receptor LDL (LRP), acil CoA:colesterol aciltransferasa (ACAT), proteína transportadora de taurocolato dependiente de sodio NTCP (SLS10A1), proteína transportadora de aniones orgánicos OATPs (SLC21A), transportador de sales biliares ileal/apical dependiente de sodio (SLC10A2), multiresistencia a drogas MDR1 (ABCB1), MRP2, 3 (ABCC2).

3.4 Metabolismo intestinal y circulación enterohepática de los ácidos biliares

Los ácidos biliares formados en el hígado son absorbidos activamente por el intestino delgado por el transportador de ácidos biliares apical dependiente de sodio (ASBT), el cual es el principal transportador, aunque también está OATP3. Cada molécula de ácido biliar sufre múltiples circulaciones enterohepáticas antes de ser excretado. En el intestino delgado los ácidos biliares solubilizan los lípidos de la dieta promoviendo su absorción. Las bacterias intestinales pueden transformar ácidos biliares y esteroides. Una parte de los ácidos biliares primarios (cólico y quenodesoxicólico) pasan al intestino grueso y son desconjugados, por la β -glucuronidasa bacteriana, y deshidroxilados, por la 7-deshidroxilasa, con lo que se convierten en ácidos biliares secundarios (desoxicólico y litocólico, respectivamente), parte de los cuales entran en circulación enterohepática. El ácido litocólico es en su mayor parte eliminado en las heces (Hofman, 2007), mientras que el ácido desoxicólico se ha asociado con la colestiasis de colesterol, como resultado de un prolongado tránsito intestinal (Shoda et al, 1995; Mamianetti et al, 1999; Thomas et al, 2000; Heaton, 2000). Por otra parte, los ácidos biliares también juegan un papel importante en la etiología del cáncer de colon por actuar como promotores de procesos tumorigénicos (Hughes y Rowland, 2000).

Una herramienta de estudio de la microbiota intestinal y sus productos es la colección de heces al contener una muestra representativa de éstos (Mai y Morris, 2004). La microbiota puede ser alterada por el tratamiento con antibióticos entre otros factores. Se ha reportado en ratas que el tratamiento con antibióticos disminuye los microbios anaerobios fecales, reduciendo los ácidos biliares fecales totales (Hashimoto et al, 1996).

3.5 Colestasis

El término colestasis puede definirse como la manifestación clínica, bioquímica e histológica de defectos en la secreción de bilis desde el hígado hacia el intestino (Poupon et al, 2000). Esta puede ser debida a una obstrucción de los conductos biliares, por tumores, litiasis, colangitis esclerosante o ligadura del conducto biliar, denominándose entonces como colestasis extrahepática. También puede deberse a anomalías a nivel de los hepatocitos, denominándose colestasis intrahepática, las causas pueden ser sustancias endógenas o exógenas, o mutaciones genéticas (Kullak-Ublick et al, 2000).

La acumulación de las sustancias que deberían ser secretadas en la bilis es lo que causa las alteraciones hepáticas y biliares observadas en la colestasis. De estas los ácidos biliares son la principal causa de las alteraciones. El potencial hepatotóxico de las sales biliares es prevenido en grado significativo por sulfatación y glucuronidación durante la colestasis. Los ésteres son rápidamente excretados por el riñón y pobremente reabsorbidos en el intestino delgado (Kullak-Ublick et al, 2000).

Las manifestaciones clínicas de colestasis intra y extrahepática incluyen ictericia, prurito y elevación en suero de sales biliares, bilirrubina, fosfatasa alcalina y enzimas membranales como 5-nucleotidasa, gama-glutamiltanspeptidasa y leucinoamonipectidasa. Sin embargo, estas anomalías solo se reflejan cuando cerca del 80% de la capacidad de la función hepática está impedida, por lo que se requiere de una medición del flujo biliar no invasiva para detectar la colestasis. Mediante una cuidadosa evaluación clínica, serológica, e histológica es posible deducir sobre la patogénesis de la colestasis, con la utilización de ultrasonido, colangiografía transhepática percutánea y colangiografía endoscópica retrógrada, se logra una diagnosis anatómica exacta, separando así la colestasis intra de la extrahepática. La colestasis evoluciona en la mayoría de los casos a hepatitis colestática, cirrosis o falla hepática fulminante (Poupon et al, 2000).

Los niveles de actividad de la fosfatasa alcalina en suero se emplean en la clínica como marcador de colestasis. Esta enzima está presente en células epiteliales ductulares y hepatocelulares, en estas últimas su liberación es mayormente estimulada por la ligadura del ducto biliar, alcanzando su máximo pico después de 24hrs, mientras que la proliferación ductular incrementa después de los siete días. La enzima existe en la membrana y el citosol, sólo la primera está incrementada en la colestasis y es debido a un incremento en su síntesis. El incremento de esta enzima es un fenómeno que ocurre tanto en la colestasis intra como extrahepática.

En el modelo de colestasis extrahepática de rata con ligadura del ducto biliar, se asemeja grandemente a lo que ocurre en la colestasis obstructiva por cálculos, neoplasias y colangitis esclerosante. Así la ligadura del ducto lleva a una alteración de la polarización del hepatocito con acumulación de vesículas pericanaliculares que contienen las proteínas apicales (Stieger et al, 1994). La alta presión biliar produce cambios en las uniones gap, giros de las ramas de las uniones estrechas observándose una nueva formación del canalículo. Los transportadores basolaterales NTCP y OATP1 reducen su cantidad, lo mismo que los canaliculares como BSEP y MRP2. Otros incrementan su presencia como MRP3 y MRP1, quizás para compensar la disminución de MRP2; también se incrementan MDR1b, una bomba de cationes, y MDR2, la translocasa de fosfolípidos.

La colestasis intrahepática progresiva familiar (PFIC) tipo 1 se debe a mutación del gen FIC1, que codifica para una translocasa canalicular de fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina de la parte externa hacia la parte interna de la membrana. Esto lleva a colestasis, pero sin proliferación de los ductos biliares y evoluciona hacia cirrosis (Bull et al, 1998). Lo mismo ocurre en la colestasis intrahepática benigna recurrente (BRCI), pero de forma menos severa y no progresa hacia cirrosis (Kullak-Ublick, 2000). En el tipo 2 de la PFIC, la mutación ocurre en BSEP, mientras que en el tipo 3 hay deficiencia de MDR3, la translocasa de fosfatidilcolina que en roedores es MDR2. En esta última la falta de fosfolípidos en la bilis provoca que los ácidos biliares dañen los conductos biliares. A diferencia del tipo 1, en la tipo 3 hay proliferación de ductos biliares (Boyer, 2007). Polimorfismos en el gen MDR3 parece que predisponen a la colestasis de la preñez y a la provocada por algunas drogas exógenas (Jaquemin et al, 1999).

La mutación del gen del regulador de conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR) puede provocar colestasis (Kullak-Ublick, 2000). CFTR es un canal de Cl⁻ que se expresa en los colangiocitos, es estimulado por secretina. Junto con el intercambiador Cl⁻/HCO₃⁻ son responsables de la secreción biliar ductal, que es parte de la secreción biliar independiente de sales biliares.

Las colestasis intrahepáticas pueden también ser provocadas por drogas endógenas y exógenas. Entre las primeras se encuentran las citocinas interleucinas 1-beta y TNF α , producidas en respuesta a lipopolisacárido (LPS) bacterial, que reducen a los transportadores NTCP y/o BSEP (Mc Clure et al, 1998). LPS, al parecer también a través de citocinas, reduce la presencia de MRP2 en la membrana canalicular y con ello la secreción de glutatión y bicarbonato, principales responsables de la secreción biliar independiente de ácidos biliares (Kubitz et al, 1999).

Los estrógenos son también inductores de colestasis, que junto con algunas formas de MDR3 desencadenan la colestasis intrahepática de la preñez. El tratamiento con estrógenos por terapia de reemplazo o anticonceptivos también favorecen la colestasis en sujetos susceptibles. El etinil estradiol en ratas reduce la cantidad de BSEP, mientras que el metabolito del estradiol 17 β -D-glucurónido de estradiol inhibe la actividad de la BSEP (Fiorucci et al, 2005). Esta inhibición de BSEP requiere de la presencia de MRP2, la cual transporta normalmente al glucurónido.

El ácido biliar litocolato, tanto conjugado como libre, es un fuerte agente colestático. El litocolato, que se produce por deshidroxilación del quenodesoxicolato en el intestino, se encuentra en

muy baja concentración en la bilis, pues casi no entra en circulación enterohepática. Experimentalmente se ha visto que aumenta la rigidez de la membrana canalicular, inhibe el transporte intracelular de vesículas y previene la fusión de éstas con la membrana canalicular (Kullak-Ublick et al, 2000).

Las drogas son la causa más común de colestasis intrahepática. En la mayoría de los casos el mecanismo para la colestasis inducida por drogas no es conocido, por la baja incidencia de colestasis asociada con la mayoría de los agentes terapéuticos, pero que pueden afectar el sistema excretor biliar y producir colestasis. La expresión clínica es hepatitis aguda, sin embargo, pueden llevar a hepatitis fulminante y cirrosis. Diversas sustancias exógenas producen colestasis intrahepática (Boyer, 2007). Aunque la patogénesis de muchas no ha sido establecida, al parecer actúan inhibiendo alguno o varios de los transportadores, como es el caso de ciclosporina que inhibe a la BSEP, además de inhibir el flujo independiente de sales biliares (Chan et al, 1998). La rifamicina y la rifampicina también inhiben a la BSEP.

3.6 Colelitiasis

La colelitiasis es una enfermedad en la cual se produce uno o varios cuerpos duros en la vesícula biliar o en las vías biliares intra o extrahepáticas, por precipitación de una sustancia normalmente presente en la bilis, la cual aumenta su concentración relativa y precipita.

La presencia de cálculos biliares puede pasar inadvertida durante años, inclusive toda la vida, denominándose éstos como cálculos asintomáticos (Attili et al, 1995); sin embargo, los cálculos pueden volverse sintomáticos al provocar obstrucción de los conductos cístico o colédoco, causando ictericia obstructiva y colecistitis crónica o aguda, la cual puede llegar hasta gangrena y perforación de la vesícula, o causar empiema; la obstrucción del cístico puede también causar daño a la vesícula debido a la bilis retenida. Asimismo, el carcinoma de vesícula se encuentra generalmente asociado a cálculos biliares y colecistitis (Sherlock, 1981).

La composición de la bilis es determinante para la formación de los cálculos, aunque otros factores también influyen, tales como alteraciones en el vaciamiento o concentración de la bilis por la vesícula (Shoda et al, 1995). La composición de la bilis es muy variable, sin embargo, la bilis cuya composición favorezca la formación de cálculos biliares se denomina bilis litogénica.

De acuerdo a su composición química, los cálculos biliares se clasifican en tres tipos principales (Sherlock, 1981, Trotman, 1982): Los pigmentarios, compuestos por sales orgánicas e inorgánicas de calcio, los mixtos, constituidos por pigmentos biliares, sales de calcio y hasta un 70% de colesterol y los de colesterol que contienen este lípido hasta en un 98% de su peso. Estos últimos son cristalinos, radiados y translúcidos de forma redondeada u ovoidea y de superficie lisa o nodulada; miden en el hombre de 1 a 4 cm. de diámetro. Generalmente son solitarios, aunque también los hay múltiples.

La colelitiasis de colesterol, dentro de la cual se incluye la mixta, es mucho más frecuente en el mundo occidental que en Oriente y África. Los países con las más elevadas frecuencias de este tipo de colelitiasis son Chile y Suecia, en donde el 33 y 20% de la población, respectivamente, presentan cálculos de colesterol (Roda et al, 1989). En EU la colelitiasis es la diagnosis más común entre las enfermedades gastrointestinales y hepáticas (Russo et al, 2004). Se ha estimado que cerca de 20 millones de personas padecen colelitiasis, y de estas aproximadamente 70% presentan cálculos de colesterol (Heaton, 1973; Trotman, 1975). En el mundo occidental, la mayor incidencia se presenta en los indios norteamericanos (64.1% en mujeres de 47 años de edad (Everhart et al, 2002). En los países orientales la colelitiasis pigmentaria es más frecuente que la de colesterol, sin embargo, la occidentalización de las costumbres, como ocurre en las zonas urbanas del Japón (Tazuma, 2006), provocan un incremento en la colelitiasis de colesterol y una disminución de la pigmentaria. Por el contrario, África está casi exenta de colelitiasis (Heaton, 1973; Wasmuth et al, 2004). Para Latinoamérica hemos señalado la alta frecuencia en Chile; en un estudio en Bolivia se encontraron sólo cálculos de colesterol en un alto porcentaje (Soloway, 1977). En México un estudio señala que 14.3% de la población presenta cálculos biliares (Méndez et al, 1993), y en cuanto a su composición, se conoce que más del 85% de cálculos son de colesterol puros y mixtos (Méndez et al, 1995). La prevalencia de colelitiasis en la Ciudad de México se ha estimado en un promedio de 14.1% (5.8% en hombres y 19.7% en mujeres), esta fue asociada con la edad, el sexo y la multiparidad (González et al, 1997). La Secretaría de Salubridad y Asistencia reportó que en 2002 esta fue la tercera causa de hospitalización (33474 casos, 2.05% de todos los casos; SSA, 2002).

La etiología de la colelitiasis es influida por varios factores, tales como la dieta, edad, sexo, obesidad, herencia, raza, clase social y varias asociaciones clínicas como la hipertrigliceridemia, terapia con estrógenos, multiparidad, anticonceptivos orales, etc. (Diehl, 1991). Las dietas hipercalóricas, altas en carbohidratos refinados, colesterol y ácidos grasos de cadena corta como las grasas animales se han asociado con una mayor frecuencia de colelitiasis (Dam, 1969; Thornton, 1983; Marshall y Einarsson, 2007). La fibra dietética también es importante para mantener una bilis menos saturada de colesterol (Kritchevsky, 1988). El consumo de leguminosas se ha asociado con una mayor incidencia de litiasis (Nervi et al, 1989). Por otro lado, el ayuno se ha asociado con un aumento en la litogenicidad de la bilis por aumento de la secreción de colesterol relativa a ácidos biliares, así como la disminución de la secreción de fosfolípidos (Goldstein, 1975). Los cálculos de colesterol se presentan en todas las edades, sin embargo, en la década de los cuarentas, son más frecuentes, especialmente en mujeres con antecedentes de embarazo o con el uso de anticonceptivos orales (Roda, 1989; Marschall y Einarson, 2007).

La raza afecta la frecuencia de colelitiasis, así, las poblaciones de indios americanos, tales como Pima, Chipewa y Navajos presentan una altísima frecuencia de colelitiasis (48.6%; Goldstein, 1975; Méndez-Sánchez et al, 2004). En Estados Unidos, la población México-americana presenta una prevalencia de colelitiasis intermedia entre los indios americanos y la población anglosajona (Hanis,

1985), mientras que la raza negra es la menos susceptible a la colelitiasis (Tyroler, 1980), lo cual concuerda con la baja frecuencia de colelitiasis encontrada en África (Heaton, 1973; Wasmuth et al, 2004).

La obesidad se asocia con mayor frecuencia de colelitiasis. Se ha correlacionado el colesterol biliar con el grado de obesidad; asimismo, la síntesis de colesterol es proporcional al peso corporal (Goldstein, 1975). El síndrome metabólico y la diabetes tipo 2 son factores de riesgo para el desarrollo de cálculos (Pazzi et al, 2000; Grundy, 2004). Por otro lado, se presenta un alto riesgo de formar cálculos con una rápida reducción de peso por medios dietéticos (Broomfield, 1988; Méndez et al, 1996).

La patogénesis de la colelitiasis de colesterol es indudablemente multifactorial; en la que participan eventos hepáticos y vesiculares, puesto que la vesícula es el sitio más común de formación del cálculo. La producción de una bilis sobresaturada de colesterol es el principal requisito para la precipitación de éste y su consolidación en la vesícula; esta saturación puede ser debida a una secreción excesiva o a una reducción de sales biliares y fosfolípidos (Carey, 1992; Holzbach, 1985), los cuales mantienen el colesterol en solución.

Las diferentes sales biliares tienen distinto efecto sobre la cantidad de colesterol secretado, siendo más efectivas las más hidrofóbicas, que son las más detergentes (Bilhartz, 1988). Se ha asociado el ácido desoxicólico con una mayor secreción de colesterol (Hussaini et al, 1995; Shoda et al, 1995). También se ha señalado que una proporción significativa de pacientes con cálculos de colesterol, presentan un aumento en la secreción de colesterol y una secreción normal de sales biliares y fosfolípidos (Marschall y Einarson, 2007). De manera general los pacientes con cálculos tienen índices de saturación de colesterol más elevados que las personas sin cálculos.

En la patogénesis de los cálculos biliares de colesterol, se ha establecido que en la bilis la agregación de vesículas unilamelares para formar vesículas multilamelares es importante para permitir la formación de cristales de colesterol monohidratado, que es la primera etapa en la precipitación del colesterol (Holzbach, 1990); sin embargo, solo la agregación de vesículas sobresaturadas con el esteroil (i.e., con una elevada proporción de colesterol/fosfolípidos) permite la cristalización de éste. El cálculo biliar se forma por la adición y crecimiento de los cristales precipitados, a los cuales se les puede o no agregar sales de calcio, dando lugar a los cálculos radioopacos y radiolúcidos.

De lo anterior se desprende el concepto de tiempo de nucleación definido como el tiempo de aparición de cristales de colesterol en una muestra de bilis incubada a 37°C. La nucleación del colesterol es un complejo proceso que involucra fusión, agregación o ruptura de vesículas enriquecidas de colesterol (Harvey y Upadhyay, 1995). El tiempo de nucleación es más rápido en bilis vesicular que en bilis hepática, debido a la mayor concentración de la primera (Van Erpecum et al, 1990). La nucleación es promovida por la mucina, cuya secreción por el epitelio de la vesícula biliar se incrementa antes y durante la formación de los cálculos (Malet et al, 1989).

Otro factor que puede contribuir de manera importante a la formación de los cálculos es la deficiente función motora de la vesícula biliar. La estasis vesicular provoca la estratificación de la bilis, pues en el fondo de esta se acumula bilis más concentrada y densa que la recién llegada del hígado, asimismo se depositan sedimentos en el fondo, tales como mucoproteínas, sales de calcio, pigmentos biliares, células epiteliales descamadas, bacterias (Swidsinski et al, 1995) y/o residuos por reflujo intestinal (Holzbach, 1983).

Los hábitos sedentarios y el ayuno (Schlierf, 1981) producen una mayor estratificación y permanencia de la bilis en la vesícula biliar, lo cual ayuda en la nucleación de colesterol. Además, defectos en el vaciamiento vesicular provocan que esta bilis concentrada y los sedimentos acumulados no se evacúen, lo cual propicia la formación de cálculos. Se han propuesto varios mecanismos por los cuales se ve alterada la contractilidad de la vesícula: puede ser debido a una insuficiente secreción de colecistocinina para estimular adecuadamente la contracción vesicular (Thompson, 1982), o a un reducido número o menor afinidad de los receptores vesiculares de la hormona (Fridhandler, 1983), así como el tratamiento con octreotido (Dowling, 2000). La hipomotilidad de la vesícula biliar se ha encontrado en pacientes con colelitiasis (Shoda et al, 1995; Méndez et al, 1996; Van Erpecum et al, 2000).

Actualmente se emplean diversos tratamientos para la litiasis biliar; sin embargo, el tratamiento quirúrgico por colecistectomía sigue siendo el más empleado, debido a su baja morbimortalidad y a que es un tratamiento casi siempre definitivo. Sus inconvenientes son, que es un procedimiento invasivo, en el que hay riesgo, aunque bajo, de una lesión iatrogénica de las vías biliares, se realiza bajo anestesia general, provoca días de incapacidad y tiene un costo elevado para el paciente. A la técnica clásica se han sumado dos variantes como son la colecistectomía por mini laparotomía y por laparoscopia, procedimientos que mejoran las cifras de morbimortalidad, con menores molestias postoperatorias para el paciente, más rápida recuperación y breve estancia hospitalaria (Frimberger, 1989). Se ha publicado que la colecistectomía se asocia con riesgo de cáncer del colon, dado que se incrementa la formación de ácidos biliares secundarios por bacterias intestinales, especialmente de DCA (Kullak-Ublick et al, 1995).

En el tratamiento de la coledocolitiasis con alto riesgo quirúrgico y en los cálculos residuales después de colecistectomía, la esfinterotomía endoscópica es el tratamiento de elección (Dowsett, 1988).

En la búsqueda de tratamientos no invasivos, se ha empleado la disolución de los cálculos por medio de ácidos biliares y de solventes orgánicos. La fragmentación por medio de ondas de choque extracorpóreas (litotripsia) de los cálculos permite que éstos sean evacuados directamente o más fácilmente disueltos pero ha sido casi completamente abandonada debido a sus complicaciones (Marschall y Einarsson, 2007).

Los ácidos biliares empleados para disolver cálculos son el ácido quenodesoxicólico y su 7-beta epímero, el ácido ursodesoxicólico. Con la administración de ácidos biliares se busca aumentar la proporción de sales biliares y disminuir la de colesterol en la bilis, para conseguir la solubilización del exceso de colesterol presente en el cálculo. El primero en utilizarse fue el ácido quenodesoxicólico (Danzinger et al, 1972), el cual es un ácido biliar primario que constituye entre el 20 y el 30% de las sales biliares en la bilis humana normal. La administración oral de quenodesoxicólico (15mg/kg/día) provoca la disminución en la secreción biliar de colesterol, (sin cambiar la secreción de ácidos biliares, y posee la capacidad de mantener una proporción casi constante de colesterol/lecitina biliar en presencia de una secreción reducida de sales biliares, como ocurre durante el ayuno, con lo cual se forma una bilis menos saturada. Asimismo el ácido quenodesoxicólico inhibe la HMG-CoA reductasa hepática, sin embargo, esta inhibición no parece ser la causa de la menor secreción de colesterol. La bilis enriquecida con ácido quenodesoxicólico y no saturada de colesterol, al entrar en contacto con la superficie del cálculo, solubiliza el colesterol en micelas mixtas, en un proceso de micelación semejante al que ocurre cuando el colesterol es secretado en vesículas unilamelares (Igimi y Carey, 1981). Sin embargo, no todos los cálculos se disuelven con este tratamiento, se ha estimado que su eficacia es del 60% en cálculos radiolúcidos, además de que una vez interrumpido el tratamiento hay una elevada recurrencia de cálculos. Se ha estimado también que los cálculos de gran tamaño, no responden al tratamiento, así como los cálculos con cubiertas calcificadas radioopacas. El tratamiento con ácido quenodesoxicólico provoca ciertos efectos nocivos, así un 25 a 30% de pacientes desarrollan diarrea e incrementan en aproximadamente 10% el colesterol LDL, también se presenta un 30% de lesiones hepáticas, además del costo elevado del tratamiento (Sleisenger y Fordtran, 1985).

El ácido ursodesoxicólico se encuentra en muy pequeñas cantidades en la bilis humana, pero es abundante en algunas especies animales, tales como el oso y la nutria. Este ácido es más hidrofílico y menos detergente que el quenodesoxicólico, por lo que al aumentar su proporción en la bilis por administración oral (8 a 10mg/kg/día), es menos efectivo para solubilizar las grasas de la dieta, por lo que el colesterol dietético se absorbe menos; así mismo, el ácido ursodesoxicólico disminuye la secreción biliar de colesterol en mayor grado que el ácido quenodesoxicólico, en parte por ser más hidrofílico (Ward, 1984). La disolución del cálculo por el ursodeoxicólico es más rápida que con el quenodesoxicólico debido a que es mayor el área de interacción entre la capa de fosfolípidos y el cálculo, que entre éste y la micela mixta, además de que las vesículas unilamelares tienen mayor capacidad para transportar al colesterol (Roda, 1995). Además no reduce la síntesis de sales biliares, que es una vía de eliminación de colesterol y no produce alteraciones funcionales hepáticas, ni provoca diarrea, sin embargo, el costo es aún más elevado (Sleisenger y Fordtran, 1985; Petroni et al, 2001).

No todos los pacientes con cálculos de colesterol pueden ser tratados con ácidos biliares para disolver cálculos. Los criterios de selección son que presente cálculos pequeños (lo cual puede ser

resuelto mediante litotripsia), no calcificados y flotantes. La disolución de los cálculos de colesterol también se puede lograr con el empleo de solventes orgánicos como el metil terbutil éter y el diglicérido de cadena media ácido monoctanóico, los cuales son mucho más efectivos para disolver el colesterol, sin embargo, deben ser aplicados por medio de un cateter transhepático colocado mediante punción percutánea de la vesícula biliar o de las vías biliares (Thistle, 1989). Tanto la litotripsia como los solventes orgánicos prácticamente ya no se utilizan por los riesgos que conllevan.

Lo anterior muestra que, aunque se tiene una gama de alternativas, todavía no se tiene un método ideal para el tratamiento de la colelitiasis, por lo que se requiere continuar investigando y evaluando mecanismos y nuevos agentes terapéuticos de tratamiento, prevención y disolución de este tipo de colelitiasis.

3.7 El hámster como modelo de colelitiasis

Debido a la importancia de conocer la etiología de la colelitiasis humana, se han estudiado procesos fisiológicos normales y patológicos en modelos animales como el ratón albino, la ardilla, el perro de las praderas, los primates y por supuesto el hámster (Cárdenas, 1991). Este ha sido utilizado como modelo de colelitiasis, pues por medios dietéticos y/u hormonales produce en corto tiempo cálculos biliares de colesterol, pigmentarios o mixtos (Cárdenas, 1996) **Figura 5**.

El hámster se asemeja al hombre en parámetros biliares y en el metabolismo del colesterol (Roda et al, 1995; Spady et al, 1983). En comparación con la rata, el hámster sí presenta vesícula biliar. La bilis del hámster también se asemeja más a la humana, pues consiste principalmente de ácidos cólico y desoxicólico conjugados con glicina y taurina, siendo la mayor proporción de glicocolato, con menores cantidades de quenodesoxicolato y litocolato. No hay síntesis de ácido muricólico (Siegel, 1985).



Figura 5. Hámster. *Mesocricetus auratus*

Dam (1969) desarrolló en el hámster cálculos de colesterol con dietas libres de grasas y con carbohidratos refinados de fácil absorción, las que provocan una elevada concentración de colesterol biliar y disminución de sales biliares, favoreciendo la precipitación del colesterol y la formación de cálculos. Esta dieta litogénica también produce deficiencia de ácidos grasos esenciales, y la actividad de HMG-CoA reductasa se encuentra muy elevada, por lo que hay un incremento en la síntesis de colesterol por el hígado (Spady et al, 1983). Como se mencionó anteriormente, en estudios previos se encontró que *L. tridentata* previene la colelitiasis pigmentaria (Cárdenas y Arteaga, 1999) y la de colesterol (Arteaga et al, 1995) en el hámster. La primera por reducir la concentración de fosfato inorgánico biliar, impidiendo así su precipitación en forma de hidroxapatita, mientras que en la segunda reduce el porcentaje molar de colesterol, por lo que este no se precipita en la bilis.

IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Puesto que ya se tienen antecedentes sobre la prevención por *L. tridentata* de la colelitiasis de colesterol, de su efecto colestático sobre duplas de hepatocitos y hepatotoxicidad, así como de su acción antibiótica a nivel intestinal, en esta investigación se determinará si el efecto del extracto etanólico de *L. tridentata* y del NDGA sobre la composición de la bilis y patrón de ácidos biliares es a nivel hepático, a nivel intestinal o ambos. La prevención por *L. tridentata* de la colelitiasis de colesterol del hámster se asocia con una reducción del porcentaje molar de colesterol biliar respecto a lípidos biliares (Arteaga y Cárdenas, 1995), y a cambios en la composición de ácidos biliares en la bilis. *L. tridentata* produce un aumento de ácido quenodesoxicólico, que se emplea para disolver los cálculos y disminuir la saturación de colesterol de la bilis en humanos, y disminuye el ácido desoxicólico (Cárdenas y Arteaga 1998), éste último, estimula una mayor secreción de colesterol hacia la bilis (Thomas et al, 2000; Heaton, 2000. Además por el efecto antibiótico del extracto alcohólico de *L. tridentata* (Zamora y Mora, 1985; Verastegui, 1996) podría esperarse una modificación de la flora bacteriana intestinal y por consiguiente una modificación de la formación de ácidos biliares secundarios.

Asimismo, se establecerá si las dosis tóxicas, expresadas como colestásis, son similares o no a las dosis que modifican la composición de la bilis haciéndola menos litogénica, pues de ello depende el posible uso terapéutico en la colelitiasis de esta planta.

V HIPÓTESIS

Ha. Tanto el extracto etanólico de *L. tridentata* como el NDGA en dosis menores a la EC₅₀, producirán un aumento en la concentración de ácido quenodesoxicólico y una disminución de ácido desoxicólico, en la composición de la bilis del hígado de hámster perfundido. Asimismo, debido al efecto antibiótico de *L. tridentata* se reducirá la cantidad de ácidos biliares fecales, los cuales tendrán una menor proporción de ácidos biliares secundarios.

Ho. El extracto etanólico de *L. tridentata* y el ácido nordehidroguaiarético (NDGA) no afectarán la composición de la bilis, ni el perfil de ácidos biliares a nivel hepático, ni la concentración y composición de los ácidos biliares fecales.

VI OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos que producen el extracto etanólico de *L. tridentata* y el NDGA sobre la secreción y composición biliares en el hígado del hámster perfundido, así como el efecto del extracto etanólico de *L. tridentata* sobre la excreción de ácidos biliares en las heces, como una estimación indirecta de las modificaciones del metabolismo intestinal de los ácidos biliares.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer la concentración efectiva 50 (EC₅₀) del NDGA y del extracto etanólico de *L. tridentata* sobre el flujo biliar de hígados perfundidos de hámsteres alimentados con Purina.
- Analizar la composición lipídica biliar (colesterol y sales biliares) producida por una concentración menor a la EC₅₀ del extracto etanólico de *L. tridentata* y del NDGA en hámster con dieta litogénica.
- Analizar el perfil de ácidos biliares bajo el efecto de una concentración menor a la EC₅₀ del extracto etanólico de *L. tridentata* y del NDGA.
- Determinar la concentración y el perfil de ácidos biliares fecales de animales alimentados con dieta litogénica y tratados con extracto etanólico de *L. tridentata* y su infusión *ad libitum*.

VII MATERIAL Y METODOS

7.1.1 Animales

En el presente estudio se emplearon hámsteres dorados machos, cepa ChC, de 100 días de edad promedio inicial, con peso promedio de 100 g, los animales se obtuvieron de la colonia que se tiene en el Bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNAM y se mantuvieron en jaulas de acero inoxidable con piso y frente de malla de alambre, bajo condiciones ambientales de temperatura y humedad controladas y con un fotoperiodo de luz:oscuridad de 12:12h Cada jaula tuvo tres animales. El protocolo fue realizado en apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 "Especificaciones Técnicas para la Reproducción, el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio".

7.1.2 Extracto etanólico de *L. tridentata*.

La planta empleada para realizar los extractos, se obtuvo en el mercado de Sonora procedente de San Luis Potosí. Ejemplares de la especie que nos ocupa ya se identificaron taxonómicamente y se corroboró que se tratara de la misma especie (MEXU No. 534807, IMSSN No. 11319, FCME No. 048231, ENCB).

El extracto alcohólico de *Larrea* se realizó colocando 100g de hojas y talluelos en un matraz kitazato de 2 L, al que se agregó 1 L de etanol absoluto, se agitó durante 30 min a temperatura ambiente, se filtró a vacío en papel Watman No.1 y se evaporó hasta aproximadamente 40 ml, finalmente se evaporó a 40° C durante la noche en estufa. Finalmente se obtiene una resina con rendimiento de aproximadamente 10 g/100 g de planta.

7.1.3 Acido nordehidroguaiarético (NDGA)

El ácido nordehidroguaiarético (1,4-bis[3,4-Dihidroxifenil]-2,3-dimetilbutano) (NDGA), empleado en los experimentos fue obtenido en Sigma Chemical CO, USA.

7.1.4 Dietas:

Como dieta básica de mantenimiento para los animales de grupos de control, se suministraron Nutricubos Purina para Roedores Pequeños de Purina S.A., México, D. F., pulverizados. Como dieta litogénica, se empleó la dieta para cálculos de colesterol, libre de grasas y alta en glucosa (Dam, 1969). Los materiales para la elaboración de las dietas experimentales fueron los siguientes: 20% de caseinato de calcio (Casein purified high nitrogen) de ICN Biomedicals, Inc. Ohio, USA, 66.3% de glucosa anhidra Polidex M. A. de Aranz, S.A., México, D. F., 8% de celulosa (Alfacel, ICN), 5% de mezcla de minerales No. 2 USP XIII y suplemento para mezcla de minerales No. 2 USP XIII de ICN Biomedicals México, D. F., 0.5%

de mezcla de vitaminas de ICN Biomedicals, Inc. Ohio, USA y 0.2% de cloruro de colina de ICN Biomedicals, Inc. Ohio, USA.

7.1.5 Infusión de *L. tridentata*

Se utilizó una infusión de *L. tridentata*, la cual se preparó con 15 g de hojas y pequeños talluelos de la planta que se agregaron a 1 L de agua hirviendo, permaneciendo así por 5 minutos. La infusión se colocó *ad libitum* en los bebederos dentro de las jaulas y se midió el consumo.

7.1. 6 Medio y equipo de perfusión

La solución de perfusión fue Krebs-Henseleit (K-H), pH 7.4, adicionada con 1% de albúmina sérica bovina y 2% de glucosa anhidra (Cheung et al, 1996).

Solución Krebs-Helenseit, pH 7.4

Reactivos	mM
Na Cl	118mM
KCl	4.8mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.2mM
KH ₂ PO ₄	1.0mM
NaHCO ₃	24mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	3.2mM
Glucosa	0.2%
Albúmina sérica bovina	1.0%

El equipo de perfusión consta de bomba peristáltica Masterflex L/S" Modelo 7519-20, tubos platinum LS16 DI:0.12", conectores 1/8", 1/8x1/16, 1/16", tanque de oxígeno medicinal INFRA, oxigenador de acrílico, trampa de aire, baño termorregulado, estuche de disección, tubos Eppendorf de 1 ml, reservorio del buffer y charola de disección adherida al sistema como se muestra en la **Figura 6**:

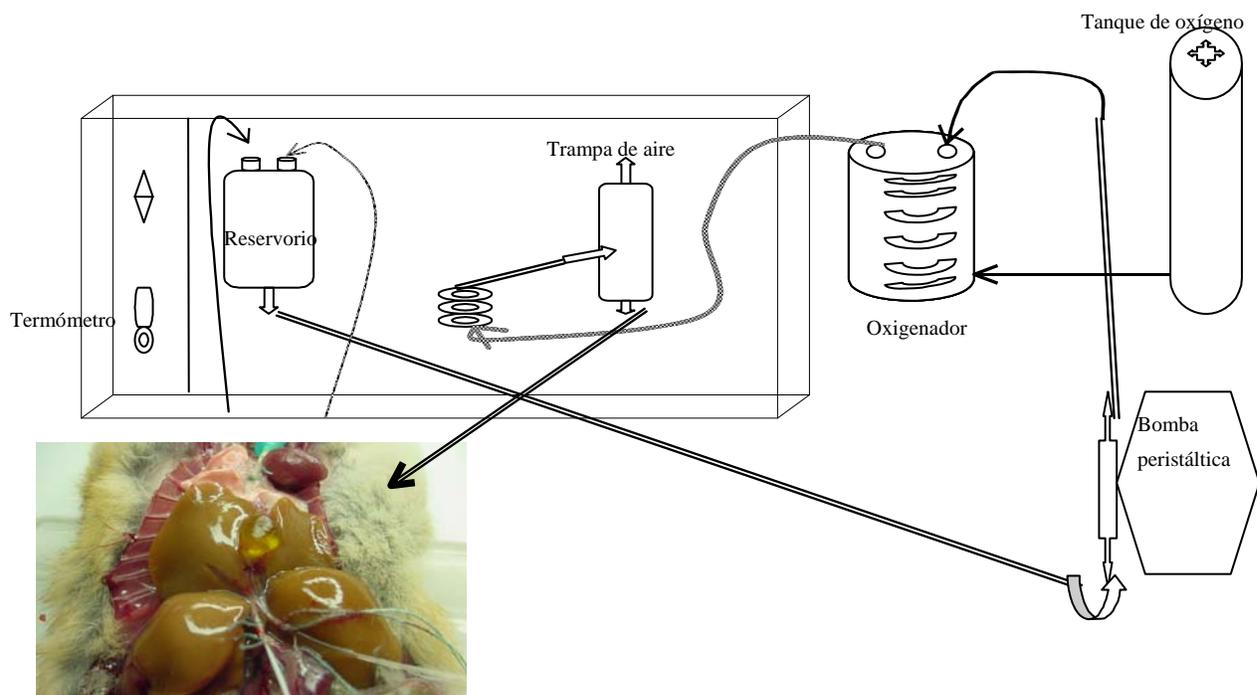


Figura 6. Esquema del sistema de perfusión

Debido a las dificultades iniciales para obtener un buen flujo biliar en los hígados perfundidos, se ensayaron diferentes métodos en busca de obtener o mejorar el flujo biliar. Se hizo un control positivo agregando al medio $30 \mu\text{M}$ de ácido taurocólico, teniendo un marcado incremento en el flujo biliar, el cual no se mantuvo más de 40 minutos. Sin embargo, se decidió utilizar el medio K-H sin ácidos biliares, para tener la secreción basal en ausencia de circulación enterohepática.

Por otro lado, para probar el efecto del extracto y del NDGA sobre la secreción biliar, fue necesario hacer diferentes pruebas de disolución para mantener ambos compuestos en suspensión. Puesto que son muy solubles en etanol y metanol, inicialmente se disolvieron en etanol para posteriormente llevarlos a una suspensión acuosa que pudiera ser suministrada en el medio de perfusión. Se ensayaron suspensiones con diferentes solventes, para después formar una suspensión acuosa por adición de agua. La mejor opción fue disolver el extracto o el NDGA en etanol, después agregar glicerol y posteriormente agregar esta mezcla al medio de perfusión.

La solubilización del extracto etanólico de *L. tridentata* y de NDGA se hizo disolviendo las sustancias de la siguiente manera:

NDGA (mg/dL)	Etanol		Glicerol		Extracto <i>L. tridentata</i>	Etanol		Glicerol	
	(μ l)	(μ l)	(μ l)	(μ l)	(mg/dL)	(μ l)	(μ l)	(μ l)	(μ l)
5	30	10			5	40			20
10	40	15			10	50			30
20	75	25			20	50			50
40	100	75			40	50			50
80	120	75			60	100			50
					80	125			50

Debido al método de solubilidad de los compuestos, se realizaron pruebas sobre el efecto del vehículo sobre la secreción biliar. Para esto se diluyó la mezcla de etanol-glicerol en 100 ml del medio de perfusión.

7.2. Efecto colestático sobre la secreción biliar del hámster.

Los hámsteres que se emplearon fueron pesados y anestesiados con pentobarbital (6 mg/100 g de peso corporal, i.p.). El método de perfusión de hígado fue recirculado, basado en Seglen (1976). Previamente a la perfusión hepática, a través de una incisión ventral de aproximadamente 1 cm se ligó el conducto cístico y se colocó en el colédoco una cánula de polietileno PE-10 (Clay Adams, Parsippany, NJ, USA). Inmediatamente después se realizó la perfusión del hígado *in vivo* e *in situ* como sigue: se abrió el animal ventralmente, y se colocaron 2 ligaduras sujetando la vena porta, sin interrumpir el flujo sanguíneo; se insertó un catéter (24x 3/4" Termo Surflo I.V.) en la vena porta, se sujetó con las ligaduras y se inyectó 0.1 ml de heparina sódica (75 U/ml, Hycel de México, S.A. de C. V.) en la parte posterior de la cava inferior. En seguida se conectó el catéter a la línea de perfusión, ya regulada a temperatura de 37 °C, oxigenada (O₂ medicinal, INFRA) y a un flujo de entre 3 y 3.5 ml/min/g de hígado. Ajustado de acuerdo al cálculo del peso corporal del animal, considerando que el peso del hígado en un animal de 100 g en promedio es de 3.4 g. Comenzando la perfusión, la vena cava inferior se cortó en su parte posterior para permitir el flujo del medio de perfusión y se arregló el sistema para recircular el medio a través del hígado, abriendo la caja torácica, se hizo una incisión en la aurícula y mediante dos ligaduras se conectó una cánula para recircular el medio al reservorio, en seguida se cerró el flujo hacia la parte posterior de la vena cava con una ligadura colocada por encima de los riñones. Se colectaron muestras de bilis cada 10 min durante 90 min en tubos de polietileno de 500 μ l previamente pesados, los cuales se mantuvieron en hielo y se guardaron para su posterior análisis. Se determinó flujo biliar gravimétricamente.

Después de 30 min de perfusión con el medio Krebs-Henseleit, se inició la perfusión con medio adicionado del componente a probar a una determinada concentración, sin interrumpir el flujo. Al cabo de 10 min se

volvió a perfundir el medio solo, para determinar si el efecto era reversible. Se colectaron muestras de bilis cada 10 min por 90 min, en tubos de polipropileno de 0.5 ml previamente pesados.

El cálculo del porcentaje de reducción sobre la secreción biliar, se obtuvo mediante el cálculo de la pendiente de la curva durante el tratamiento completo, es decir, al principio de la perfusión, durante el tratamiento (NDGA o extracto de *L. tridentata*) y posterior a este, restando entonces la pendiente del tratamiento a la pendiente inicial.

Inmediatamente después de terminar la recolección de bilis, todos los animales aún bajo anestesia se sacrificaron por dislocación cervical y se realizaron inmediatamente las necropsias parciales (tórax, abdomen, ciego), examinándose la vesícula biliar y su contenido con microscopio estereoscópico (Zeiss, West Germany) para determinar la presencia de cálculos o cristales de colesterol. El hígado se disectó y se registraron los pesos en una balanza analítica Mettler A30.

Las concentraciones del extracto de *L. tridentata* fueron 5, 10, 20, 40, y 80 mg dL⁻¹, y de NDGA fueron 5, 10, 20 40 y 80 mg dL⁻¹ (165, 330, 660, 1320, y 2640 μM). Por cada concentración se perfundieron 4 o 5 hígados. Se estableció la dosis colestática 50 (EC₅₀) por método gráfico.

7.3 Efecto sobre el perfil de ácidos biliares de hígados perfundidos de hámster y sobre la composición de lípidos biliares de hámsteres con dieta litogénica

Se realizaron ensayos para determinar el efecto de diferentes dosis del extracto alcohólico de *L. tridentata* y de NDGA sobre la composición biliar y el perfil de ácidos biliares de hígados perfundidos de hámster. Se emplearon animales alimentados con purina o con dieta litogénica y tratados con concentraciones inferiores a la EC₅₀ de NDGA y *L. tridentata*.

7.4 Análisis de lípidos biliares

La muestra de bilis (15 a 30 μl) fue adicionada a una mezcla de cloroformo:metanol, 2:1 (1.8 ml). Se agitó en vórtex por 1 minuto. Después se agregaron 0.370 ml de solución salina al 1%, se agitó nuevamente y se centrifugó por 2 min a 3000 rpm. Se colectó la fase acuosa y de ahí se concentraron los ácidos biliares por extracción de fase sólida con cartuchos de C18. Los ácidos biliares en metanol se separaron por TLC, se corrieron junto con estándares en placas de sílica gel 60 de 10x20 cm. El sistema de corrimiento de TLC fue cloroformo:isopropanol:ácido acético:agua (30:30:4:1). La columna de estándares se reveló con ácido fosfomolibdico y las correspondientes áreas en las muestras se rasparon de la placa y se determinaron las concentraciones de ácidos biliares enzimáticamente.

La fase clorofórmica se evaporó y se determinó colesterol por método de CHOD-PAP empleando un juego de reactivos de Human.

Las concentraciones de ácidos biliares se determinaron por método enzimático (Turley y Diestchy, 1978) como sigue: 500 µl de Buffer TrisEDTA, mas 330 µl de sulfato de hidrazina mas 100 µl de NAD mas 20 µl de la muestra de bilis hepática mas 35 µl de enzima 3alfaHSD o bien, 35µl de bufer de fosfatos a los blancos. Se hizo la lectura de absorbancia a 340 nm en espectrofotómetro con luz UV.

Se empleó la dieta experimental de Dam, adicionada de 0.125% de extracto etanólico de *L. tridentata*, administrada durante tres semanas previo a la perfusión hepática, se utilizó la infusión de *L. tridentata* preparada como se indicó en el punto 6.1.5. Se midió el consumo de alimento y agua o té en los grupos diseñados para estudiar el efecto del té y las dietas experimentales.

7.5 Efecto sobre la cantidad y el perfil de ácidos biliares fecales.

Se realizó el análisis de ácidos biliares fecales totales y el perfil de ácidos biliares fecales por TLC de animales alimentados durante 3 semanas con las siguientes dietas: Grupo 1, Purina pulverizada; Grupo 2, dieta litogénica (DL); Grupo 3, DL más infusión de *L. tridentata ad libitum*; Grupo 4, DL adicionada al 0.125% de extracto de *L. tridentata*.

Se recolectaron muestras de heces de 24 h durante 5 días de todos los animales, en la última semana de administración de las dietas experimentales. Las muestras se secaron en estufa hasta obtener peso constante y almacenadas para la extracción y análisis del contenido de ácidos biliares secundarios. Al término del periodo experimental, los animales fueron sacrificados por una sobredosis de anestesia con pentobarbital. Se les disectó y pesó el hígado, el intestino grueso y el ciego, y se examinó la vesícula biliar para determinar la presencia de cálculos.

7.6 Extracción de ácidos biliares fecales (Czubayko et al, 1991).

Se extrajeron esteroides neutros y esteroides ácidos de la siguiente manera: 100 mg de heces se homogenizaron con 100 µl de agua, y se adicionaron de 2 ml 1N NaOH en etanol al 90% a 67°C por 1h. Se agregó 1 ml agua y se extrajeron los esteroides neutros con ciclohexano (2 ml x3). A la fase acuosa se agregó 2 ml de 10 N NaOH acuoso, calentando 3hr a 120°C. Luego se adicionó 1 ml agua, se enfrió y se llevó a pH 1.5 con ácido clorhídrico al 25%, finalmente se extrajeron los esteroides ácidos con éter etílico (2 ml x3).

7.7 Determinación de ácidos biliares fecales (Major et al, 1980).

Los esteroides ácidos fueron resuspendidos en 200 µl de metanol y en una alícuota se determinaron ácidos biliares enzimáticamente. Se corrieron muestras de los extractos de esteroides ácidos, junto con

estándares de los ácidos biliares cólico, quenodesoxicólico, desoxicólico y litocólico (Sigma), en placas de TLC de sílicagel 60 de 20x20 (espesor 0.25 mm). La fase móvil fue hexano: metiletilcetona: ácido acético glacial (56:36:8). Las placas se revelaron asperjando la columna de estándares con ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldehído (50:1:0.5), y calentando la placa a 120°C x 5 min. Las bandas correspondientes a cada estándar en las columnas de muestras se rasparon y se determinó la concentración de ácido biliar enzimáticamente como se señaló arriba.

7.8 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar. El análisis estadístico de los datos se realizó por análisis de varianza de una vía, seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni y con Prueba de t de Student pareada. Los valores fueron considerados estadísticamente significativos con una $P < 0.05$.

VIII. RESULTADOS

8.1 Efecto directo hepático del extracto de *L. tridentata*

8.1.1 Perfusiones preliminares y efecto del vehículo.

Los resultados de la fase experimental en la que se probó el efecto del extracto etanólico de *L. tridentata* y del NDGA sobre el hígado son los siguientes. Inicialmente se estandarizó el método de perfusión, se utilizó como medio la solución Krebs Henseleit (K-H) adicionada con 2% de glucosa anhidra y 1% de albúmina bovina, con lo cual se logró una buena secreción biliar por un tiempo prolongado (mínimo 60 min).

Se realizaron perfusiones por 10 min con el medio K-H adicionado del vehículo del extracto de la planta y del NDGA, que constaba de 100 μ l de etanol y 50 μ l de glicerol, para comprobar que el vehículo por sí mismo no tuviera algún efecto sobre la secreción biliar, como lo muestra la **Figura 7**.

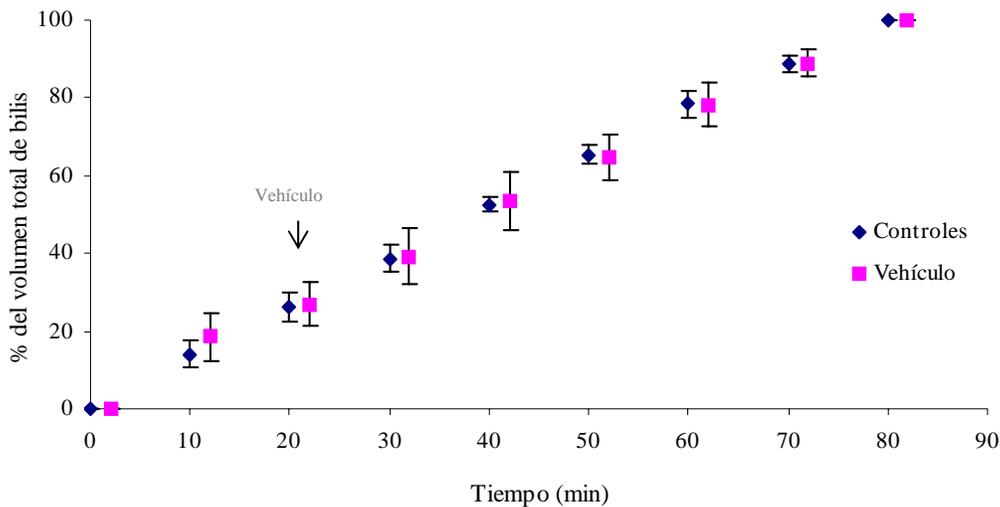


Figura 7. Secreción porcentual biliar acumulativa en hígados de hámsteres perfundidos por 90 minutos. Controles: perfundido solo con K-H durante todo el período; vehículo: perfundido con K-H sólo y con K-H adicionado del vehículo del extracto de *L. tridentata* y del NDGA, por 10 min. (entre los 20 a 30 min). Los datos del vehículo se desplazaron 2 min para no encimar los valores con el control. Los valores son media \pm D.S. (n=5).

8.1.2. Efecto colestático del extracto de *L. tridentata* y del NDGA

Los resultados del efecto tóxico sobre el hígado, expresado como colestásis, por perfundir durante 10 min diferentes concentraciones del extracto etanólico de *L. tridentata* y del NDGA, se presentan en la Tabla 1.

Se presentan los datos del porcentaje de reducción del flujo biliar de hígados de animales alimentados con purina. Los hígados perfundidos con diferentes concentraciones de extracto etanólico de *L. tridentata*, presentaron una reducción del flujo biliar gradual, conforme se incrementó la concentración del extracto, se puede notar también que en las concentraciones intermedios (20 y 40 mg), existe poco aumento en la respuesta.

Tabla 1. Efecto de diferentes concentraciones de *L. tridentata* y NDGA perfundidos en el hígado durante 10 min sobre la reducción del flujo biliar*

Tratamiento	Concentraciones perfundidas (mg dl ⁻¹)				
	5	10	20	40	80
Extracto EtOH de <i>L. tridentata</i>	10.1 ± 0.8	25.8 ± 10.8	46.7 ± 20.0	53.2 ± 10.8	98.9 ± 0.7
n	4	4	4	5	2
NDGA	28.8 ± 20.9	35.5 ± 21.6	40.0 ± 21.9	69.1 ± 22.2	92.5 ± 0.4
n	4	3	5	5	4

*Los datos se expresan como media ± D.S.

El tratamiento con diferentes concentraciones de NDGA produjo un efecto colestático mayor en las concentraciones de 5, 10 y 40 mg dl⁻¹ (165, 330, 1320µM), respecto al extracto de la planta.

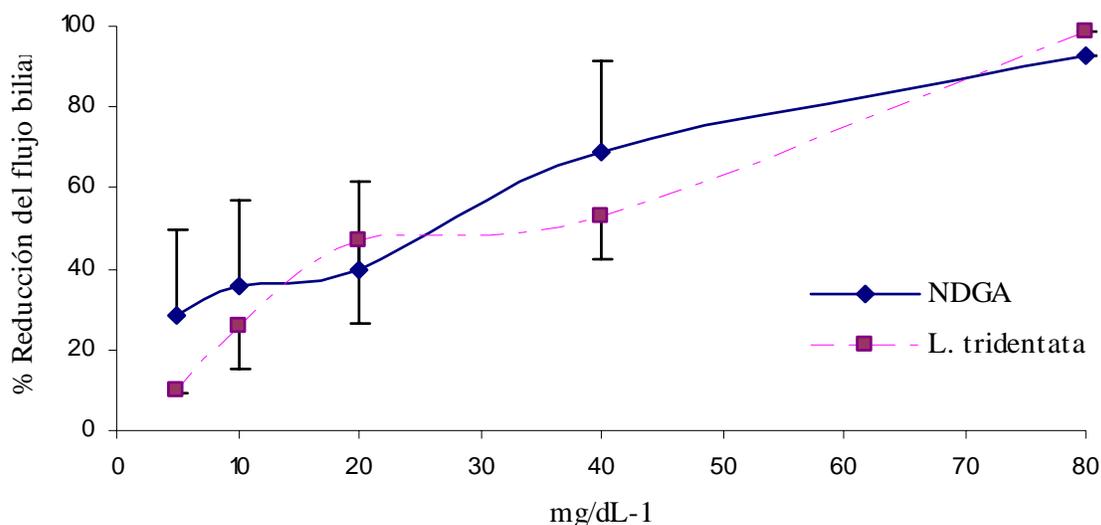


Figura 8. Efecto colestático del extracto etanólico de *L. tridentata* y del NDGA en hígado perfundido de hámsters. Posterior a un período estable de 20 min., el hígado se perfundió con el medio KH conteniendo el extracto etanólico o el NDGA por 10 min. El efecto sobre la secreción biliar fue determinado gravimétricamente. Los datos se expresan como media \pm D.S.

Con los datos obtenidos se calcularon las concentraciones efectivas 50 del efecto colestático (EC_{50}) por el método gráfico (**Figura 8**). Para el extracto de *L. tridentata* se obtuvo un valor de 34 mg dl^{-1} , mientras que para el NDGA fue de 28 mg dl^{-1} ($926 \mu\text{M}$). El efecto colestático fue reversible, excepto en algunas preparaciones con 40 mg dl^{-1} y en todas las de 80 mg dl^{-1} .

8.2. Efecto sobre la secreción biliar del extracto de *L. tridentata* y de NDGA en hígados perfundidos de hámsters alimentados con dieta litogénica.

8.2.1 Efecto sobre el flujo biliar.

Puesto que se ha demostrado que el extracto de *L. tridentata* previene la litiasis de colesterol en el hámster, en esta sección se ensayó el efecto de una dosis de 10 mg dL^{-1} del extracto etanólico de la planta y del NDGA ($330 \mu\text{M}$), que están por debajo de las EC_{50} , tanto sobre el flujo biliar como en la composición de la bilis de hámsters alimentados con dieta litogénica por 3 semanas, comparándose con el efecto en el hígado de animales alimentados con dieta de mantenimiento (Nutricubos Purina).

Respecto al flujo biliar, en todos los grupos se observó una colestásis menor o cercana a la producida por la EC₅₀. La concentración ensayada del extracto de *L. tridentata* y de NDGA sobre hígados de animales que recibieron la dieta litogénica por 3 semanas, tuvieron una tendencia a una menor reducción en el flujo biliar, i.e. menor colestasis, que los que recibieron purina (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto colestático de *L. tridentata* y NDGA sobre hígados perfundidos de animales alimentados con purina o con dieta litogénica., expresado como porcentaje de reducción del flujo biliar.*

Dietas	Tratamiento (10mg dl ⁻¹ 10min ⁻¹)	% Reducción del flujo biliar
Purina	Exto. EtOH de <i>L. tridentata</i> n	37.7 ± 16.5 ^{ab} 4
Dieta Litogénica	Exto. EtOH de <i>L. tridentata</i> n	11.8 ± 11.9 ^b 4
Purina	NDGA n	48.7 ± 16.4 ^a 4
Dieta Litogénica	NDGA n	21.3 ± 4.5 ^{ab} 4

*Los valores se expresan como media ± DS. Diferente letra en la columna indica P<0.05.

8.2.2 Efecto sobre la composición de lípidos biliares

La Tabla 3 muestra datos de la concentración de colesterol antes de la perfusión con *L. tridentata* o NDGA. Se observa que el valor para el grupo alimentado con purina y con dieta litogénica adicionada con 0.125% del extracto de la planta, administrada por tres semanas, presenta prácticamente el mismo nivel de colesterol, lo que indica un efecto crónico del extracto sobre la composición de la bilis. Por otro lado la concentración de ácidos biliares totales es mayor en el grupo de animales alimentados sólo con purina antes del tratamiento.

Tabla 3. Lípidos biliares en bilis de hígados perfundidos en períodos previos a la adición de los compuestos de prueba.*

Dietas*	Colesterol (mM)	Acidos biliares totales (mM)
Purina	0.28 ± 0.04 ^{ab} 4	6.77 ± 2.32 ^a 4
Dieta Litogénica	0.43 ± 0.13 ^a 4	2.28 ± 1.42 ^b 4
DL + 0.125% Exto EtOH <i>L. tridentata</i>	0.25 ± 0.03 ^b 4	1.68 ± 0.48 ^b 4

*Administradas durante 3 semanas. Los valores se expresan como media \pm D.S.
Diferente superíndice indica $P < 0.05$.

La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos sobre la composición biliar de los mismos hígados después de recibir los tratamientos que se señalan en cada caso.

Tabla 4. Efecto de diferentes tratamientos sobre la concentración de lípidos biliares, expresado como porcentaje respecto a la concentración del período previo al tratamiento. Los compuestos (10 mg dL⁻¹) se perfundieron por 10 min.*

Dieta	Tratamiento	Porcentaje de lípidos biliares	
		Colesterol	Acidos Biliares Totales
Purina	Vehículo	99.5 \pm 9.7	86.0 \pm 19.9
		4	4
Purina	Exto EtOH <i>L. tridentata</i>	83.0 \pm 7.0	89.0 \pm 23.8
		4	4
Purina	NDGA	89.0 \pm 10.9	82.6 \pm 26.0
		4	4
Dieta Litogénica	Vehículo	101.4 \pm 7.0	93.7 \pm 17.4
		4	4
Dieta Litogénica	10 mg Exto EtOH <i>L. tridentata</i>	60.6 \pm 8.7 ^a	189.0 \pm 38.3 ^a
		4	4
Dieta Litogénica	10 mg NDGA	53.1 \pm 17.9 ^a	137.6 \pm 28.6 ^a
		4	4
DL + 0.125% Exto <i>L. tridentata</i>	Vehículo	96.8 \pm 6.0	76.2 \pm 22.3
		4	4

*Los valores son expresados como media \pm D.S. ^a $P < 0.05$ vs vehículo con la misma dieta.

Los hígados de animales que se alimentaron con purina no mostraron un cambio significativo ni en el colesterol ni en los ácidos biliares por el tratamiento con los compuestos de prueba. En los hígados de animales que recibieron la dieta litogénica se encontró una reducción significativa en el colesterol biliar entre los grupos perfundidos con extracto de *L. tridentata* y con NDGA respecto al que solo se les perfundió el vehículo. En estos mismos grupos, la cantidad de ácidos biliares totales se incrementó significativamente, especialmente en los perfundidos con extracto de *L. tridentata*.

8.2.3 Efecto sobre el perfil de ácidos biliares

Se encontró que en los hígados de animales alimentados con purina, solo el extracto etanólico de *L. tridentata* produjo una tendencia a disminuir la proporción del ácido cólico, así como a incrementar la del ácido quenodesoxicólico, sin embargo, estos efectos no alcanzaron a ser significativos (Tabla 5). En los hígados de animales previamente alimentados con la dieta litogénica durante tres semanas, al ser perfundidos con extracto de *L. tridentata* mostraron una significativa reducción del ácido cólico y un aumento del

quenodesoxicólico, mientras que el NDGA tendió hacia el mismo efecto, pero no alcanzó significancia estadística. Por otro lado, los hígados de animales con dieta litogénica y 0.125% de extracto de *L. tridentata* mostraron una proporción de quenodesoxicólico solo ligera y no significativamente mayor que los que recibieron solo la dieta litogénica y se perfundieron con vehículo.

Tabla 5. Porcentaje de ácidos biliares primarios después de perfundir el hígado con extracto de *L. tridentata* o NDGA por 10 min a la concentración de 10 mg dL⁻¹.*

Porcentaje del perfil de ácidos biliares					
Dieta	Tratamiento	Previo	Posterior	Previo	Posterior
		Cólico	Cólico	Quenodesoxi cólico	Quenodesoxi cólico
Purina	Vehículo	61.1 ± 14.8	61.7 ± 17.8	38.9 ± 14.8	38.3 ± 17.8
		4	4	4	4
Purina	10 mg Exto EtOH <i>L.</i> <i>tridentata</i>	58.2 ± 18.3	48.2 ± 19.1	21.8 ± 19.5	31.8 ± 19.1
		4	4	4	4
Purina	10 mg NDGA	66.7 ± 10.7	65.0 ± 4.4	33.3 ± 10.7	34.9 ± 4.4
D Litogénica	Vehículo	53.8 ± 7.9	56.0 ± 5.0	45.6 ± 6.9	44.8 ± 6.1
		4	4	4	4
D Litogénica	10 mg Exto EtOH <i>L.</i> <i>tridentata</i>	59.2 ± 16.7	36.9 ± 3.4 ^a	40.8 ± 16.7	63.1 ± 3.4 ^a
		4	4	4	4
D Litogénica	10 mg NDGA	68.7 ± 12.1	60.3 ± 17.4	31.3 ± 14.2	39.7 ± 17.4
DL + 0.125% Exto EtOH <i>L. tridentata</i>	Vehículo	49.6 ± 10.9	43.2 ± 21.5	50.1 ± 11.6	56.8 ± 21.6
		4	4	4	4

*Los valores son expresados como media ± D.S. ^a indica P<0.05 vs proporción del ácido biliar previo al tratamiento.

Los ácidos biliares cólico y quenodesoxicólico entran en la circulación enterohepática y como se sabe, de ellos depende la solubilización del colesterol, especialmente del quenodesoxicolato, mientras que desoxicolato, proveniente del colato incrementa la secreción de colesterol. Por lo que se considera una bilis menos litogénica.

8.3 Efecto del té de *L. tridentata* suministrado por 3 semanas sobre la secreción biliar del hámster alimentado durante el mismo periodo con dieta litogénica

Respecto al efecto de la infusión de *L. tridentata* suministrada como agua *ad libitum* por 3 semanas, se encontró que no reduce significativamente la concentración de colesterol ni el porcentaje molar de colesterol respecto al grupo que también consumió dieta litogénica, sin embargo, hay una ligera reducción de éstos parámetros cuando beben el té, esto pudo resultar en la formación de una bilis menos litogénica, lo cual explicaría la ausencia de cálculos biliares (Tabla 6). Se observó también en la necropsia que el tamaño del ciego fue significativamente mayor en ese mismo grupo.

Tabla 6. Efecto del té de *L. tridentata* sobre lípidos biliares.*

Dieta	Flujo biliar µl/m/gHíg	Colesterol mM	Sales bilíares mM	Fosfolípidos mM	% Molar Colesterol	Cálculos	Ciego g
Purina + Agua	2,5 ± 0,8	0.3 ± 0,1 ^a	10,3 ± 0,8	2,2 ± 0,5	2,2 ± 0,3 ^a	0/6	2,6 ± 0,3 ^{a,b}
D L + Agua	2,9 ± 0,5	0,8 ± 0,0 ^b	8,1 ± 1,9	1,7 ± 0,5	7,6 ± 2,4 ^b	5/6	1,5 ± 0,3 ^a
D L + Té <i>L. tridentata</i>	3.0 ± 0,3	0,6 ± 0,3 ^b	8,7 ± 1,4	2,1 ± 0,5	5,2 ± 1,7 ^b	0/6	3,0 ± 0,9 ^b

*Los valores son expresados como media ± D.S. Diferente superíndice indica P<0.05. n=6.

Por otra parte, para verificar que los animales consumieran la dieta y bebieran la infusión de *L. tridentata* se realizaron mediciones del consumo de la dieta, del agua y la infusión durante el tratamiento, se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Mediciones del consumo de dieta y agua o té de *L. tridentata*.*

Dieta*	Consumo Dieta (g/animal)	Consumo Té/Agua (ml/animal)
Purina + Agua	7.1 ± 1.8 ^a	7.5 ± 1.2
D L + Agua	5.2 ± 0.1 ^b	5.9 ± 2.33
D L + Té <i>L. tridentata</i>	5.1 ± 0.1 ^b	4.8 ± 1.75

*Administrados durante 3 semanas. Los valores son expresados como media ± D.S. Diferente superíndice indica P<0.05. n=6.

Al parecer la dieta litogénica induce menor consumo respecto a purina, que es su dieta básica. Se encontró un menor consumo del té, sin embargo, la diferencia no es significativa.

8.4 Efecto sobre la cantidad y el perfil de ácidos biliares fecales

Finalmente, se realizó el análisis de ácidos biliares fecales totales y el perfil de ácidos biliares fecales por cromatografía en capa fina de animales alimentados con purina, dieta litogénica (DL), DL más infusión de *L. tridentata ad libitum* o con DL + 0.125% del extracto de la planta, obteniendo los siguientes resultados.

En la Tabla 8, se presenta la frecuencia de colelitiasis en los diferentes grupos, observándose que la dieta litogénica produjo cálculos en el 100% de los animales, mientras que sólo uno de los animales que tomó el té los presentó, y ninguno de los que recibieron el extracto de *L. tridentata*.

Tabla 8. Concentración de ácidos biliares totales, peso del ciego y colelitiasis.*

Dieta	Ácidos biliares (nmoles /g heces)	Peso del ciego (mg)	Frecuencia de cálculos
Purina + agua	1130 ± 100 ^a	2.6 ± 0.3 ^a	0/4
D L + agua	270 ± 94 ^b	1.5 ± 0.3 ^b	4/4
DL + Té <i>L. tridentata</i>	141 ± 47 ^b	3.3 ± 0.6 ^{a,c}	1/4
DL + 0.125% Exto <i>L. tridentata</i> + agua	154 ± 42 ^b	4.4 ± 0.5 ^d	0/4

*Los valores son expresados como media ± D.S. Diferente letra indica P <0,05, n=4.

El tamaño del ciego de los animales que recibieron el té y el extracto se ve aumentado aproximadamente al doble que en los animales que sólo recibieron la dieta litogénica, quizás por el efecto antibiótico de *L. tridentata*.

Por otro lado, en los análisis de ácidos biliares fecales expresados en nanomoles de ácidos biliares por gramo de heces, se observa que en el grupo control alimentado con purina, presentó el valor más elevado, puesto que esta dieta contiene más fibra, respecto a los grupos de dieta litogénica que sólo contienen 8% de celulosa. En los grupos tratados con *L. tridentata*, tanto en té como en extracto, hay una menor cantidad de ácidos biliares fecales, aunque la diferencia no alcanzó a ser estadísticamente significativa, respecto del grupo con la misma dieta litogénica sola.

Tabla 9. Porcentaje de ácidos biliares fecales.*

Dieta	Cólico	Quenodesoxicólico	Desoxicólico	Litocólico
Purina + agua	9.2 ± 1.6 ^a	21.8 ± 4.6 ^{ac}	46.5 ± 16.0	22.5 ± 12.6
D L + agua	10.1 ± 7.0 ^a	11.6 ± 7.3 ^a	53.0 ± 20.0	25.2 ± 16.5
DL + Té <i>L. tridentata</i>	29.7 ± 6.5 ^b	25.6 ± 4.5 ^{bc}	23.4 ± 9.0	21.3 ± 1.0
DL + Exto <i>L. tridentata</i> + agua	13.7 ± 9.4 ^a	36.5 ± 6.2 ^b	22.5 ± 11.5	27.3 ± 10.8

*Los valores se expresan como media ± D.S. Diferente letra en la misma columna indica P < 0.05, n=4.

En la Tabla 9 se muestran los resultados sobre el perfil de ácidos biliares fecales. Se observa un incremento significativo del ácido quenodesoxicólico en los grupos tratados con *L. tridentata*, tanto en té como en extracto, mientras que la proporción de ácido litocólico se mantiene prácticamente igual. Por otro lado se observa un decremento en la proporción de desoxicolato en esos mismos grupos, respecto al control de purina y DL sola, aunque no alcanzó a ser estadísticamente significativo.

Tabla 10. Porcentajes de ácidos biliares Primarios contra Secundarios.*

Dieta	Cólico + Quenodesoxicólico	Desoxicólico + Litocólico
Purina + agua	31.0 ± 3.6 ^{ac}	69.0 ± 3.6 ^{ac}
D L + agua	21.8 ± 13.4 ^a	78.2 ± 13.4 ^a
DL + Té <i>L. tridentata</i>	57.1 ± 11.0 ^b	42.9 ± 11.0 ^b
DL + Exto <i>L. tridentata</i> + agua	50.2 ± 12.0 ^{bc}	49.8 ± 12.0 ^{bc}

*Los valores son media ± D.S. Diferente letra indica P < 0.05, n=4.

En la proporción de ácidos biliares primarios y secundarios en las heces, se observa un incremento significativo de los ácidos biliares primarios, así como un decremento de los secundarios con el tratamiento de *L. tridentata* en forma de infusión o extracto adicionado a la dieta (Tabla 10). Esto sugiere una menor capacidad de deshidroxilación intestinal de los ácidos biliares por la microbiota del intestino debido al efecto antibiótico.

IX DISCUSIÓN

La colelitiasis es una de las enfermedades gastrointestinales más frecuentes, con una importante carga para los sistemas de salud, la cual se incrementa en edades avanzadas de poblaciones en riesgo (Marschall y Einarsson, 2007). Por otra parte, la medicina tradicional en México es una práctica ancestral que utiliza derivados, preparaciones e infusiones de plantas, que se siguen utilizando, por lo menos en parte, debido a la falta de recursos en la atención médica (Hersch-Martínez, 1995). Sin embargo, también se ha reconocido la hepatotoxicidad de medicinas herbales debido al autoconsumo de productos herbales comúnmente considerados como seguros y efectivos, pero que carecen de regulación (Pak, et al, 2004).

El hígado, ubicado entre la superficie absorptiva del tracto intestinal y la distribución sistémica, es el primer destino de fármacos que ingresan por vía oral, por lo que también es un importante blanco de su toxicidad, que pueden causar daño a los hepatocitos, a las células de los ductos biliares y generar colestasis (Jaeschke et al, 2002). Más del 75% de casos de reacciones idiosincráticas a drogas resultan en trasplante hepático o muerte (Lee, 2003). Aunque es controversial *L. tridentata* se emplea para una variedad de padecimientos (Arteaga et al, 2005), sin embargo, produce toxicidad renal y hepática, en el último caso el daño consta de hepatitis aguda, necrosis hepática subaguda, hepatitis colestática y falla hepática aguda (Chitturi y Farrel, 2000; Brent 1999).

En ensayos previos realizados en este laboratorio con *L. tridentata* se encontró un efecto preventivo de la colelitiasis. Sin embargo, se desconocía su modo de acción y la posibilidad de otros efectos no benéficos. Así se continuó indagando en la posibilidad de un uso terapéutico del extracto etanólico de *L. tridentata* y su principal metabolito, realizando ensayos para establecer inicialmente el efecto directo sobre la secreción biliar, mediante la perfusión hepática.

El empleo de éste modelo *in vitro e in situ*, permitió evaluar el efecto agudo del extracto y el NDGA sobre la secreción biliar. Inicialmente se estandarizó el método de perfusión hepática con recirculación, (Seglen, 1976; Cheung et al, 1996), hasta lograr una secreción biliar mayor y por un tiempo más prolongado.

Efecto colestático sobre la secreción biliar del hámster

En la primera fase experimental los resultados indican que efectivamente en el hígado perfundido hay un efecto colestático cuando se aplica un tratamiento agudo con el extracto etanólico de *L. tridentata*, o bien, con el NDGA, existiendo una relación dosis-respuesta, lo cual confirma su hepatotoxicidad (Sheik et al, 1997). Se estableció que bajo las condiciones estudiadas, la EC₅₀, para el extracto etanólico de *L. tridentata*

fue de 34 mg dL⁻¹ y para el NDGA de 28 mg dL⁻¹. A bajas concentraciones (5 a 40 mg dL⁻¹) el efecto es reversible. Puesto que el efecto en las curvas dosis respuesta es muy similar, y más acentuado en el caso del metabolito solo, al parecer el efecto colestático de *L. tridentata* es debido a NDGA, y quizás a los otros lignanos relacionados y presentes en el extracto. Este efecto colestático reversible se ha observado también en duplas de hepatocitos de rata con el extracto de la planta a concentraciones de 2 a 12µg/ml (Cárdenas et al, 2000), lo cual apoya estos resultados. Sin embargo, no se puede descartar que puede haber otros compuestos que también participen.

Un posible mecanismo por el que se produce la colestásis puede estar relacionado con la alteración en el transporte vesicular intracelular que provoca NDGA a una concentración de 25µM (Drecktrah et al, 1998) y 100µM (Ramoner et al, 1998). También se ha observado la disgregación del aparato de Golgi con 30µM de NDGA (Fujiwara et al, 1998). Esto sería similar al mecanismo de acción del taurolitocolato, que induce daño selectivo de la membrana canalicular, aumentando la rigidez de la membrana, perdiendo el microvilli, e impidiendo el movimiento transcelular de vesículas, así como también la fusión de vesículas al polo apical. Además impide la secreción de aniones orgánicos debido a un descenso en la densidad de MDR2 en la membrana canalicular, lo que conduce a colestasis y daño hepatocelular (Kullak-Ublick, 2000).

No se pueden descartar sin embargo inhibiciones directas en los transportadores canaliculares, ya sea de colesterol ABCG5/8, ácidos biliares ABC11 (BSEP) o fosfolípidos MDR2 (Marschall y Einarsson, 2007; Hoffman, 2007).

Efecto sobre la secreción biliar del extracto de *L. tridentata* y de NDGA en hígados perfundidos de hámsteres alimentados con dieta litogénica.

La dieta litogénica para cálculos de colesterol, que es sin grasas y alta en azúcares refinados, provoca un incremento en la síntesis y secreción de colesterol. El hígado de animales con esta dieta es microscópicamente normal, pero histológicamente muestra esteatosis. Los hígados de animales que recibieron esta dieta por 3 semanas, parecen ser menos susceptibles a la colestasis inducida por *L. tridentata* y por NDGA (Tabla 2). La probable alteración en la fluidez de membranas por el exceso de colesterol y/o el cúmulo de grasa podrían ser la causa de esta tendencia.

Efecto sobre la composición de lípidos biliares

Respecto a los lípidos biliares de hígados perfundidos anteriores a los tratamientos (Tabla 3) podemos señalar que la adición del extracto de la planta a la dieta litogénica al nivel de 0.125%, administrado durante tres semanas, reduce el colesterol biliar a concentraciones similares a las de los alimentados con purina, reflejando un efecto producido por la administración continua del extracto sobre la composición de la bilis.

Sin embargo, no cambia los ácidos biliares totales, lo que indica que la síntesis y secreción de ácidos biliares totales no se afecta crónicamente.

Los tratamientos con *L. tridentata* y NDGA de los hígados perfundidos de animales que recibieron dietas diferentes, indican que en los que reciben purina no hay un efecto agudo sobre los lípidos biliares analizados. Los que reciben la dieta litogénica sí exhiben un efecto agudo, con una reducción del colesterol y un incremento en sales biliares (Tabla 4), lo que podría conducir a una bilis menos litogénica. Sin embargo, falta analizar lo que ocurre con los fosfolípidos, que no pudieron ser analizados por el reducido volumen de bilis de que se disponía. El incremento en la concentración de sales biliares pudiera deberse a que la colestasis inducida afecte mayormente a la fracción independiente de sales biliares, provocando así su mayor concentración. La reducción en el colesterol podría explicarse por la inhibición en el tránsito intracelular de vesículas, que es como el colesterol llega al canalículo.

En relación al perfil de ácidos biliares primarios (Tabla 5), con el tratamiento del extracto de la planta, el ácido quenodesoxicólico tendió a incrementarse y el colato a disminuir, aunque solo alcanzó una diferencia significativa en los animales alimentados con dieta litogénica. Como se sabe este perfil produce una menor litogenicidad biliar (Hofman, 2007). El NDGA solo mostró ligeramente esta tendencia con la dieta litogénica, lo que aunado con una menor incremento en los ácidos biliares totales sugiere que en el extracto de *L. tridentata* hay algo más que el NDGA que afecta la secreción de lípidos biliares. Esto podría deberse a otro grupo de compuestos o a diferencias farmacológicas con alguno de los otros lignanos. No obstante el NDGA si redujo el colesterol biliar, lo que podría relacionarse con su mayor efecto colestático.

Un mecanismo por el cual *L. tridentata* y NDGA afectan la secreción y el perfil de ácidos biliares puede estar relacionado con la disposición de las zonas que conforman el acino hepático, la periportal, y la centrolobulillar, las cuales difieren en su capacidad y velocidad para excretar ácidos biliares, y para procesar drogas (Baier et al, 2006). Algunos estudios sugieren que las células más cercanas a la vénula hepática (zona centrilobulillar) contribuyen predominantemente al metabolismo de fármacos vía el citocromo P-450, y son predominantemente alterados con estos (Erlinger et al, 1988). Esto puede tener relación con el efecto colestático de los compuestos probados, al tener un mayor efecto sobre los hepatocitos periportales que sobre los pericentrales, los cuales metabolizan los ácidos biliares de manera diferente (Baumgartner et al 2001).

Efecto del té de *L. tridentata* suministrado por 3 semanas sobre la secreción biliar del hámster alimentado durante el mismo periodo con dieta litogénica

El extracto etanólico es efectivo en reducir la incidencia de cálculos de colesterol en hámsters alimentados con una dieta litogénica. Sin embargo, puesto que en la medicina tradicional se emplea el té, también se administró *ad libitum* en sustitución de agua, encontrándose que previene la formación de cálculos

biliares. Aunque no reduce significativamente el porcentaje molar de colesterol, todos los cambios en lípidos biliares, incluyendo el aumento en fosfolípidos, tienden hacia una bilis menos litogénica. Se observó también en la necropsia que el tamaño del ciego fue significativamente mayor en ese mismo grupo, lo que indica alteraciones a nivel intestinal, muy probablemente la acción antibiótica de *L. tridentata*.

Modificaciones sobre la cantidad y el perfil de los ácidos biliares fecales

La secreción biliar depende en gran medida de la circulación enterohepática. La formación de la poza de ácidos biliares resulta de la conservación intestinal eficiente, mediada en gran parte por el sistema de transporte ileal de ácidos biliares conjugados (Hoffman, 2007).

La dieta litogénica *per se* produce una reducción en los ácidos biliares fecales, lo cual se debe al tipo y contenido de fibra, que provoca menor arrastre de los ácidos biliares y mayor tiempo de retención, que facilita su extracción del contenido intestinal.

El suministro de *L. tridentata* como té o extracto induce un incremento en el tamaño del ciego, y una reducción aún mayor que la producida por la dieta litogénica sola en los ácidos biliares fecales totales, lo cual se debe al conocido efecto antibiótico del extracto de la planta (Mabry y Bohnstedt, 1981; Argueta, 1994; Verastegui et al, 1996). En el perfil de ácidos biliares también se observa un aumento significativo del ácido quenodesoxicólico, tanto en los animales que bebieron el té como los que consumieron el extracto. Como consecuencia, las proporciones de ácidos biliares fecales primarios se incrementaron significativamente, así como también disminuyeron los secundarios con ambos tratamientos de *L. tridentata*, particularmente el ácido desoxicólico, el cual se ha asociado a una mayor secreción de colesterol, colelitiasis y tránsito intestinal lento (Dowling 2000; Thomas 2000).

Los resultados concuerdan con los estudios reportados en rata, en donde se observó que el tratamiento con antibióticos disminuye los microbios anaerobios fecales, reduciendo los ácidos biliares fecales totales. También se observó un decremento de ácidos biliares secundarios, mientras que los primarios se volvieron predominantes. Asimismo, el tamaño del ciego aumentó al doble de los animales sin tratamiento (Hashimoto, 1996), por lo que nuestros resultados indican que hay un efecto antibiótico de *L. tridentata*, el cual parece ser inclusive más fuerte con el té que con el extracto de la planta adicionado a la dieta.

Los resultados obtenidos en estudios con extractos etanólicos y clorofórmicos de *L. tridentata*, que inhibieron *Entamoeba histolytica* y *E. invadens in vitro*, sugieren que la polaridad de la molécula y la formación de ortoquinona está involucrada en su actividad antibiótica y antiparasitaria (Segura, 1978; Calzado-Flores et al, 1995). Se sabe que los lignanos son metabolizados a enterodiol y enterolactona por la flora intestinal y que el NDGA es convertido por la microflora intestinal a compuestos con actividad estrogénica *in vitro* e *in vivo* (Fujimoto et al, 2004).

Algunos otros aspectos que pueden analizarse para tener una información más completa es la determinación de los niveles sanguíneos de NDGA en hámsters con dieta litogénica y en humanos que consumen el té, lo cual podría ayudar a establecer claramente las dosis terapéutica y tóxica.

No debemos olvidar también que el extracto etanólico de *L. tridentata* contiene un gran número de otros metabolitos secundarios, como lignanos y flavonoides, que pudieran ser el principio activo, o bien ser parte de la actividad como sinergistas. Se ha informado que los flavonoides alteran procesos de transporte y secreción a nivel del intestino y del colon que podrían interferir con la circulación enterohepática de sales biliares, o que por sus propiedades antioxidantes o quelantes pudieran estar alterando la microbiota intestinal, además de que las agliconas flavonoides poseen una parte hidrofóbica que pueden formar micelas en el proceso del transporte transcelular y alterarlo (Manach et al, 2004).

Con base en la información presentada, los padecimientos como colelitiasis, colestasis y hepatotoxicidad (incluyendo como causa común la automedicación herbal) continúan representando un problema global de salud, y aunque hay variaciones en su epidemiología, se continúan reportando una importante prevalencia (Alderman, 1994; Sheik et al, 1997; Brent, 1999; Larrey, 2000; Chitturi y Farrel, 2000; Stickel et al, 2000; Pak et al, 2004). A pesar de que existen instituciones que intentan regular los productos herbales (DSHEA (Dietary Supplement Health and Education Act), FDA), algunas veces se emplean altas y/o prolongadas dosis de productos herbales, cuya identificación es dudosa o incluso es sustituida, o también hay alguna variación en las preparaciones de los ingredientes activos, resultando en efectos no benéficos como la hepatitis tóxica o la enfermedad veno-oclusiva, etc. (Alderman et al, 1994; Gordon et al, 1995).

Una alternativa es que se determinaran los diferentes efectos con diferentes métodos de preparación, o mejor aún que fueran procesados para eliminar o reducir la toxicidad o incrementar los efectos terapéuticos; de cualquier manera es importante que los pacientes estén informados de los potenciales riesgos y beneficios de los productos naturales (Ko, 1999). Serían también requeridos estudios prospectivos para establecer claramente la incidencia de hepatotoxicidad por remedios herbales, mientras tanto se requiere la vigilancia médica es requerida para disminuir el problema en el uso de fitoterapias o terapias alternativas (Chitturi y Farrel, 2000).

Por otra parte no se puede dejar de considerar la tendencia general a una vida sedentaria y una dieta alta en grasas, obesidad e hipertrigliceridemia, lo cual favorece la formación de cálculos de colesterol (Marshall y Einarson, 2007). El tratamiento principal sigue siendo de tipo quirúrgico, mediante la colecistectomía, y a pesar de la menos invasiva colecistectomía laparoscópica, la mortalidad, las complicaciones y el tiempo de operación no difiere entre ellas (Keus et al, 2006), de tal modo, se vuelve indispensable una forma preventiva o una estrategia alternativa de tratamiento. En este sentido, la identificación de actividad preventiva segura, del extracto de *L. tridentata* y del NDGA puede representar

una oportunidad de incorporar un fármaco, al intervenir favorablemente en el proceso de formación y secreción biliar. Aunque se ha confirmado el potencial farmacológico de *L. tridentata*, se requieren más estudios con el objetivo de obtener un compuesto seguro, y que además por su condición natural, sería renovable y de bajo costo, dando una mayor utilidad a esta abundante planta de nuestros desiertos.

X Conclusiones

Dentro de los mecanismos que conducen a la prevención de la litiasis por el extracto etanólico de *Larrea tridentata*, se encontraron efectos tanto a nivel hepático como intestinal.

Se encontró un efecto colestático tanto del extracto de Gobernadora como del NDGA.

Bajo las condiciones de estudio, se establecieron las concentraciones efectivas 50 (EC₅₀) para el extracto etanólico de la planta, 34 mg dL⁻¹ y para el NDGA, 28 mg dL⁻¹, lo cual confirma su hepatotoxicidad.

El efecto colestático es reversible en dosis menores a 40 mg dL⁻¹.

En los hígados de hámsters alimentados con dieta litogénica, la perfusión tanto de extracto etanólico de *L. tridentata* como de NDGA a 10 mg dL⁻¹ por 10 minutos produce una reducción significativa de la concentración de colesterol biliar y un incremento de la de ácidos biliares totales. Este efecto no ocurre en el hígado perfundido de animales alimentados con purina.

La perfusión de 10 mg dL⁻¹ de extracto de *L. tridentata* incrementa la proporción de ácido quenodesoxicólico y disminuye la de ácido cólico, en los hígados de animales alimentados con dieta litogénica.

En hámsters, la infusión de *L. tridentata* y extracto adicionado al 0.125% a la dieta litogénica previenen en alto porcentaje la colelitiasis. El tamaño del ciego de estos animales se incrementa significativamente. Los ácidos biliares fecales totales se reducen, con un incremento de quenodesoxicolato y una reducción de desoxicolato. En consecuencia la proporción de ácidos biliares primarios se incrementa.

Los resultados sugieren que *L. tridentata* puede ser usada en el tratamiento de la colelitiasis de colesterol. Sin embargo, su uso debe ser muy cuidadoso, ya que los niveles preventivo y tóxico podrían estar muy cercanos, especialmente en el caso del NDGA.

BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Gazar H, Bedir E, Takamats S, Ferreira D, Khan, I. 2004. Antioxidant lignans from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry* 65, 2499-2505.
- Agarwal R, Wang D, Bik P, Mukhtar H. 1991. Nordihydroguaiaretic acid, an inhibitor of lipoxygenase, also inhibits cytochrome P-450-mediated monooxygenase activity in rat epidermal and hepatic microsomes. *Drug Metab Dispos* 19, 620-624.
- Alderman S, Kailas S, Goldfarb S, Singaram C, Malone D. 1994. Cholestatic hepatitis after ingestion of chaparral leaf: confirmation by endoscopic retrograde cholangiopancreatography and liver biopsy. *J Clin Gastroenterol* 19, 242-247.
- Ansar S, Iqbal M, Athar M. 1999. Molecular epidemiology and cancer prevention. Nordihydroguaiaretic acid is a potent inhibitor of ferric-nitroloacetate-mediated hepatic and renal toxicity and renal tumour promotion in mice. *Carcinogenesis* 20, 599-606.
- Argueta V. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Vol. II. Instituto Nacional Indigenista, México, 669-670.
- Ariel F. 1999. Synergistic effect of new chemopreventive agents and conventional cytotoxic agents against human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 59, 6178-6184.
- Arrese M, Acatino L. 2002. From blood to bile: recent advances in hepatobiliary transport. *Ann Hepatol* 1, 64-71.
- Arteaga S, Cárdenas R, Estañol P. 1995. Prevención por Gobernadora *Larrea tridentata* sobre la coleditiasis de colesterol en el hámster dorado. Congreso Nacional de Gastroenterología, Mérida, Yuc. *Rev Gastroenterol Mex* 6 (Supl 3), S94.
- Arteaga S, 1997. Efecto de Gobernadora (*Larrea tridentata*) sobre la coleditiasis de colesterol en el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*). Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Arteaga S, Cárdenas R, Méndez N. 2003. Colestasis inducida por ácido NDGA y por Gobernadora (*Larrea tridentata*) en el hígado de hámster perfundido. Congreso Nacional de Gastroenterología, Veracruz, Ver. *Rev Gastroenterol Mex*, 68 (Supl 3), 88.
- Arteaga S, Andrade-Cetto A, Cárdenas R. 2005a. *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of the Mexican and American desert and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *J Ethnopharmacol*, 98, 231-239.
- Arteaga S, Carmona A, Luis J, Andrade A, Cárdenas R. 2005b. Effect of *Larrea tridentata* (Creosote bush) on cholesterol gallstones and bile secretion in hamsters. *J Pharm Pharmacol*, 57, 1093-1099.
- Arteaga S, Cárdenas R. 2006. Effect of *Larrea tridentata* and nordehydroguaiaretic acid on bile composition of perfused liver from hamsters fed a cholelithogenic diet. 49th Annual Meeting of the Western Pharmacology Society y XXIX Congreso Nacional de Farmacología, Vallarta, Jal. Res T-54.
- Attili A, De Santis A, Capri R, Repice A, Maselli S, GREPCO Group. 1995. The natural history of gallstones: The GREPCO experience. *Hepatology* 29, 656-660.
- Baier S, Hempel B, Waldvogel P, Baumgartner U. 2006. Zonation of Hepatic Bile Salt Transporters. *Dig Dis Sci* 51, 587-593.
- Barragán S, Alvarez G, Zavalza A. 1994. Valoración *In vitro* de la actividad antimicótica frente a hongos patógenos para el hombre de la *Larrea tridentata*. En: Memorias del 1er. Congreso Mexicano de Etnobiología, Toluca, Méx. Res 17.
- Batchelor W, Heathcote J, Wanless I. 1995. Chaparral induced hepatic injury. *Am J Gastroenterol* 90, 831-833.
- Baumgartner U, Miyaki K. 1995. Change of zonal bile acid processing after partial hepatectomy in the rat. *J Hepatol* 22, 474-80.
- Baumgartner U, Baier P, Schöffel U, Farthmann H. 2001. Colchicine inhibits taurodeoxycholate transport in pericentral but not in periportal hepatocytes. *Biochem Biophys Acta*. 1539, 218-224.
- Bilartz L, Dietschy J. 1988. Bile salt hydrophobicity influences cholesterol recruitment from rat liver *in vivo* when cholesterol synthesis and lipoprotein uptake are constant. *Gastroenterology* 95, 771-779.
- Birkenfeld S, Zaltsman Y, Krispin M. 1987. Antitumor effects of inhibitors of arachidonic acid cascade on experimentally induced intestinal tumors. *Dis Colon Rectum* 30, 43-46.

- Bokoch G, Reed P. 1981. Evidence for inhibition of leukotriene A4 synthesis by 5,8,11,14-eicosatetraenoic acid in guinea pig polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 256, 4156-4159.
- Boyer J. 2007. New perspectives for the treatment of cholestasis: Lessons from basic science applied clinically. *J Hepatol* 46, 365-371.
- Brent J, 1999. Three new herbal hepatotoxic syndromes. *J Toxicol Clin Toxicol* 37, 715-719.
- Broomfield P, Chopra R, Sheinbaum R, Silverman A, Schoenfield L, Marks J. 1988. Effects of ursodeoxycholic acid and aspirin on the formation of lithogenic bile and gallstone during lost weight. *N England JMed* 319, 1562-1567.
- Bull L, van Eijk M, Pawlikowska L, DeYoung J, Juijn J, Liao M. 1998. A gene encoding a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis. *Nat Genet* 18, 219-24.
- Calzado-Florez C, Segura-Luna J, Guajardo-Touche E. 1995. Effects of chaparrin, nordihydroguaiaretic acid and their structural analogues on *Entamoeba histolytica* cultures. *Proc West Pharmacol Soc* 38, 105-106.
- Rev Gastroenterol Méx 43, (Suppl 2) 61.
- Cárdenas R. 1991. Modelos animales de litiasis biliar. *Rev Gastroenterol Mex* 56, 131-135.
- Cárdenas R, Estañol P, Galicia M. 1996. Pigment cholelithiasis induced by vitamin A and its prevention by butylated hydroxytoluene. *Arc Med Res* 27, 71-75.
- Cárdenas R, Arteaga S. 1998. Perfil de ácidos biliares en la prevención por *Larrea tridentata* de la colelitiasis de colesterol del hámster. Congreso Nacional de Bioquímica, Mérida, Yuc.
- Cárdenas R, Arteaga S. 1999. Disminución del fosfato inorgánico biliar en la prevención de la litiasis del hámster por Gobernadora (*Larrea tridentata*). Congreso Nacional de Gastroenterología, Veracruz, Ver. *Rev. Gastroenterol Méx.* 64(Supl 4), S2.
- Cárdenas R, Méndez N, Arteaga S. 2000. Colestásis inducida por ácido NDGA y por Gobernadora (*Larrea tridentata*) en duplas de hepatocitos de rata. Congreso Nacional de Gastroenterología, Mazatlán, Sin. *Rev. Gastroenterol Mex* 65, 59.
- Carey M, Lamont J. 1992. Cholesterol gallstone formation 1. Physical-chemistry of bile and biliary lipid secretion. *Prog Liver Dis* 10, 139-63.
- Chan F, Zhang Y, Lee S, Shaffer E. 1998. The effects of liver transplantation and cilosporine on bile formation and lipid composition: an experimental study in the rat. *J Hepatol* 28, 329-36.
- Chen H, Teng L, Li J, Park R, Mold D, Gnabre J, Hwu J, Tseng W, Huang R. 1998. Antiviral activities of methylated nordihydroguaiaretic acids. Targeting herpes simplex virus replication by the mutation insensitive transcription inhibitor tetra-O-methyl-NDGA. *J Med Chem* 41, 3001-3007.
- Cheung K, Hickman P, Potter J, Walker N, Jericho M, Halsam R, Roberts M. 1996. An optimized model for rat liver perfusion studies. *J Sur Res* 66, 81-89.
- Chitturi S, Farrel G. 2000. Herbal hepatotoxicity: An expanding but poorly defined problem. Review. *J Gastroenterol Hepatol* 15, 1093-1099.
- Craig J, Callahan M, Huang R, De Lucia L. 2000. Inhibition of human papillomavirus type 16 gene expression by nordihydroguaiaretic acid plant lignan derivatives. *Antiviral Res* 47, 19-28.
- Cronquist A. 1987. Botánica básica. Compendio. Continental, México, 409-401.
- Czubayko F, Beumers B, Lammsfuss S, Lutjohann D, Klaus von Bergmann. 1991. A simplified micro-method for quantification of fecal excretion of neutral and acidic sterols for outpatient studies in humans. *J Lipid Res* 32, 1861-67.
- Dam H. 1969. Nutritional aspects of gallstones formation with particular reference to alimentary production of gallstones in laboratory animales. *World Rev Nutr Diet* 11, 199-239.
- Das A, Asatryan L, Reddy M, Wass C, Stins M, Joshi S, Bonventre J, Kim K. 2001. Differential role of cytosolic phospholipase A2 in the invasion of brain microvascular endothelial cells by *Escherichia coli* and *Listeria monocytogens*. *J Infect Dis* 184, 732-737.
- Dazinger R, Hofman A, Schoenfield L, Thistle J. 1972. Dissolution of cholesterol gallstones by chenodeoxycholic acid. *N Engl J Med* 286, 1.
- De la Cerda A. 1967. Las tierras áridas mexicanas. Estudio general de las especies de *Larrea*. Serie Aridocultura., Tomo II. México, 13-45.
- Díaz J. 1976. Usos de las Plantas Medicinales de México. Monografías científicas II. Instituto Mexicano para el estudio de Plantas medicinales, México, 329.
- Diehl A. 1991. Epidemiology and natural history of gallstone disease. *Gastroenterol Clin North Am* 20, 1-19.

- Dowsett J, Vaira D, Polydorou A, Russell R, Salmon P. 1988. International endoscopy in the pancreatobiliary tree. *Am J Gastroenterol* 83, 1378-1386.
- Drecktrah P, De Figueiredo R, Mason M, Brown W. 1998. Retrograde trafficking of both Golgi complex and TGN markers to the ER induced by NDGA and cyclophenil diphenol. *J Cell Sci* 111, 951-965.
- Erlinger S. 1988. Bile Flow. Chap 35. En: *The liver: Biology and Pathobiology*. 2nd. Ed. Raven Press, N.Y, 647-653.
- Everhart J, Yeh F, Lee E, Hill M, Fabsitz R, Howard B, Welty T. 2002. Prevalence of gallbladder disease in American Indian populations: findings from the strong heart study. *Hepatology* 35, 1507-1512.
- FDA, 2006. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/opa-appa.html> 12/26/2006.
- Fiorucci S, Clerici C, Antonelli E, Orlandi S, Goodwin B, Sadeghpour B, Sabatino G, Russo G, Castellani D, Willson T, Pruzanski M, Pellicciari R, Morelli A. 2005. Protective effects of 6-ethyl chenodeoxycholic acid, a farnesoid X receptor ligand, in estrogen-induced cholestasis. *J Pharmacol Exp Ther* 313, 604-612.
- Floriano-Sánchez E, Cleva-Villanueva, Medina-Campos O, Rocha D, Sánchez-González D, Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J. 2006. Nordihydroguaiaretic acid is a potent *in vitro* scavenger of peroxy nitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents *in vivo* ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radic Res* 40, 523-533.
- Frei B. 1994. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med* 97, S5-S13.
- Fridhandler E, Davidson J, Shaffer E. 1983. Defective gallbladder contractility in the ground squirrel and prairie dog during the early stages of cholesterol gallstones formation. *Gastroenterology* 85, 830-836.
- Frimberger E. 1989. Operative laparoscopy: Cholecystectomy. *Endoscopy* 21, 367-372.
- Fujimoto N, Kohtab R, Kitamura S, Honda H. 2004. Estrogenic activity of an antioxidant, nordihydroguaiaretic acid (NDGA). *Life Sci* 74, 1417-1425.
- Fujiwara T, Misumi Y, Ikehara Y. 1998. Dynamic recycling of ERGIC53 between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex is disrupted by nordihydroguaiaretic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 253 (3), 869-876.
- García E, Soto C, Miranda F. 1961. *Larrea* y clima. *Annales del Instituto Biología, UNAM* 31, 133-160.
- Gardea J, Arteaga S, Tiemann K, Chianelli R, Pingitore N, Mackay W. 2001. Absorption of copper (II) by creosote bush (*Larrea tridentata*): use of atomic and X-ray absorption spectroscopy. *Environ Toxicol Chem* 20, 2572-2579.
- Gay C, Dwyer D. 1998. New Mexico range plants. En: Allison C, Hatch S, Schickedantz J (Eds) *Cooperative Extension Service Circular*. 374, New Mexico State University, Las Cruces, Nvo Mex, 84.
- Gezginici M, Timmermann B. 2001. A short synthetic route to nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and its stereoisomer using Ti-induced carbonyl-coupling reaction. *Tetrahedron Lett* 42, 6083-6085.
- Gnabre J, Ito Y, Ma Y, Huang R. 1996. Isolation of anti-HIV-1 lignans from *Larrea tridentata* by counter-current chromatography. *J Chromatogr A* 719, 353-364.
- Goldstein L, Schonfield L. 1975. Gallstones: pathogenesis and medical treatment. *Adv Intern Med* 20, 89-119.
- Gonzalez V, Rivera M, Arredondo P, Martínez D, Gonzalez V, Haffner S, Stern M. 1997. High prevalence of cholelithiasis in a low income Mexican population: an ultrasonographic survey. *Arch Med Res* 28, 543-7.
- Gordon D, Gayle R, Hart J, Sirota R, Baker A. 1995. Chaparral ingestion: the broadening spectrum of liver injury caused by herbal medications. *J Am Med Assoc* 273, 489-490.
- Gowri M, Reaven G, Azhar S. 1999. Masoprocol lowers blood pressure in rats with fructuosa-induced hypertension. *Am J Hypertens* 12, 744-746.
- Granados H, Cárdenas R. 1994. Cálculos bilares en el hámster dorado. XXXVII. La acción profiláctica de Creosote bush (*Larrea tridentata*) en los cálculos biliares pigmentarios producidos por vitamina A. *Rev Gastroenterol Mex* 59, 31-35.
- Grundy S. 2004. Cholesterol gallstones: a fellow traveler with metabolic syndrome? *Am J Clin Nutr* 80, 1-2.
- Guyton-Hall. 1977. *Tratado de Fisiología Médica*. 9^a. Ed. McGraw Hill. España. 961-966.

- Hanis L, Ferrell E, Tulloc Schull R. 1985. Gallbladder disease epidemiology in mexican-american in Starr County, Texas. *Am J Epidemiol* 122, 820-829.
- Harvey R, Upadhyya A. 1995. A rapid, simple high capacity cholesterol crystal growth assay. *J Lipid Res* 36, 2054-2059.
- Hashimoto S, Igimi H, Uchida K, Satoh T, Benno Y, Takeuchi N. 1996. Effects of beta-lactam antibiotics on intestinal microflora and bile acid metabolism in rats, *Lipids*, 31, 601-9.
- Heaton K. 1973. The epidemiology of gallstones disease and suggested aetiology. *Clin Gastroenterol* 2, 67-83.
- Heaton K. 2000. Epidemiology of gall-bladder disease-role of intestinal transit. *Aliment Pharmacol Ther* 14 (Suppl 2), 9-13.
- Heron S, Yarnell E. 2001. The safety of low-dose *Larrea tridentata* (DC) Coville (creosote bush or chaparral): a retrospective clinical study. *J Altern Complement Med* 7, 175-185.
- Hersch-Martínez P. 1995. Commercialization of wild medicinal plants from Southwest Puebla, México. *Econ Bot* 49, 197-206.
- Hofmann A. 1999. The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch Intern Med* 159, 2647-2658
- Hoffmann A. 2007. Biliary secretion and excretion in health and disease: Current concepts. *Ann Hepatol* 6, 15-27.
- Holzbach T. 1983. Gallbladder stasis: consequence of long term parental hyperalimentation and risk factor for cholelithiasis. *Gastroenterology* 84, 1055-1058.
- Holzbach T. 1985. Patogenia y tratamiento médico de los cálculos de la vesícula biliar. En: Sleisnger H, Fordtran J. *Panamericana*, 3ª. Ed. Argentina, Vol 2, 1678.
- Holzbach R. 1990. Current concepts of cholesterol transport and crystal formation in human bile. *Hepatology* 12, 26S-32S.
- Hughes R, Rowland I. 2000. Metabolic activities of the gut microbiota in relation to cancer. *Microbial Ecology in Health Disease*, Suppl 2, 179-185.
- Hussaini H, Pereira S, Murohy G, Dowling H. 1995. Deoxycholic acid influences cholesterol solubilization and microcrystal nucleation time in gallbladder bile. *Hepatology* 22, 1735-1744.
- Hwu J, Tseng W, Gnable J, Giza P, Huang R. 1998. Antiviral activities of methylated nordihydroguaiaretic acid: Synthesis, structure identification, and inhibition of Tat-regulated HIV transactivation. *J Med Chem* 41, 2994-3000.
- Hyder P, Fredrickson E, Rick E, Estell R, Tellez M, Gibbens R. 2002. Distribution and concentration of total phenolics, condensed tannins, and nordihydroguaiaretic acid (NDGA) in creosotebush (*Larrea tridentata*). *Biochem Sys Ecol* 30, 905-912.
- Igimi H, Carey M. 1981. Cholesterol gallstone dissolution in bile: dissolution kinetics of crystalline cholesterol (anhydrate and monohydrate) with chenodeoxycholate, ursodeoxycholate and their glycine and taurine conjugates. *J Lipid Res* 22, 254-270.
- Jacobson P, Schrier D. 1993. Regulation of CD11b/CD18 expression in human neutrophils by phospholipase A2. *Immunology* 151, 5639-5652.
- Jan C, Tseng C. 2000. Mechanisms of nordihydroguaiaretic acid-induced Ca²⁺, increases in MDKC cells. *Life Sci* 66, 1753-1762.
- Jacquemin E, Cresteil D, Manouvrier S, Boute O, Hadchouel M. 1999. Heterozygous non-sense mutation of the MDR3 gene in familial intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Lancet* 353, 210-211.
- Jaeschke H, Gores G, Cederbaum A, Hinson J, Pessayre D, Lemasters J. 2002. Mechanism of hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 65, 166-176.
- Jones S. 1987. *Sistemática Vegetal*. Mc Graw Hill 2ª edición, México. 405-406.
- Keus F, de Jong J, Goozen H, van Laarhoven J. 2006. Laparoscopic versus open cholecystectomy for patients with symptomatic cholelithiasis. *Cochrane Database Syst Rev* 18, CD006231.
- Ko R. 1999. Causes, Epidemiology, and Clinical Evaluation of Suspected Herbal Poisoning. *Clin Toxicol*, 37, 697-708.
- Konno C, Lu Z, Xue H, Erdelmeier C, Meksuriyen D, Che C, Cordell G, Soejarto D, Waller D, Fong H. 1990. Furanoid lignans from *Larrea tridentata*. *J Nat Prod* 53, 396-406.
- Kritchevsky D. 1988. Dietary fiber. *Ann Rev Nutr* 8, 301-328.
- Kubitz R, Wettstein M, Warskulat U, Haussinger D. 1999. Regulation of the multidrug resistance protein 2 in the rat liver by lipopolysaccharide and dexamethasone. *Gastroenterology* 116, 401-410.

- Kullak-Ublick G, Paumgartner G, Berr F. 1995. Long-terms effects of cholecistectomy on bile acid metabolism. *Hepatology* 21, 41-45.
- Kullak-Ublick G. 2000. Hepatobiliary transport. *J Hepatol* 32, 3-18.
- Kwon K, Jung Y, Lee S, Moon C, Baik E. 2005. Arachidonic acid induces neuronal death through lipoxygenase and cytochrome P450 rather than cyclooxygenase. *J Neurosci Res* 81, 73-84.
- Lara F, Márquez C. 1996. Plantas medicinales de México: Composición, Usos y actividad biológica. UNAM, México, 59-61.
- Lambert J, Meyers R, Timmermann B, Dorr R. 2001. Pharmacokinetic análisis by high-performance liquid chromatography of intravenous nordihydroguaiaretic acid in the mouse. *J Chromatogr B* 754, 85-90.
- Lambert J, Zhao D, Meyers R, Kuester R, Timmermann B, Dorr, R. 2002. Nordihydroguaiaretic acid: hepatotoxicity and detoxification in the mouse. *Toxicol* 40, 1701-1708.
- Larrey D. 2000. Drug induced liver disease. *J Hepatol* 32 (Suppl 1), 77-88.
- Lee W. 2003. Drug-Induced hepatotoxicity. *Medical Progresss. N Eng J Med* 349, 474-485.
- Lia V, Confalonieri C, Comas I, Hunziker J. 2001. Molecular phylogeny of *Larrea* and its allies (Zigophyllaceae): reticulate evolution and the probable time of Creosote bush arrival in North America. *Mol Phylogenet Evol* 21, 309-320.
- Luo J, Chuang T, Cheung J, Quan J, Tsai J, Sullivan C, Hector R, Reed M, Mezaros K, King S, Carlson T, Reaven G. 1998. Masoprocol (nordihydroguaiaretic acid): a new antihyperglycemic agent isolated from the creosote bush (*Larrea tridentata*). *Eur J Pharmacol* 346, 77-79.
- Mabry T, Bohnstedt Ch, 1981. *Larrea*: A chemical resource. En: Campos L, Mabry J, Fernández T. (Eds.) *Larrea*. CONACYT, México, Chap. 13, 232.
- Mabry T, DiFeo D, Sakakibara M, Bohnstedt C, Sleiger D. 1979a. The natural products chemistry of *Larrea*. En: Mabry J, Hunziker J, DiFeo D. (Eds.), *Creosote bush. Biology and Chemistry of Larrea in the New World Desert*. Dowden Hutchinson Ross Inc., USA, 115-134.
- Mabry J, Hunziker J, DiFeo D. 1979b. *Creosote Bush. Biology and Chemistry of Larrea in the New World Deserts*. Dowden Hutchinson Ross Inc., USA, 2083.
- Mai V, Morris G. 2004. Colonic bacterial flora: Changing understandings in the molecular age1. *J Nutr* 134 (Academic research library), 459.
- Malet P, Deng, Soloway R. 1989. Gallbladder mucin and cholesterol and pigment gallstone formation in hamster. *Sacand J Gastroenterol* 24, 1055-1060.
- Mamianetti A, Garrido D, Carducci C, Vescina M. 1999. Fecal bile acid excretion profile in gallstone patients. *Medicina (B Aires)* 59, 269-73.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79, 727- 47.
- Mangione A, Dearing D, Karasov W. 2001. Detoxification in relation to toxin tolerance in desert woodrats eating Creosote bush. *J Chem Ecol* 27, 2559-2578.
- Marshall H, Einarson C. 2007. Gallstone disease. *J Intern Med* 261, 529-542.
- Martínez M. 1969. Las plantas medicinales de México. Botas, México, 143-144.
- Martínez-Vilalta J, Pockman W. 2002. The vulnerability to freezing-induced xylem cavitation of *Larrea tridentata* (Zygophyllaceae) in the Chihuahuan desert. *Am J Bot* 89, 1916-1924.
- Major M, Johnson M, Davis S, Kellogg T. 1980. Identifying scats by recovery of bile acids. *J Wildl Manage*, 44, 290-293.
- Mc Clure M, Denson L, Ananthanarayanan M, Suchy F, Hardikar W, Karpen S. 1998. CAAT/Enhancer Binding Protein c~ (C/EBPc 0 and Hepatocyte Nuclear Factor 3fl (HNF3fl) transactivate the human hepatic Na+/taurocholate cotransporter (NTCP). *Hepatology* 28, 428A.
- Méndez N, Jessurum J, Ponciano Uribe M, Hernández-Avila M. 1993. Prevalence of gallstones disease in mexican population. *Dig Dis Sci* 38, 680.
- Méndez N, Ponciano Jessurum J, Alonso P, Romero P, Uribe M. 1995. Gallstones composition in mexican patients. *Arch Med Res* 36, 415-419.
- Méndez N, Cárdenas R, Ponciano G, Uribe M. 1996. Pathophysiology of colesterol gallstone disease. *Arch Med Res* 27, 433-444.

- Méndez N, King A, Ramos M, Pichardo R, Uribe M. 2004. The Amerindians genes in the Mexican population are associated with development of gallstones disease. *Am J Gastroenterol* 99, 2166-2170.
- Mikuni M, Yoshida M, Hellberg P, Peterson A, Edwin S, Bântrôm M, Peterson M. 1998. The lipoxygenase, Nordihydroguaiaretic acid, inhibits ovulation and reduces leukotriene and prostaglandin levels in the rat ovary. *Biol Reprod* 58, 1211-1216.
- Milner-Fenwick T. 1989. Evaluation of Liver Function in Clinical Practice, Eli Lilly & Co., Indianapolis, In. American Gastroenterological Assoc., Undergraduate Teaching Project, Unit 21, Slide 2.
- Nervi F, Covarrubias C, Bravo P, Velasco N, Ulloa N, Cruz F, Faba M, Servern C, Del Pozo R Antezana C, Valdivieso V, Arteaga A. 1989. Influence of legume intake on biliary lipids and cholesterol saturation in young Chilean men. *Gastroenterology* 96, 835-830.
- Nellesen J. 1997. *Larrea tridentata*. *Oecologia* 109, 19-21.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones Técnicas para la Reproducción, el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/NOM/062zoo.pdf>
- Obermeyer W, Musser S, Betz J, Casey R, Pohland A, Page S. 1995. Chemical studies of phytoestrogens and related compounds in dietary supplements: flax and chaparral. En: *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* 268, 6-12.
- Oliveto E. 1972. Nordihydroguaiaretic acid, a naturally occurring antioxidant. *Chem Ind* 2, 677-679.
- Pak E, Erason K, Wu V. 2004. Hepatotoxicity of herbal remedies: an emerging dilemma. *Prog Transplant* 14, 91-6.
- Pazzi P, Scagliarini R, Gamberini S, Pezzoli A. 2000. Gallbladder motor function in diabetes mellitus. *Aliment Pharmacol Ther* 14 (Suppl 2), 62-65.
- Peters-Golden M. 2001. Potential role of leukotirenes in other disease states. *Clin Exp Allergy*, 1, 178-182.
- Petroni M, Jazarawi R, Pazzi P. 2001. Ursodeoxycholic acid alone or with chenodeoxycholic acid for dissolution of cholesterol gallstones: a randomized multicentre trial. The British Italian Gallstone study group. *Aliment Pharmacol Ther* 15, 123-128.
- Poupon R, Chazouillères O, Poupon R. 2000. Chronic cholestasis diseases. *J Hepatol* 32, (suppl. 1), 129-140.
- Ramoner R, Rieser C, Thurner M. 1998. Nordihydroguaiaretic acid blocks secretory and endocytic pathway in human dendritic cells. *J Leukoc Biol* 64, 747-752.
- Reed M, Mezaros K, Entes L, Claypool M, Pincket J, Brignetti D, Luo J, Khandwala A, Reaven G. 1999. Effect of masoprocol on carbohydrate and lipid metabolism in a rat model of Type II diabetes. *Diabetologia* 42, 102-106.
- Reuben A. 1984. Biliary proteins. *Hepatology* 4, 46S-50S.
- Rivero-Cruz I, Acevedo L, Guerrero J, Martínez S, Bye R, Pereda-Miranda R, Franzblau S, Timmermann B, Mata R. 2005. Antimicrobial agents from selected mexican medicinal plants. *J Pharm Pharmacol* 57, 1117-1126.
- Roda E, Moeselli A, Sama C, Festi D, Barbara L. 1989. Epidemiology of gallstones disease. En: *Biliary litotripsy*. Ferruci J, Dellius M, Burhene H. (Eds) Publisher Inc. Chicago, 121-138.
- Roda A, Pelliciarri R. 1995. Metabolism, pharmacokinetics, and activity of a new 6-fluoro analogue of ursodeoxycholic acid in rats and hamsters. *Gastroenterology* 108, 1204-1214.
- Romo de Vivar A. 1985. *Productos naturales de la flora mexicana*. Limusa, México, 56.
- Russo M, Wei J, Thiny M. 2004. Digestive and liver disease statistics. *Gastroenterology* 126, 1448-53.
- Rzedowsky J, Huerta M. 1994. Matorral xerófilo. En: *La vegetación de México*. 6ª. Ed. Limusa, México, 237-261.
- Safayhi H, Mack J, Sabieraj M, Anazodo L, Subramanian H, Ammon H. 1992. Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase. *J Pharmacol Exp Ther* 261, 1143-1146.
- Satoh T, Hosokawa M. 1998. The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38, 257-288.
- Schlierf G, Schellenberg B, Stiehl A, Czygan P, Oster P. 1981. Biliary cholesterol saturation and weight reduction: effect of fasting and low calorie diet. *Digestion* 21, 44-49.
- Scribner K, Gadbois T, Gowri M, Azhar S, Reaven G. 2000. Masoprocol decreases serum triglyceride concentrations in rats with fructose-induced hypertriglyceridemia. *Metabolism* 49, 1106-1110.
- Seglen P. 1976. *Methods Cell Biol*. 13, 29-83.

- Segura J. 1978. Effects of nordihydroguaiaretic acid and ethanol on the growth of *Entamoeba invadens*. Arch Invest Med (Mex) 9, 157–162.
- Sheikh N, Philen R, Love L. 1997. Chaparral-associated hepatotoxicity. Arch Int Med 157, 913–919.
- Sherlock S. 1981. Diseases of the liver and biliary system. 7th Ed. Blackwell Scientific Publications. London. 727-737.
- Shoda J, He B, Tanaka N, Matzuzaki Y, Osuga T, Yamamori S, Miyazaki H, Sjövall J. 1995. Increase of deoxycholate in supersaturated bile of patients with cholesterol gallstone disease and its correlation with de novo synthesis of cholesterol and bile acids in liver, gallbladder emptying, and small intestinal transit. Hepatology 21, 1291-1302.
- Siegel H. 1985. The hamster. Reproduction and behavior. Plenum Press, N.Y. 440. Anatomy and Physiology of hamster gastrointestinal tract, 363-366.
- Sleisenger H, Fordtran J. 1985. Enfermedades gastrointestinales: Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. 3ª. Ed. Panamericana, Argentina, Vol 2, 1682-1686.
- Smith R. 1973. The excretory function of bile. Chapman and Hall. London, 9-15.
- Smith A. 1994. Cystic renal cell carcinoma and acquired renal cystic disease associated with consumption of chaparral tea: a case report. J Urol 152, 2089-2091.
- Soloway R, Trotman B, Ostrow J. 1977. Pigment gallstones. Gastroenterology 72, 167-182.
- Spady D, Turley S, Dietschy J. 1983. Comparison of the role of hepatic cholesterol synthesis and lipoprotein cholesterol uptake in determining the rate of biliary cholesterol secretion in the hamster. En: Bile acids and cholesterol metabolism in health and disease. 1983. Falk Symposium 33. Paumgartner G, Stiehl A, Gerok W. (Eds) MTP Press Ltd, Boston, Chap 22, 157-173.
- SSA. 2002 Secretaría de Salud y Asistencia. México. URL: <http://www.ssa.gob.mx> Octubre 2004.
- Stickel F, Egerer G, Seitz H. 2000. Hepatotoxicity of botanicals. Public Health Nutrition 3, 113-124.
- Stieger B, Meier P, Landmann L. 1994. Effect of obstructive cholestasis on membrane traffic and domain-specific expression of plasma membrane proteins in rat liver parenchymal cells. Hepatology 20, 201-12.
- Swidsinski A, Ludwing W, Pahlig H, Priem F. 1995. Molecular genetic evidence of bacterial colonization of cholesterol gallstones. Gastroenterology 108, 860-864.
- Tazuma S. 2006. Gallstone disease: Epidemiology, pathogenesis, and classification of biliary stones (common bile duct and intrahepatic). Best Pract res Clin Gastroenterol 20, 1075-1083.
- Tequida M, Cortez R, Rosas B, López S, Corrales M. 2002. Effect of alcoholic extracts of wild plants on the inhibition of growth of *Aspergillus avus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *P. expansum*, *Fusarium moniliforme* and *F. poae* moulds. Rev Iberoam Micol 19, 84–88.
- Thompson J, Fried G, Ogden W, Fagan C, Inque K, Woener Y, Watson L. 1982. Correlation between release of cholecystokinin and contraction of the gallbladder in patients with gallstones. Ann Surg 195, 670-676.
- Thistle J, May G, Bender C. 1989. Dissolution of cholesterol gallbladder stones by metal ter-butyl ether administered by percutaneous transhepática catheter. N Eng J Med 320, 633-639.
- Thomas L, Veysey M, Bathgate T, King A, French G, Smeeton N, Murphy G, Dowling R. 2000. Mechanism for the transit-induced increase in colonic deoxycholic acid formation in cholesterol cholelithiasis. Gastroenterology 119, 806-15.
- Thornton J, Emmet P, Heaton K. 1983. Diet and gallstones effects of refined and unrefined carbohydrate diets on bile cholesterol saturation and bile acid metabolism. Gut 24, 2-6.
- Timmermann B. 1977. Practical uses of *Larrea*. En: Mabry T, Hunziker J, Difeo D. (Eds), Creosote bush. Biology and chemistry of *Larrea* in new world deserts. Dowden Hutchinson Ross, Inc., USA, 252-257.
- Timmermann B. 1981. *Larrea*: Potential uses. En: Campos L, Mabry J., Fernández T. (Eds), *Larrea*. CONACYT, México, 240-241.
- Trotman B, Soloway R. 1975. Pigment vs cholesterol cholelithiasis: clinical and epidemiological aspects. Dig Dis 20, 735-740.
- Trotman B, Soloway R. 1982. Pigment gallstones disease: summary of the National Institute Health-International Workshop. Hepatology, 2, 879-884.
- Turley S, Dietschy J. 1978. Reevaluation of the 3- α -hydroxysteroid dehydrogenase assay for total bile acids in bile. J Lipid Res 19, 924.

- Tyroler H, Glueck J, Christensen B. 1980. Plasma high density lipoprotein cholesterol comparisons in black and white population. *Circulation* 62, 99-107.
- Van Auken O. 2000. Shrub invasions of North American semiarid grasslands. *Ann Rev Ecol Syst* 31, 197-215.
- Van Erpecum K, Henegouwen G, Stoelwinder B, Schmith, Y, Willekens, F. 1990. Bile concentration is a key factor for nucleation of cholesterol crystal and cholesterol saturation index in gallbladder bile of gallstones patients. *Hepatology* 11, 1-6.
- Van Erpecum K, Veneran G, Portincasa P. 2000. Agents affecting gall-bladder motility-role in treatment and prevention of gallstones. *Aliment Pharmacol Ther* 14 (Suppl 2), 66-70.
- Verastegui M, Sánchez C, Heredia N, Garcia J. 1996. Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahuan desert. *J Ethnopharmacol* 52, 175-177.
- Verporte K, Van der Heijden R, Memelink J. 2000. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Res* 9, 323-343.
- Ward A, Brosden R, Heel R, Speight T, Avery G. 1984. Ursodeoxycholic acid: a review of its pharmacologic properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 27, 95-131.
- Wasmuth H, Matern S, Lammert F. 2004. The genetic background of gallstones formation. En: *Update Gastroenterology 2004: New developments in the management of benign gastrointestinal disorders* 71-85.
- Whitford W, Nielson R, De Soyza A. 2001. Establishment and effects of creosote bush, *Larrea tridentata*, on a Chihuahuan desert watershed. *J Arid Environ* 47, 1-10.
- Whiting P, Coluston A, Kerlin P. 2002. Black cohosh and other herbal remedies associated with acute hepatitis. *The Medical Journal of Australia* 117, 440-443.
- Willensen M. 2000. 5-Lipoxygenase inhibition: a new treatment strategy for Sjogren-Larsson syndrome. *Neuropediatrics* 31, 1-3.
- Winkelman M. 1989. Ethnobotanical treatments of diabetes in Baja California norte. *Med. Antropol.* 11, 255-268.
- Xue H, Lu Z, Konno C, Soejarto D, Cordell G, Fong H, Hodgson W. 1988. 3β-(3,4-Dihydroxycinnamoyl)-erythrodiol and 3β-(4-Hydroxycinnamoyl)-erythrodiol from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry* 27, 233-235.
- Zamora J, Mora E. 1985. Farmacología. En: INI. 1994. *Biblioteca de la medicina tradicional mexicana. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Tomo II*, 669-670.