



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

DELEGACIÓN SUR DE LA CIUDAD DE MÉXICO

UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI

“DR. BERNARDO SEPÚLVEDA”

TÍTULO

“TOXICIDAD AGUDA HEPÁTICA CAUSADA POR SIETE EXTRACTOS DE
ORIGEN HERBAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL”

TESIS QUE PRESENTA

DRA. MARÍA CELINA BRIZ SÁNCHEZ

PARA OBTENER EL DIPLOMA

EN LA ESPECIALIDAD EN

ANATOMÍA PATOLÓGICA

ASESORES:

DR. FERNANDO CALZADA BERMEJO

DRA. LUZ MARÍA GÓMEZ JIMÉNEZ

DRA. NAYELI XOCHQUETZAL ORTÍZ OLVERA



MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO

FEBRERO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



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).

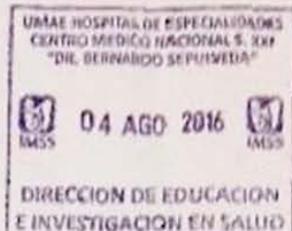
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

La presente tesis se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Farmacología (UIMF); UMAE Hospital de Especialidades CORCE 2° PISO, IMSS, Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Esta tesis lleva por nombre **“TOXICIDAD AGUDA HEPÁTICA CAUSADA POR SIETE EXTRACTOS DE ORIGEN HERBAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL”**.

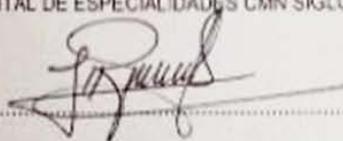
DRA. DIANA G. MÉNEZ DÍAZ

JEFE DE LA DIVISIÓN DE EDUCACIÓN EN SALUD
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI



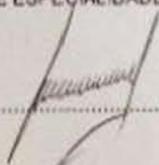
DRA. ROCÍO LORENA ARREOLA ROSALES

TITULAR DEL CURSO DE POSGRADO EN ANATOMÍA PATOLÓGICA
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI



DRA. LUZ MARÍA GÓMEZ JIMÉNEZ

MÉDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI



Dictamen de Autorizado

Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud **3601** con número de registro **13 CI 09 015 184** ante COFEPRIS
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DR. BERNARDO SEPULVEDA GUTIERREZ, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI,
D.F. SUR

FECHA **15/07/2016**

DR. FERNANDO CALZADA BERMEJO

P R E S E N T E

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

TOXICIDAD AGUDA HEPÁTICA CAUSADA POR SIETE EXTRACTOS DE ORIGEN HERBAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL

que sometió a consideración de este Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de Ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A U T O R I Z A D O**, con el número de registro institucional;

Núm. de Registro
R-2016-3601-165

ATENTAMENTE

DR.(A) CARLOS FREDY CUEVAS GARCÍA

Presidente del Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud No. 3601

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

Autor:

Dra. María Celina Briz Sánchez

Residente del tercer año de la especialidad de Anatomía Patológica

UMAE Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI

Tel: 5566286789

celinbriz@gmail.com

Tutores:

1.- Dr. Fernando Calzada Bermejo

Laboratorio de Investigación en Farmacología, UMAE, Hospital de Especialidades CMN SXXI, IMSS, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, Delegación Cuauhtémoc, México, D.F. Tel (55) 56276900, ext 21367,

fercalber10@gmail.com

2.- Dra. Luz María Gómez Jiménez

Anatomopatóloga adscrita del Departamento de Anatomía Patológica. UMAE, Hospital de Especialidades, CMN Siglo XXI, IMSS Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, Delegación Cuauhtémoc, México, D.F.

Profesor de Posgrado de Anatomía Patológica.

Tel. 56276900 Ext. 21355 y 22133

lucitagomez@hotmail.com

3.- Dra. Nayeli Xochiquetzal Ortiz Olvera

Médico adscrito del servicio de Gastroenterología, UMAE, Hospital de Especialidades CMN SXXI, IMSS, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, Delegación Cuauhtémoc, México, D.F.

Tel (55) 56276900, ext 21565 y 21566, Fax: 55194745

nayelxoortiz@yahoo.com.

ÍNDICE

RESUMEN	7
MARCO TEÓRICO	8
JUSTIFICACIÓN	31
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
OBJETIVOS	34
HIPÓTESIS	35
PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO	37
DEFINICIÓN DE VARIABLES	44
RESULTADOS	56
CONCLUSIÓN	75
DISCUSIÓN	76
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

RESUMEN

Antecedentes: El número de casos reportados por hepatotoxicidad herbal está subestimado. Datos de otros países muestran una ocurrencia de daño hepático relacionado con suplementos alimenticios herbales que va desde 2% a 16% de todos los casos de hepatotoxicidad identificados.

Objetivo: Evaluar los cambios morfológicos en el hígado en un modelo de ratón producidos por el consumo de las siguientes plantas: *Gymnema sylvestre* (Gurma), *Agathosma betulina* (Bechu), *Morus* (Mora de árbol), *Crataegus oxyacantha ssp* (Espina de Albar), *Arctostaphylos pungens* (Pingüica), *Laurus nobilis* (Laurel), *Hamamelis virginiana*.

Diseño del estudio: Se realizó un ensayo preclínico, doble ciego, con grupos de ratones a los cuales se les administró dosis única de un solo extracto herbal de las plantas previamente mencionadas en el objetivo, a tres distintas dosis y se analizaron los cambios morfológicos en hígado con microscopía óptica, al día 14 de la administración o al momento del deceso si ocurrió antes.

Resultados: El extracto de la hoja de *Crataegus oxyacantha* ocasionó cambios morfológicos compatibles con daño hepatotóxicos con patrón mixto, necro inflamatorio tipo hepatitis aguda, granulomatoso y vascular. *Agathosma betulina* también ocasionó daño con patrón granulomatoso combinado con daño necro inflamatorio de tipo hepatitis aguda. *Gymnema sylvestre* ocasionó daño de tipo granulomatoso combinado con patrón necro inflamatorio de tipo hepatitis aguda. *Arctostaphylos pungens* solo desarrolló patrón granulomatoso combinado con daño vascular. *Laurus nobilis*, *Morus alba* y *Hamamelis virginiana* no desarrollaron cambios morfológicos suficientes para concluir algún patrón de daño hepatotóxico.

Discusión: Sólo se ha reportado un caso de daño hepático por *Gymnema sylvestre* en una mujer de 60 años, quien probablemente sufrió una reacción idiosincrática que desencadenó una respuesta autoinmune.

Conclusión: Nuestro estudio mostró más daño con patrón mixto caracterizado por granulomas, necro inflamación de tipo hepatitis aguda y daño vascular por dilatación sinusoidal producido por *Crataegus oxyacantha*, *Agathosma betulina* y *Arctostaphylos pungens*, esta última ha demostrado que el consumo de su fruta parece ser seguro si se usa durante corto tiempo, sin embargo, no se tiene registro del uso de su hoja.

MARCO TEÓRICO

La herbolaria hace referencia al conocimiento y uso terapéutico adquirido a lo largo del tiempo para el reconocimiento de plantas cuyos componentes activos son utilizados en el tratamiento de enfermedades, así como la receta o las dosis que debe utilizarse (1). Las medicinas herbales y sus preparados se han usado ampliamente durante miles de años en todo el mundo (2). Su antigüedad se remonta al año 2100 a.C. en las culturas China e India (3).

En el mundo precolombino se desarrolló una de las herbolarias más complejas del mundo debido a la riqueza cultural y étnica que se alcanzó en estas regiones; así pues, desde tiempos prehispánicos, diferentes grupos étnicos han usado plantas con fines medicinales (1). En 1552, Martín de la Cruz escribe en náhuatl su opúsculo sobre las hierbas medicinales, que fue traducido al latín por el xochimilca Juan Badiano con el título de *Libellus de medicinalibus indorum herbis*, en donde se reúnen los principales medicamentos utilizados por los indígenas, incluyendo el método de preparación, indicaciones y usos.

En julio de 1984 entra en vigor la Ley General de Salud y se dan las condiciones para la integración de una figura fundamental en el desarrollo de la farmacopea mexicana moderna; el 26 de septiembre del mismo año se crea la Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (CPFEUM), que da inicio a la historia contemporánea de la Farmacopea de nuestro país. En 2004 se publica la 8ª edición de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), que abarca controles de calidad para los medicamentos alopáticos, homeopáticos, herbolarios, dispositivos médicos y controles de calidad para los establecimientos como farmacias (4). Este documento tiene como propósito establecer los lineamientos oficiales relacionados con el control

de calidad, destinados a asegurar la idoneidad de las plantas utilizadas, poniendo especial énfasis en su identidad (nombre científico) y optimización. Además, trata de establecer los métodos de análisis y especificaciones técnicas que deberán cumplir las plantas y los derivados de ellas utilizados en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios, contribuir al mejoramiento de la calidad de los productos y a su uso adecuado, así como difundir y promover el potencial terapéutico de la flora de México. Sin embargo, la lista de especies de uso tradicional incluidas en la farmacopea herbolaria mexicana corresponde tan sólo a cerca del 1% del total de la flora de México (1).

En nuestro país, de acuerdo con cifras de la Secretaría de Salud, al menos el 90% de la población usa plantas medicinales; de ese 90%, la mitad usa exclusivamente las “plantas medicinales” para atender sus problemas de salud; el otro 50%, además de las plantas medicinales, usa la medicina alópata. En este sentido es explicable que en el mercado “El Sonora” de la Ciudad de México se vendan día con día aproximadamente unas 10 toneladas de plantas curativas. Se estima que la industria herbolaria de la Ciudad de México procesa y comercializa unas 2000 toneladas mensuales (5).

Desde el punto de vista de la importancia taxonómica, México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas con un total de 4500, después de China que tiene registradas 5000. En tercer lugar, está Colombia, con 2600 plantas. Estos son los primeros lugares mundiales en herbolaria. De la totalidad de esas plantas sólo se han estudiado en toda la historia unas 500. Desde el ámbito étnico, las plantas medicinales tienen una relevancia innegable: unos 10 millones de indígenas de unas 56 etnias, los cuales hablan alguna lengua ancestral, además del español, usan una herbolaria

regional ancestral y algunos incluso complementan esta práctica con alopátia en la clínica rural. Esas culturas están vivas y continúan transmitiendo oralmente este conocimiento milenario hasta el día de hoy (5).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce que no existe un marco jurídico internacional que regule el acceso a las plantas y su uso racional, ni la seguridad, la eficacia y la calidad de sus principios activos, pues, a pesar de que persiste un arraigado uso de la medicina tradicional, su aplicación ha superado fronteras ancestrales de países y culturas (1).

Se utilizan plantas y productos naturales, principalmente, como tés y aditivos en comida; mientras que los productos herbales manufacturados incluyen drogas y suplementos alimenticios (6). Los productos herbales deben considerarse por separado de otras formas terapéuticas no medicinales, alternativas o complementarias (7).

Frecuentemente el consumo de productos herbolarios o comúnmente denominados naturistas, no cuentan con una regulación sanitaria apropiada y se pueden comprar libremente (8). Ahora bien, la aceptación de un agente herbolario en la práctica para su uso con fines medicinales debe seguir una evaluación crítica porque, de no contar con ella, se pone en riesgo significativo la salud del consumidor (7). Como agentes medicinales, también los productos herbales tienen potencial de efectos adversos o secundarios, de la misma manera que las drogas patentadas (7). Desafortunadamente, una revisión aleatoria de ensayos controlados que evalúan medicinas herbales, revelaron que sólo el 15% de los estudios, proveen información sobre efectos adversos y seguridad (7).

Vale la pena aclarar que las drogas herbales se encuentran reguladas bajo una estricta vigilancia, mientras que el control para los suplementos herbales es menos exigente (6). En este sentido, existen guías para asegurar la calidad de los productos farmacéuticos y monitorear la seguridad de medicinas herbales en sistemas de fármaco-vigilancia (6). Sin embargo, a pesar de las recomendaciones para mejorar la calidad y evitar la variabilidad de especies de plantas en los preparados herbales, no es raro que existan fallas en los procesos de preparación. Puede haber peligros ostensibles dado que es posible que se presenten adulterantes, impurezas, contaminantes o hierbas mal identificadas (6).

Los productos herbales usados para tratar enfermedades existen tanto en crudo como en preparados comerciales. Los productos crudos (raíces, hojas, semillas, té, etc.) son más usados en países en desarrollo. Sin embargo, algunas veces se trata de mezclas preparadas en las que sus componentes no son bien conocidos y pueden contener contaminantes, como metales pesados, plaguicidas, microorganismos, etc. Los productos comerciales herbales como cápsulas o tabletas se usan más comúnmente en países desarrollados, los cuales varían en contenido y concentraciones de sus constituyentes químicos (3).

Ahora bien, muchas drogas terapéuticas medicinales utilizadas en la práctica clínica son aisladas de plantas, por ejemplo, atropina, colchicina, digoxina, entre otras. La importancia de la medicina derivada de las plantas (fitomedicina) está obviamente basada en el detalle que la farmacognosia trajo a la farmacéutica en los años pasados. Pero el conocimiento de botánica y química solos no siempre se traduce en un entendimiento de la farmacología clínica y terapéutica (7). A

pesar de que su potencial terapéutico no ha sido probado con investigaciones sistemáticas y rigurosas, la terapia herbal ha aumentado su uso para tratamiento de varias enfermedades, no sólo en el mundo oriental sino también en el occidental (3).

Desde que el Congreso de los Estados Unidos aprobó el Acta de Salud y Educación de los Suplementos Alimenticios (DSHEA) en 1994, el uso de suplementos alimenticios herbales ha aumentado su popularidad en los Estados Unidos (9). Se ha reportado que cerca de 70 millones de americanos usaron terapias medicinales alternativas en el 2002; de éstas, las más comunes eran terapias herbales con ventas de aproximadamente \$5 billones cada año. (9). La Asociación Americana de Productos Herbales (AHPS) estima que hay cerca de 3000 especies de plantas y 50 000 productos vendidos como suplementos herbales en los Estados Unidos (9). Los 10 preparados herbales más usados en Estados Unidos incluyen *echinacea*, ajo, ginko biloba, saw palmetto, ginseng, extracto de semilla de uva, té verde, hierba de San Juan, arándano y aloe (3).

Cabe mencionar que en México algunas las plantas que se consumen como medicinales no cuentan con estudios de toxicidad individual o usadas como mezclas y entre ellas tenemos a *Gymnema sylvestre* (Gurma), *Crataegus oxyacantha ssp* (Espina de Albar), *Morus alba* (Mora de árbol), *Laurus nobilis* (Laurel), *Agathosma betulina* (Bechu), *Hamamelis virginiana* y *Arctostaphylos pungens* (Pingüica). Se trata, precisamente del grupo de plantas que se estudian en la presente investigación.

1. La *Gymnema sylvestre* es la más estudiada y, por tanto, de la que más información se tiene. Es mejor conocida como Gurma, nombre que proviene del hindu y significa “destructor de azúcar”. Es una planta perteneciente a la familia

Apocynaceae. Se caracteriza por ser larga, trepadora, leñosa de hoja perenne, ovaladas. Crece especialmente en bosques monzónicos y matorrales, en alturas de hasta 1000-1200 m. Se encuentra en sur y centro de India, África tropical y Australia tropical; con menor frecuencia, crece en algunas zonas de Oceanía y América. Sus hojas se usan como digestivo, antiviral, diurético, antialérgico, hipoglucemiante, hipolipidémico, agente anti-obesidad y contra la caries dental. Su principal constituyente es el ácido gymnémico, una mezcla de al menos 17 saponinas diferentes. Este ácido se emplea como marcador para control de estandarización y calidad en los preparados comerciales que contienen *G. sylvestre*. Otros componentes químicos son la gymnemasaponina, gurmarín, conduritól, gymanmina, gypenosido, entre otros, todos ellos son los responsables de su efecto hipoglucemiante (10). Algunos estudios han demostrado varias vías en las que ejerce su efecto antidiabético: a) reducción de la absorción de glucosa en el intestino delgado, b) mejora de síntesis de glucógeno, glucólisis, gluconeogénesis en el hígado y músculo, c) estimulación de liberación de insulina de los islotes de Langerhans, d) interferencia en las papilas gustativas de la lengua para disminuir el sabor dulce de la comida, e) efecto antagonista de la hiperglucemia inducida por adrenalina, corticoesteroides y somatotropina, f) aumento de la sensibilidad periférica a la insulina (11). Sólo se ha reportado un caso de daño hepático por *Gymnema sylvestre* en una mujer de 60 años, quien probablemente sufrió una reacción idiosincrática que desencadenó una respuesta autoinmune (12).



Figura 1. Hojas de *Gymnema sylvestre* (Gurma).

2. *Crataegus oxyacantha*, conocida como espino de albar, pertenece a la familia *Rosaceae*. Es un árbol de hoja caduca con ramas espinosas y hojas lampiñas, aserradas, flores blancas y fruto ovoide. Se ha demostrado que posee propiedades anti-inflamatorias, anti-bacteriales, diuréticas, antiespasmódicas (13) y antioxidantes que protegen contra daño miocárdico y arritmias. Estos efectos son atribuidos a su contenido de flavonoides con procianidinas, las cuales también se conocen como proantocianidinas porque producen el pigmento antocianina responsable del color de algunas flores y frutas (14); son oligómeros y polímeros de unidades flavan-3-ol (epicatequina). La dosis diaria de procianidina puede variar desde 10 mg hasta 0.5 g; su principal fuente es el té, el chocolate, las manzanas, las peras, las uvas y el vino tinto. Se ha reportado que las procianidinas inhiben la peroxidación lipídica, la agregación plaquetaria y modulan la actividad de dianas moleculares relacionadas con la enfermedad, incluyendo la cicloxigenasa 2 y factor nuclear KB (14).



Figura 2. Hojas de *Crataegus oxyacantha* (Espino de albar).

3. *Morus alba*, es una especie de árbol perteneciente a la familia de las moráceas, miden hasta 15 m de altura. Son oriundos del centro y este de Asia, cultivados en Asia, Europa y América. Sus hojas con pecíolo de 1,5-2 cm y limbo de 4-6 por 4-5 cm, más o menos ovado, subagudo, irregularmente dentado o lobado, oblicuamente cordado, delgado, glabro excepto a lo largo de la nerviación, verde claro. Su fruta es conocida como mora de árbol, es comestible. Estudios recientes han demostrado que los extractos ricos en antocianinas del maíz morado, arándanos, fresas, madreselva y moras previenen la obesidad en modelos animales (15). Se cuenta también con la variante *Morus nigra*, comúnmente conocida como mora negra, se ha usado como analgésico, diurético, antitusivo, sedante, ansiolítico, hipotensor y anti-inflamatorio (16).



Figura 3. Hoja de Mora de árbol.

4. *Laurus nobilis* es un árbol perteneciente a la familia de las lauráceas, conocido como laurel, y es originario de la zona mediterránea. Sus hojas son azuladas, alternas, lanceoladas u oblongo-lanceoladas, de consistencia algo coriácea, aromáticas, con el borde en ocasiones algo ondulado. Tienen ápice agudo y base atenuada. Miden unos 3-9 cm de longitud y poseen corto peciolo. El haz es de color verde oscuro lustroso, mientras que el envés es más pálido. Las flores están dispuestas en umbelas sésiles de 4-6 flores de 4 pétalos que aparecen en marzo-abril, y son amarillentas. El fruto es una baya, ovoide, de 10-15 mm, negra en la madurez, suavemente acuminada con pericarpo delgado. Tiene semilla única de 9 por 6,5 mm, lisa. Madura a principios de otoño. Sus hojas son usadas como condimento en la cocina. Su uso medicinal se aplica contra enfermedades gástricas y como anti-inflamatorio. Se ha reportado que un constituyente del *laurus nobilis*, llamado sesquiterpene costunolide induce muerte celular e inhibe la absorción de alcohol. Se han presentado reacciones alérgicas donde el 87 % de los individuos estaban sensibilizados a costunolide en una concentración de 0.1 % (17)



Figura 4. Hoja de *Laurus nobilis* (Laurel).

5. *Agathosma betulina*, también conocida como Bechu, es una especie de arbusto perteneciente a la familia de las rutáceas, con hojas perenes, con tallos amarillos o rojos. Las hojas son opuestas, alternas, elípticas de margen serrado con glándulas oleosas en la base de cada diente y unas dimensiones de entre 14 y 25 mm de longitud y 6 a 14 mm de anchura de largo y ancho. Las flores son blancas o rosa pálido. Es nativa de las montañas de baja altura del oeste de Sudáfrica. Se usa para inflamación e infección del sistema urinario, así como estimulante del apetito, digestivo y anti-espasmódico. Sus constituyentes químicos mejor conocidos son mentone/isomentone, diosfenol, limoneno, pulegone/isopulegone y cis-/trans-8-mercapto-p-mentane-3-onas (18).



Figura 5. Hoja de *Agathosma betulina* (Bechu).

6. *Hamamelis virginiana*. Ésta planta es muy popular en Estados Unidos, donde es conocida como witch-hazel (avellana de bruja). Perteneciente a la familia de las *Hamamelidaceae*. Son arbustos de hoja caduca o árboles que alcanzan 3-8 m de altura. Las hojas son ovaladas de 4 a 16 cm de longitud y de 3 a 11 cm de ancho, con márgenes ondulados o lisos. Las flores se producen en los tallos deshojados en invierno, cada flor tiene cuatro pétalos delgados de 1.2 cm de color amarillo pálido. La fruta es una cápsula dividida que contiene una semilla

negra. Crece en la costa Atlántica de Norte América, se encuentra en bosques húmedos desde Nueva Escocia hasta Florida, así como en Texas. Se cultiva a pequeña escala en Europa, por lo que el material de comercio se obtiene principalmente del este de EUA y Canadá. Su flor, corteza y hojas son utilizadas por los Nativos Americanos para preparar tónicos y remedios. Esta planta es de las pocas aceptada por la Food and Drug Administration (FDA) regulada por estándares de seguridad y efectividad (19). La corteza es astringente, rica en taninos; su extracto se usa en medicina herbaria para el cuidado de la piel, para tratar heridas pequeñas, inflamación local o hemorroides. También se ha descrito propiedades antioxidantes y antivirales (20).



Figura 6. Hoja de *Hamamelis virginiana*.

7. *Arctostaphylos pungens*, mejor conocida como pingüica se distribuye desde el sur de Estados Unidos hasta Veracruz y Oaxaca. Pertenece a la familia *Ericaceae* y es una especie leñosa, perenne, ramificada desde la base con hojas elípticas de 1 a 3 cm de largo. La flor es blanca o rosa, agrupada en racimos de 5 a 8 flores. La fruta es una drupa globosa, lisa, de 5 a 8 mm, carnosa y comestible (21). Esta fruta contiene abundantes antocianinas bioactivas, que ha demostrado tener efecto antihiperlipidémico, con aumento de niveles sanguíneos de lipoproteínas de alto peso molecular (High Density Lipoproteins /

HDL-c). El consumo de esta fruta parece ser seguro si se usa durante corto tiempo (22).



Figura 7. Fruta de *Arctostaphylos pungens* (Pingúica).

El uso de drogas herbales y suplementos es popular en todo el mundo y percibida como segura; sin embargo, algunos productos herbales pueden causar reacciones adversas, incluyendo daño hepático (6). Muchos suplementos alimenticios, incluidas las vitaminas, los minerales y los extractos botánicos, han sido reconocidos como posibles causantes de hepatotoxicidad inducida por drogas (HTID) (23). Se han publicado 60 hierbas y productos herbales diferentes como potencialmente hepatotóxicos en 185 publicaciones que hablan sobre hepatotoxicidad por herbolaria (24). Algunas hierbas con toxicidad demostrada son *Teucrium chamaedrys* (camedrio o germander), *Celedonium majus* (celandina mayor), *Piper methysticum rhizoma* (kava-kava), *Larrea tridentata* (chaparral o gobernadora), *Cassia angustifolia* (senna), *Camellia sinensis* (té verde), *Cimifuga racemosa* (cohosh negro) (25 a 28).

La verdadera prevalencia del uso de productos herbales y la incidencia de hepatotoxicidad herbal no está bien conocida. (3) Basado en datos disponibles en cohortes de Drug-induced liver injury Network (DILIN) los productos herbales

están implicados en la causa de hepatotoxicidad entre 2 y 11 % de los pacientes con HTID y entre 5 y 10 % de los pacientes con falla hepática aguda (FHA) (3). El hígado es el principal responsable del metabolismo de nutrientes, como fármacos y sustancias no farmacológicas, lo que lo hace susceptible de daño (8). Como ya se dijo, las reacciones químicas adversas no están confinadas a las drogas farmacéuticas, los suplementos alimenticios y medicinas herbales casualmente auto-medicadas, también son hepatotóxicos potenciales (8). La hepatotoxicidad inducida por drogas (HTID) es la causa más frecuente de muerte asociada a insuficiencia hepática aguda (IHA) y representa la principal reacción adversa implicada en el abandono del desarrollo de futuros medicamentos en las fases preclínicas o clínica (8). La HTID es la causa del 10 % de hepatitis aguda y de ésta 40 % ocurre en pacientes mayores de 50 años. En algunas series el 10 % al 20 % corresponden a hepatitis fulminante o sub-fulminante (29). El riesgo de un curso fulminante es 20 % mayor que en caso de hepatitis viral aguda (1%). Sin embargo, los fármacos están menos relacionados (<1%) en hepatitis crónica o cirrosis (29).

La HTID puede ser intrínseca o idiosincrática. La intrínseca es aquella que depende de la dosis, es predecible, reproducible y a menudo es característica de un agente particular cuando se consume en grandes cantidades. El ejemplo más conocido es la ingestión de paracetamol y exposición a cloroformo. El mecanismo de lesión intrínseca puede ser directa, dañando a las células o a los organelos, o bien indirecta, a través de conversión de un xenobiótico en una toxina activa o a través de mecanismos inmunológicos (30). La HTID idiosincrática es aquella que ocurre de forma impredecible y no depende de la dosis; ésta es la forma más común de HTID y se estima que ocurre de entre 1/10

000 a 1/100 000 exposiciones (31). La mayoría de las reacciones idiosincráticas ocurren de cinco a 90 días después de la ingesta del fármaco; sin embargo, puede ocurrir hasta 12 meses después (32). Una hipótesis que explica la HTID idiosincrática es la generación de metabolitos reactivos durante las reacciones de biotransformación hepática de fase I, controladas por el citocromo P450 (CYP). La ausencia de un determinado CYP o la presencia de polimorfismo en uno o varios CYP, determinaría bien la inactivación del compuesto original (tóxico) o bien, la formación de metabolitos aberrantes (idiosincrasia metabólica). El resultado de este proceso es la presencia intracelular de radicales libres o compuestos electrofílicos que agotan la glucosilación de los hepatocitos, se unen covalentemente a proteínas, lípidos o ácidos nucleicos o inducen lipoperoxidación. La lesión citotóxica culmina en la muerte celular por necrosis o apoptosis (8). El efecto citotóxico también puede ser secundario al estrés oxidativo que se genera durante el metabolismo de las toxinas. En situación de estrés oxidativo se produce una depleción de adenosin trifosfato (ATP), la oxidación de grupos sulfhidrilo de las proteínas, trastornos en la hemostasis iónica y un aumento sostenido en la concentración intracelular de calcio. Todo ello conduce a la pérdida de la integridad celular.

En una minoría de casos el metabolito reactivo presumiblemente forma aductos con proteínas o con el propio CYP que lo ha generado, comportándose como un neoantígeno. Estos neoantígenos, formados a nivel del citosol, migran hacia la membrana celular vía vesicular o uniéndose a receptores de membrana de antígeno leucocitario humano (HLA), desde donde estimulan la respuesta inmune celular y humoral dirigida contra las células hepáticas, originando así las reacciones idiosincráticas inmuoalérgicas o por hipersensibilidad.

En raras ocasiones, la HTID idiosincrática sobreviene por un fallo genéticamente condicionado en los sistemas enzimáticos de detoxificación (reacciones de fase II), encargados de neutralizar los metabolitos reactivos, los cuales pueden dar lugar a determinados síndromes, como la colestasis, al inhibir transportadores específicos de la bilis, o la esteatosis microvesicular y esteatohepatitis al alterar la β -oxidación mitocondrial (8). La colestasis inducida por fármacos ocurre debido a disrupción de los filamentos de actina cercanos a los canalículos o a la inhibición de bombas transportadoras. Los defectos en la proteína tres de multidrogo resistencia (MDR3) conducen a excreción biliar defectuosa de fosfatidilcolina y, en consecuencia, originan la expresión de síndromes colestásicos de tipo familiar. Recientemente, se han implicado mutaciones en el MDR3 en predisposición a colestasis inducida por fármacos (8).

El diagnóstico de daño hepático tóxico es desafiante y suele considerarse de exclusión (33). No existen marcadores específicos o pruebas diagnósticas para la HTID; sin embargo, la Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) ha propuesto criterios para la terminología en la HTID, basados en pruebas biológicas, cronología y biopsia hepática. Se pueden definir 6 categorías de Drug Induced Liver Injury (DILI) con este sistema: 1) daño hepatocelular, 2) daño colestásico, 3) daño mixto, 4) daño agudo, 5) daño crónico y 6) enfermedad hepática crónica. (29) La herramienta preferida para valorar la causalidad de la hepatotoxicidad es la escala CIOMS. Otras herramientas conocidas son la Escala Naranjo de Probabilidad a Reacciones Adversas por Drogas (NHADRPS), el método introspectivo global de la OMS y el acercamiento causal ad hoc; sin embargo, la escala CIOMS es más específica para validar hepatotoxicidad. La escala Naranjo y la Roussel Uclaf Causality

Assessment Methad (RUCAM) producen un puntaje numérico, indicando que el diagnóstico de HTID es definitivo (o probable), posible o poco probable (29). El método de la OMS o el acercamiento ad hoc no son específicos para hígado ni válidos para hepatotoxicidad, por lo que son considerados obsoletos para evaluar causalidad en la hepatotoxicidad por herbolaria (34). Los criterios diagnósticos para HTID incluyen los cronológicos, considerados esenciales, los cuales requieren una historia clínica detallada, y los criterios clínicos, como la edad, laboratorios, antecedentes, signos y síntomas, y los criterios anatomopatológicos basados en la biopsia hepática (29). Los mejores sistemas validados para puntuación que consideran todos estos parámetros son el CIOMS y el RUCAM.

La biopsia hepática es útil cuando se sospecha hepatotoxicidad porque permite determinar el patrón de daño, sugiere mecanismos causales, confirma o sugiere un fármaco candidato, evalúa el grado de lesión o estadio y excluye o encuentra otras patologías (29).

El diagnóstico de daño hepático por drogas o toxinas empieza con una evaluación morfológica cuidadosa del hígado para identificar el tipo de daño celular o el patrón predominante. La hepatotoxicidad puede semejar cualquier otro tipo de enfermedad. Así que, identificar un patrón de lesión puede ser muy útil tanto para incluir, así como para excluir hepatotoxicidad como causa de disfunción hepática. Las hepatotoxinas pueden dañar uno o todos los tipos de células que se encuentran en el hígado, pero se debe poner atención especial a los hepatocitos, células de conductos biliares y células endoteliales. Ultimadamente, el tipo de daño celular va a depender del agente particular involucrado.

Kleiner en el 2009 categorizó los cambios morfológicos de hepatotoxicidad en 5 patrones morfológicos mayores: necro inflamatorio, colestásico, esteatosis, vascular y neoplasias (35). Complementando estos patrones, encontramos en el capítulo 13 del libro MacSween's, escrito por James H. Lewis y David E. Kleiner, dos patrones mayores más: Daño hepatocelular-colestásico mixto (hepatitis colestásica) y fibrosis/cirrosis (36). Los más comunes en biopsias por hepatotoxicidad son el necro inflamatorio y colestásico (35).

El patrón de daño necro inflamatorio también es llamado daño hepatocelular. Se caracteriza por daño citotóxico con muerte celular la cual puede estar dada por dos procesos: necrosis y apoptosis. Necrosis se refiere a desintegración destructiva de la célula aparentemente iniciada por daño a la membrana citoplasmática dejando solo detritus. La necrosis observada puede ser zonal, no zonal o masiva. Como regla general, la necrosis producida por hepatotoxinas intrínsecas es zonal, mientras que la producida por daño idiosincrático es no-zonal. Grados extremos de necrosis zonal y no-zonal puede resultar en necrosis masiva. La apoptosis (muerte celular programada) es un evento dependiente de energía donde la célula se encoje, su núcleo se fragmenta, la cromatina se condensa y se producen vesículas citoplasmáticas. Las células condensadas se conocen como apoptóticas o cuerpos acidofílicos individuales. La activación de las vías de apoptosis involucra al receptor del factor de necrosis tumoral alfa (rTNF α) o la activación de la vía de las caspasas intercelulares mediadas por Fas.

El patrón mayor necro inflamatorio se subdivide en 4 tipos: Necrosis coagulativa aguda (zonal), tipo hepatitis aguda, tipo mononucleosis y tipo hepatitis crónica.

La necrosis coagulativa aguda se caracteriza por ser zonal. La necrosis zonal pura puede involucrar la zona perivenular (zona 3), la cual es la más común, zona periportal (zona 1) o rara vez la zona media (zona 2), dependiendo el agente causal; y es usualmente el resultado de toxinas intrínsecas. Sin embargo, existen excepciones.

El daño tipo hepatitis aguda se caracteriza por múltiples áreas pequeñas de degeneración o necrosis focal. Suele ser resultado de un daño idiosincrático. Es predominantemente lobular, con infiltrado inflamatorio linfocitario y escasos hepatocitos apoptóticos dispersos. Puede verse aumento de eosinófilos que pueden ayudar a sugerir el diagnóstico de hepatotoxicidad. Otros datos de daño hepatocelular son la degeneración balonizante, esteatosis y cambios regenerativos como mitosis, formación de rosetas de hepatocitos y proliferación ductular de hepatocitos. En casos severos, pueden existir áreas de necrosis confluyente por muerte celular apoptótica extensa. La inflamación portal y la hepatitis de interface pueden estar presentes, como en el daño biliar, sin embargo, este no es el patrón dominante. Hay otro patrón secundario de hepatitis aguda que semeja a la hepatitis por infección de Virus de Epstein-Barr. En este patrón hay moldeamiento de linfocitos similar a la hepatitis por mononucleosis, se puede encontrar granulomas y eosinófilos.

El daño tipo hepatitis crónica, el cual no se relaciona con el tiempo de evolución ni con su persistencia, se caracteriza por infiltrado necro inflamatorio predominantemente portal y periportal. La inflamación portal es mixta constituida por linfocitos y macrófagos. Se puede encontrar células plasmáticas y eosinófilos. Hay hepatitis de interface asociada a fibrosis periportal. La inflamación lobular está presente en forma de necrosis focal con hepatocitos

apoptóticos dispersos. Los hepatocitos pueden tener cambios degenerativos o esteatosis como en la hepatitis aguda. La colestasis no es una característica de la hepatitis viral crónica hasta estadios tardíos de la enfermedad por lo que su presencia debería alertar al patólogo hacia la posibilidad de daño por drogas. También se puede encontrar daño ductal, aun en ausencia de estasis biliar y puede semejar cirrosis biliar primaria. La hepatitis crónica inducida por drogas puede estar asociada a un síndrome similar a la hepatitis autoinmune tipo 1 (AIH-1) con la presencia de anticuerpos antinucleares y anti-músculo liso (actina) en el suero, junto con hiperglobulinemia. En estos casos, el inicio de los síntomas es insidioso.

El daño granulomatoso es otro tipo de patrón de lesión necro-inflamatoria. Los granulomas se pueden presentar solos o asociados a otro tipo de daño hepático como hepatitis aguda o crónica, colestasis y esteatosis. Se han documentado varios agentes causales de hepatitis granulomatosa, usualmente como parte de síndrome de hipersensibilidad. Los microgranulomas son comunes en daño hepático inducido por drogas y en otras formas de enfermedad hepática, por lo que, no deberían considerarse, por si mismos, para el diagnóstico de hepatitis granulomatosa. Los granulomas de la hepatotoxicidad no tienen características específicas que los distinguen de sarcoidosis u otras causas de granulomas epitelioides no caseificantes, sin embargo, la presencia de eosinófilos puede sugerir la posibilidad de daño tóxico. Las características histológicas que sugieren daño por drogas incluyen la edad uniforme de los granulomas y la presencia de eosinófilos, cuerpos apoptóticos, colangitis aguda y/o vasculitis. En estos casos la curación ocurre sin secuelas.

El patrón mayor de daño colestásico se subdivide en 3: colestasis intrahepática aguda ("colestasis blanda), colestasis intrahepática crónica y esclerosis biliar. La colestasis intrahepática aguda consiste en acumulación de bilis en el citoplasma de los hepatocitos (colestasis hepatocelular) y en el canalículo (colestasis canalicular). La colestasis es más prominente en la zona 3. Algunas veces se puede acompañar con un grado moderado de daño parenquimatoso e inflamación (particularmente portal) asociado con colestasis aguda. Si la inflamación portal o lobular es significativa, el daño debería clasificarse como daño mixto hepatocelular y colestásico.

El daño colestásico crónico inducido por drogas puede adquirir una gran variedad de formas, sin embargo, la característica central es el daño crónico a los conductos intrahepáticos resultando en ductopenia. El daño puede simular cirrosis biliar primaria o colangitis esclerosante primaria. El daño ductal puede estar acompañado de colestasis hepatocanalicular y puede llevar a un síndrome de conductos evanescentes inducido por drogas, sin embargo, el grado de destrucción ductal e inflamación portal es menos prominente en el síndrome inducido por drogas que en la cirrosis biliar primaria. El daño colestásico crónico puede conducir a fibrosis y cirrosis o la recuperación puede ser muy lenta. Las características histológicas pueden incluir otros cambios vistos en colestasis crónica no inducida por drogas como colestasis periportal de hepatocitos, acumulación de cobre y reacción ductular. La colestasis aguda y el daño hepatocelular/colestásico mixto puede progresar a colestasis crónica mientras el daño progresa.

La esclerosis biliar es un término aplicado al daño en el árbol biliar producido por la infusión en la arteria hepática de floxuridina para carcinoma metastásico y en

el uso de agentes escolicidas para el tratamiento de quistes por equinococo. La lesión consiste en edema del epitelio ductal superficial y compresión, así como distorsión de la luz del conducto. El daño se ha atribuido a la oclusión de la arteria por lo que se ha llamado también “colangiopatía isquémica”.

La presencia de colestasis intrahepática aguda asociado con patrón necro inflamatorio o hepatitis crónica, resulta en un patrón mixto. Esta es una manifestación común del daño hepático inducido por drogas y sugiere fuertemente una etiología tóxica.

La esteatosis y la esteatohepatitis son otro patrón mayor de lesión. El término esteatosis hepática no alcohólica (non-alcoholic fatty liver disease NAFLD) engloba todas las enfermedades hepáticas que tiene algún grado de esteatosis en donde el alcohol u otras enfermedades no juegan algún rol. La NAFLD se asocia frecuentemente a resistencia a la insulina. Consecuentemente, la presencia de esteatosis en la biopsia hepática no es específica, se ha asociado con muchos agentes causales y puede encontrarse combinada con otras formas de daño hepático como necrosis zonal. Existen dos tipos principales de esteatosis: macro vesicular y microvesicular, ambos pueden estar presentes simultáneamente en varias combinaciones. La esteatosis microvesicular se asocia con presentaciones agudas y se caracteriza por un cambio espumoso en el citoplasma del hepatocito, compuesto por gotas pequeñas de lípidos que no desplazan al núcleo. En la esteatosis macro vesicular el hepatocito contiene una gota lipídica mediana o grande en el citoplasma y desplaza al núcleo hacia la periferia. Frecuentemente se pueden encontrar múltiples vacuolas de diferentes tamaños en un hepatocito, esta forma mixta de esteatosis debe considerarse como macro vesicular. La combinación de necrosis zonal y esteatosis se observa

en muchos agentes tóxicos. En la esteatohepatitis, el patrón de lesión básico es un daño hepatocelular en zona 3 caracterizado por degeneración balonzante, formación de cuerpos de Mallory-Denk con inflamación lobular variable. La inflamación portal puede estar presente. La fibrosis asociada es típicamente peri sinusoidal y perivenular al principio, pero puede progresar a formar puentes de fibrosis y cirrosis.

La fibrosis y cirrosis son patrones mayores de daño hepático por drogas. Son el resultado de una gran variedad de drogas y toxinas. Los agentes que causan hepatitis crónica, colestasis crónica y esteatohepatitis, todos, pueden producir cirrosis en su estadio terminal. El daño hepático agudo no parece conducir a cirrosis después de la resolución clínica y bioquímica con la discontinuación de la droga. La fibrosis puede ser secundaria a necrosis hepática masiva o submasiva si el paciente sobrevive sin trasplante. La fibrosis periportal ocurre en hepatitis aguda o crónica inducida por drogas y en colestasis crónica inducida por numerosas drogas. En daño agudo, la fibrosis periportal probablemente se resuelve rápidamente después de la discontinuación del agente. La cirrosis macronodular y micronodular, la hepatopatía congestiva que semeja cirrosis cardiaca y la lesión tipo cirrosis biliar pueden ser resultado de toxinas o daño por drogas. La cirrosis macronodular o micronodular pueden ser secuelas del daño continuo y repetitivo, o resultado de necrosis subaguda, o enfermedad necro inflamatoria crónica. Un sólo episodio de necrosis puede llevar a distorsión de la arquitectura, pero no a la cirrosis.

Muchas lesiones vasculares importantes pueden ser producidas por drogas. Las dos lesiones oclusivas son la trombosis de la vena hepática y la oclusión fibrótica de las vénulas hepáticas y sinusoides. Lesiones adicionales incluyen peliosis

hepática, dilatación sinusoidal, fibrosis peri sinusoidal y esclerosis hepatoportal. El flujo sanguíneo anormal, resultado de estas lesiones, pueden causar regeneración, resultando en hiperplasia nodular regenerativa. Estas lesiones están ligadas a una vía común de lesión endotelial. El depósito de colágeno en el área periportal y espacio de Disse, acompañado de reducción del calibre de la vena portal u obliteración de la vena portal pueden conducir a hipertensión portal. Esta forma de hipertensión portal no cirrótica es llamado "esclerosis hepatoportal". La enfermedad veno-oclusiva es un patrón de daño hepático donde hay obliteración de las venas hepáticas pequeñas por tejido conectivo laxo y edematoso que aparece entre el endotelio y el colágeno normal subyacente, estrechando la luz. Esto está asociado con el daño endotelial en el sinusoides particularmente en la zona 3, con la acumulación de detritus celulares, eritrocitos atrapados y matriz extracelular en el sinusoides; frecuentemente hay necrosis perivenular de los hepatocitos. La peliosis hepatis consiste en cavidades grandes llenas de sangre no revestidas de endotelio. La dilatación marcada de sinusoides se ha observado en hígados con peliosis. Ultra estructuralmente, la lesión se caracteriza por fibrosis peri sinusoidal y proliferación de células endoteliales sinusoidales, así como de las células estrelladas peri sinusoidales.

Se han asociado tumores benignos y malignos con drogas y toxinas. Algunos de ellos son los adenomas hepatocelulares, el carcinoma hepatocelular, el colangiocarcinoma y angiosarcomas. El adenoma hepatocelular está restringido a las mujeres en edad reproductiva altamente relacionado con el consumo de anticonceptivos orales (36).

Justificación

El consumo de productos derivados de herbolaria, así como suplementos alimenticios se ha popularizado a través de la población con la idea de tener efectos beneficiosos para la salud y percibidos como seguros debido a su origen natural. Sin embargo, la población suele desconocer los efectos adversos y daños a órganos como hígado y riñón. La confirmación diagnóstica de hepatotoxicidad por herbolaria puede ser un reto clínico debido a las características específicas de la enfermedad y la causalidad multifactorial. La biopsia hepática es considerada una herramienta útil que refuerza el diagnóstico o excluye otras causas potenciales de daño hepático.

¿Cuáles son los cambios histopatológicos en la hepatotoxicidad por algunos productos usados en la herbolaria?

Por esta razón es importante analizar los cambios histopatológicos en la hepatotoxicidad inducida por herbolaria para apoyar el diagnóstico ante una sospecha clínica.

Se realizó un ensayo preclínico, doble ciego, con grupos de ratones a los cuales se les administró dosis única de un solo extracto herbal por lote que consiste en: *Gymnema sylvestre* (Gurma), *Agathosma betulina* (Bechu), *Morus alba* (Mora de árbol), *Crataegus oxyacantha* ssp (Espina de Albar), *Arctostaphylos pungens* (Pingüica), *Laurus nobilis* (Laurel), y *Hamamelis virginiana*, a tres distintas dosis y se analizarán los cambios morfológicos en hígado y riñón con microscopía óptica, al día 14 de la administración o al momento del deceso si ocurriese antes.

Planteamiento del problema

El interés en el uso de herbolaria ha aumentado en todo el mundo de manera dramática. La confianza en los productos herbales en países subdesarrollados está dada, en parte, por su adherencia a las costumbres locales y tradiciones, pero también por el alto costo de las medicinas farmacéuticas. Otro motivo del creciente interés en el uso de herbolaria, se debe a la preocupación en los efectos adversos, secundarios o desilusión en los tratamientos médicos convencionales. La creencia que por ser productos herbales son naturales, por lo que deben ser eficaces y seguros también participa en las causas de su consumo (37). En México el uso de herbolaria es muy popular entre la población, de acuerdo con cifras de la Secretaría de Salud, al menos el 90% de la población usa plantas medicinales (5). Nuestro país ocupa el segundo lugar a nivel mundial en número de plantas medicinales registradas con un total de 4500, después de China que tiene registradas 5000. De la totalidad de esas plantas sólo se han estudiado en toda la historia unas 500 (5). Se conoce poco sobre su farmacocinética o su dosis efectiva no está bien establecida (37). Las reacciones químicas adversas no están confinadas a las drogas farmacéuticas, los suplementos alimenticios y medicinas herbales casualmente auto medicadas, también son hepatotóxicos potenciales (8). Se han publicado 60 hierbas y productos herbales diferentes como potencialmente hepatotóxicos en 185 publicaciones sobre hepatotoxicidad por herbolaria (24). De acuerdo con la expansión del uso de productos herbales, el potencial daño hepático por estos productos a aumentado (37). Algunas hierbas con toxicidad demostrada son *Teucrium chamaedrys* (camedrio o germander), *Celedonium majus* (celandina mayor), *Piper methysticum rhizoma* (kava-kava), *Larrea tridentata* (chaparral o

gobernadora), *Cassia angustifolia* (senna), *Camellia sinensis* (té verde), *Cimifuga racemosa* (cohosh negro) (25 a 28). La cantidad de plantas empleadas en herbolaria para uso medicinal es numerosa, sin embargo, son pocas las que cuentan con estudios publicados donde se evalúan sus efectos tanto beneficiosos como adversos. En nuestra población, se ha documentado un incremento en la toxicidad hepática, renal y enteral, por los productos herbarios que se utilizan en el día a día, con la creencia de tener un efecto benéfico sobre la salud; sin embargo, hasta el momento hay poca información si estos productos causan toxicidad solo por la exposición aislada o si es dependiente del tiempo y dosis de la exposición. Por lo que es necesario ampliar los estudios de los efectos adversos de dichas plantas para poder informar sobre la seguridad en la salud de sus consumidores.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar los cambios morfológicos en el hígado en un modelo de ratón producidos por el consumo de las siguientes plantas: *Gymnema sylvestre* (Gurma), *Agathosma betulina* (Bechu), *Morus alba* (Mora de árbol), *Crataegus oxyacantha* ssp (Espina de Albar), *Arctostaphylos pungens* (Pingüica), *Laurus nobilis* (Laurel) y *Hamamelis virginiana*.

Objetivos secundarios

1. Evaluar toxicidad aguda en hígado, dosis dependiente de *Gymnema sylvetre* (Gurma).
2. Evaluar toxicidad aguda en hígado, dosis dependiente de *Crataegus oxyacantha* (Espino de albar).
3. Evaluar toxicidad aguda en hígado, dosis dependiente de *Morus alba* (Mora).
4. Evaluar toxicidad aguda en hígado, dosis dependiente de *Laurus nobilis* (Laurel).
5. Evaluar toxicidad aguda en hígado, dosis dependiente de *Agathosma betulina* (Bechu).
6. Evaluar toxicidad aguda en hígado, dosis dependiente de *Hamamelis virginiana* (Hamamelis).
7. Evaluar toxicidad aguda en hígado, dosis dependiente de *Arctostaphylos pungens* (Pingüica).

Hipótesis de trabajo

La administración de *Gymnema sylvetre*, *Crataegus oxyacantha*, *Morus*, *Laurus nobilis*, *Agathosma betulina*, *Hamamelis virginiana*, y *Arctostaphylos pungens*, es tóxico en hígado dosis dependiente.

Diseño del estudio

Estudio experimental (estudio preclínico) sobre la base de un modelo de ratón. Estudio para evaluar toxicidad aguda en hígado por 7 extractos herbales (*Gymnema sylvetre*, *Crataegus oxyacantha*, *Morus*, *Laurus nobilis*, *Agathosma betulina*, *Hamamelis virginiana*, y *Arctostaphylos pungens*) administrados por vía oral, en 3 dosis diferentes.

Material y métodos

Se realizó un estudio pre-clínico en la Unidad de Investigación en Farmacología, con 132 ratones hembra, nulíparas, no embarazadas, de la cepa Balb-c, a quienes se les administró un extracto de 7 plantas diferentes, cada lote de planta con 18 ratones divididos en 3 niveles de dosis única, 30mg, 300mg y 3000mg administrada por vía oral y un grupo control de 6 ratones sanos que no recibieron extracto herbal. Se realizó eutanasia al día 14 posterior al comienzo de la administración del extracto.

Material vegetal

Las siete muestras vegetales se obtuvieron directamente con los familiares de un paciente que ingresó al Hospital de Especialidades al Servicio de Gastroenterología por intoxicación debido al consumo de productos herbales. El

material vegetal: *Gymnema sylvetres*, *Crataegus oxyacantha*, *Morus alba*, *Laurus nobilis*, *Agathosma betulina*, *Hamamelis virginiana*, y *Arctostaphylos pungens*, fue identificado y fue proporcionado por la Maestra en Ciencias Abigail Aguilar Contreras, Jefa del Herbario Medicinal del IMSS.

Preparación de los extractos

Se utilizó *Gymnema sylvetres*, *Crataegus oxyacantha*, *Morus alba*, *Laurus nobilis*, *Agathosma betulina*, *Hamamelis virginiana*, y *Arctostaphylos pungens*. Los extractos se obtuvieron por maceración del material vegetal (20 g) con etanol (300 ml), posteriormente se filtraron y se evaporaron a sequedad en un rota-evaporador a presión reducida. Una vez secos y a peso constante los extractos se guardaron en refrigeración a 4 °C en frascos sellados hasta el momento de su uso para determinar la actividad.

Animales (Población de estudio)

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) cepa Balb-C haloxénico, engendrado y producido, en condiciones controladas, con claros antecedentes genéticos y microbiológicos. Es mamífero de sangre caliente, hábitos nocturnos de comportamiento influenciado por feromonas. Posee un agudo sentido de la audición, por lo que se alteran rápidamente con los ruidos. Su sentido del olfato está muy desarrollado. Su visión es muy pobre y no pueden percibir colores. En la órbita del ojo posee unas glándulas con forma de herradura llamadas glándulas Harderianas, cuando el ratón está en estrés, excreta en la zona periocular una sustancia de color marrón llamada porfirina. Por su pequeño tamaño son muy susceptibles a cambios ambientales, puesto que una variación

de la temperatura entre 2-3°C, puede afectar su temperatura corporal y modificar su fisiología. El tamaño del ratón adulto varía entre 12 a 15cm desde la punta de la nariz a la punta de la cola y pesa aproximadamente 20 ± 2 g. Tiene una vida útil de 10 a 12 meses y se obtiene de 8 a 10 camadas. Es un animal sociable y se mantiene en grupos sin ningún inconveniente (38).

Procedimiento Metodológico

Este estudio tiene como base la Guía para la Prueba de Químicos. Toxicidad oral aguda- Método de clase de toxicidad aguda 423 del 2001 (OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method) (39) donde se establece el uso de 3 a 6 animales por cada nivel. El nivel de inicio de dosis es desde 5, 50, 300, 2000 hasta máximo 5000mg/kg de peso corporal. Nuestro estudio constó de 132 ratones divididos en 8 grupos, 7 de ellos recibieron un extracto herbal a 3 dosis diferentes y un grupo control que no recibirá extracto.

Se emplearon ratones (*Mus musculus*) cepa Balb-C, hembras nulíparas, no embarazadas de 6 semanas de edad, sanas de 20 ± 2 g de peso debido a que se ha demostrado que tienen una sensibilidad a los tóxicos ligeramente mayor que los machos. Se mantuvieron dentro del bioterio de Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS en un cuarto de alojamiento, dentro de cajas de 468cm² y altura de 12cm, fabricadas con plástico transparente con tapa removible y perforada, con piso sólido cubierto en su totalidad con viruta de madera. Cada caja contuvo 6 ratones identificados con líneas horizontales de tinta en sus colas. El ambiente se mantuvo a una temperatura de 18 a 26°C con humedad relativa de 40-70% con sistema de ventilación que cubrió un mínimo de 15 a 18 recambios de aire

por hora durante 24 horas. Se iluminaron 12h con luz artificial tipo luz de día con lámparas fluorescentes y 12h de oscuridad; con una intensidad de ruido menor a 85dB. Se alimentaron con 3 a 6 g diarios de alimento comercial para roedores constituido por 17-24% de proteína cruda, 4-11% de grasa cruda, 3-6% de fibra cruda, 5-7% de cenizas sin vitamina C, permitiendo un libre acceso de 3-7ml de agua al día.



Figura 8. Caja de almacenamiento.

Se administraron los 7 extractos a tres dosis (3000 mg/kg, 300 mg/kg y 30 mg/kg) y con una n=6 por cada dosis. Cada muestra se administró en volumen de 0.5 ml para cada animal.

A cada grupo se le administró dosis única del extracto de una sola muestra herbal (cegada), catalogada con un número arábigo del 1 al 7, y con base en la dosis del extracto se sub agruparon en 3 más, designados como sigue:

A) 18 ratones recibieron el extracto de la planta-1(Pr-1):

6 ratones Pr-1 a dosis de 30mg/kg, 6 ratones Pr-1 a dosis de 300mg/kg y 6 ratones Pr-1 a dosis de 3000mg/kg.

B) 18 ratones recibieron el extracto de la planta-2 (Pr-2):

6 ratones Pr-2 a dosis de 30mg/kg, 6 ratones Pr-2 a dosis de 300mg/kg y 6 ratones Pr-2 a dosis de 3000mg/kg.

C) 18 ratones recibieron el extracto de la planta-3 (Pr-3):

6 ratones Pr-3 a dosis de 30mg/kg, 6 ratones Pr-3 a dosis de 300mg/kg y 6 ratones Pr-3 a dosis de 3000mg/kg.

D) 18 ratones recibieron el extracto de la planta-4 (Pr-4):

6 ratones Pr-4 a dosis de 30mg/kg, 6 ratones Pr-4 a dosis de 300mg/kg y 6 ratones Pr-4 a dosis de 3000mg/kg.

E) 18 ratones recibieron el extracto de la planta-5 (Pr-5):

6 ratones Pr-5 a dosis de 30mg/kg, 6 ratones Pr-5 a dosis de 300mg/kg y 6 ratones Pr-5 a dosis de 3000mg/kg.

F) 18 ratones recibieron el extracto de la planta-6 (Pr-6):

6 ratones Pr-6 a dosis de 30mg/kg, 6 ratones Pr-6 a dosis de 300mg/kg y 6 ratones Pr-6 a dosis de 3000mg/kg.

G) 18 ratones recibieron el extracto de la planta-7 (Pr-7):

6 ratones Pr-7 a dosis de 30mg/kg, 6 ratones Pr-7 a dosis de 300mg/kg y 6 ratones Pr-7 a dosis de 3000mg/kg.

Además, se contó con un grupo control constituido por 6 ratones hembras sanas, nulíparas no embarazadas a las cuales no se les administró el extracto herbal y se alimentaron como dictan las normas.

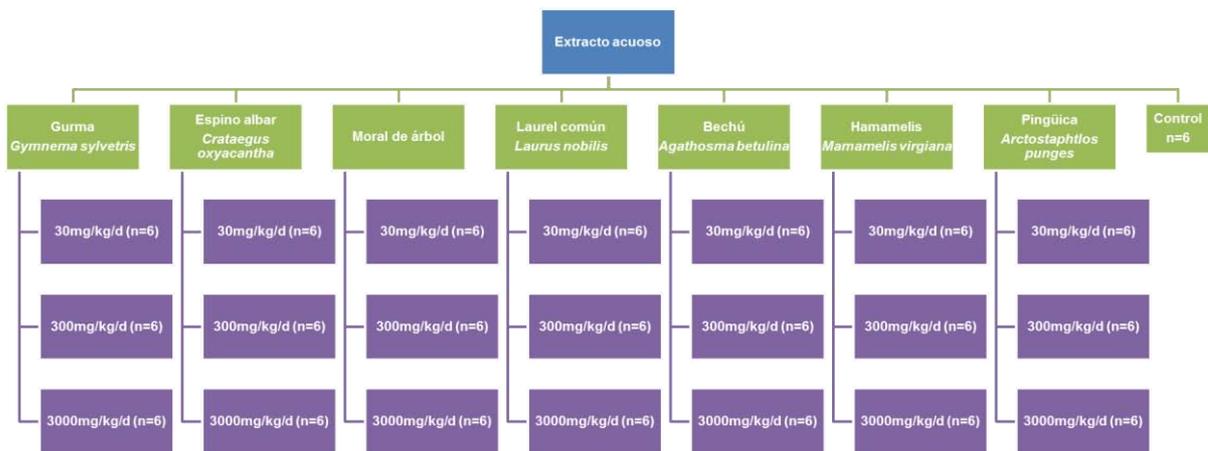


Figura 9. Esquema de procedimiento metodológico.

Al iniciar la prueba de toxicidad aguda a los animales se les dejó en ayuno previo de 12 horas con libre acceso al agua, se administró los extractos vía intragástrica y 4 horas después de la administración se le dio alimento y agua a libre demanda. Se registró la mortalidad a las 4 horas y 72 horas posteriores a la administración. Después de 14 días, se procedió a la eutanasia de los animales sobrevivientes por dislocación cervical manual para evitar la contaminación de los tejidos con sustancias químicas empleadas en los métodos recomendados en la NOM-062-ZOO-1999. Se tomó el ratón por la base de la cola con una mano para su acomodo y se colocó sobre una superficie donde el animal se sostuvo, con los dedos índice y pulgar de la otra mano o bien en su defecto un instrumento delgado pero rígido, se colocaron sobre la base del cráneo y se ejerció tracción hacia atrás del animal a través de la base de la cola, para ocasionar la dislocación cervical.

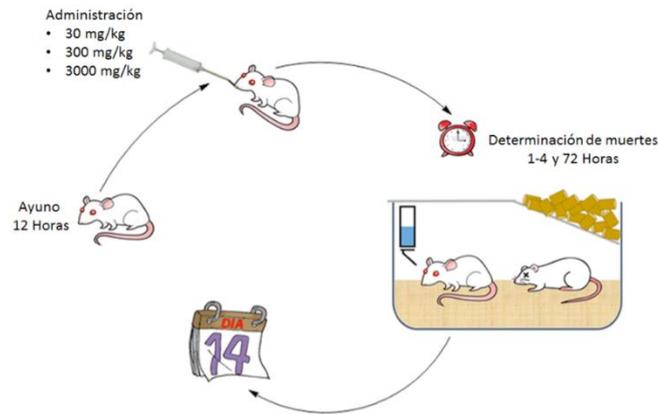


Figura 10. Procedimiento metodológico de modelo de toxicidad aguda.

Estudio histopatológico

Inmediatamente, posterior a la eutanasia o muerte espontánea, los ratones se enviaron al servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Especialidades del CMN SXXI donde se les realizó necropsia con evisceración en bloque de órganos abdominales (técnica de Ghon) con una incisión longitudinal a la línea media, desde la región submentoniana hasta el pubis empleando guantes del 61/2, un mango de bisturí número 3 con hojas de número 10, pinzas de disección sin dientes, tijeras rectas y gasas. Se les disecó el hígado empleando tijeras rectas, pinzas sin dientes y gasas. Se lavaron los órganos para eliminar manchas de sangre o coágulos.

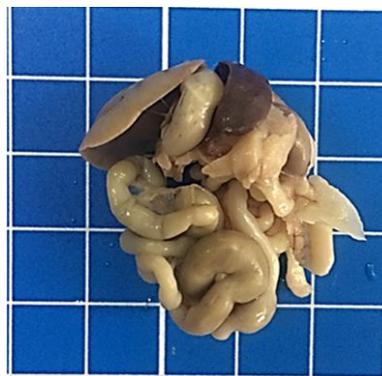


Figura 11. Bloque eviscerado de órganos del ratón.

Posteriormente, los hígados completos se dejaron en un frasco de vidrio con tapa de goma y formalina al 10 % durante 24 horas para su fijación. Una vez fijados los hígados, se les realizó un corte longitudinal axial para colocar en una cápsula de plástico un corte rectangular de 1.5x1cm, la cual se identificó con la planta, dosis y ratón correspondiente.



Figura 12. Cápsula con muestra de hígado del ratón.

Dichas cápsulas se entregaron a los histotecnólogos del servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Especialidades del CMN SXXI, quienes colocaron las cápsulas en el procesador de tejidos Thermo Scientific Shandon Citadel 1000 ® con capacidad para 60 cápsulas. Las cápsulas pasaron por 12 vasos los cuales componen el carrusel del procesador automático. El primer vaso contenía formol y las cápsulas se sumergieron en él durante 1h, el segundo vaso contenía formol y se sumergieron durante 1h, el tercer vaso contenía Alcohol al 70% con tiempo de inmersión de 1h 30min, el cuarto vaso contenía alcohol al 80% y se sumergieron durante 1h y 30min, el quinto vaso contenía alcohol al 96% con tiempo de inmersión de 1h 30 min, los vasos sexto, séptimo y octavo contenían alcohol al 100% con tiempo de inmersión de 1h en cada uno, los vasos noveno

y décimo contenían xylol con tiempo de inmersión 1h 30min cada uno, los vasos onceavo y doceavo contenían parafina con tiempo de inmersión de 2h cada uno. Terminado el proceso, se recogieron las cápsulas para continuar con la inclusión y creación manual del bloque de parafina con la orientación adecuada del tejido. Se realizaron cortes de 3 micras de grosor, con el micrótomo, obteniendo tiras delgadas del tejido en parafina. Las tiras de parafina se pasaron al baño de flotación a una temperatura de 40-45° para su estiramiento. Estas tiras se colocaron sobre un portaobjetos. Se colocaron las laminillas en una estufa a 50° durante 3h, para su secado exhaustivo. Una vez secas se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se sumergieron las laminillas en xilol durante 2-10 minutos, etanol al 100° durante 2-10 minutos, etanol al 96° durante 10 minutos, se repitió este paso y se continuó con agua destilada durante 10 minutos, hematoxilina durante 3 minutos, agua corriente durante 15 minutos, agua destilada durante 2-10 minutos, eosina durante 30 segundos, etanol 80° durante 15 segundos, etanol 96° durante 30 segundos, etanol 100° durante 5 minutos, etanol 100° durante 10 minutos y por último xilol durante 2-10 minutos. El proceso se finalizó con la colocación de una gota de resina seguida de un cubre-objetos.

Se analizaron 12 laminillas diariamente durante 10 u 11 días. Los cambios morfológicos se anotaron en la tabla (Anexo B).

Definición de variables

VARIABLE	TIPO	ESCALA MEDICIÓN	DEFINICIÓN OPERACIONAL
<i>Gymnema sylvestre</i>	Nominal	Presente	Planta trepadora, leñosa con hojas perenne, acuminadas, ovaladas de 3-5cm de largo y 0.7-3cm de ancho, verde-marrón, olor y sabor amargo.
<i>Crataegus oxyacantha</i>	Nominal	Presente	Es un árbol de hoja caduca con ramas espinosas y hojas lampiñas, aserradas, flores blancas y fruto ovoide.
<i>Morus alba</i>	Nominal	Presente	Fruto producto de un árbol de la familia de las moráceas que mide hasta 15m de altura, con infrutescencias de 2.5x1cm, blancas o blanco rosadas o negras.
<i>Laurus nobilis</i>	Nominal	Presente	Arbusto o árbol perenne de 5-10m de altura. Hojas azuladas, alternas, lanceoladas u oblongo-lanceoladas, aromáticas con

			borde ondulado, mide 3-9cm de longitud.
<i>Agathosma betulina</i>	Nominal	Presente	Arbusto de hojas perenne con tallos amarillo o rojizos erectos profusamente ramificados de hasta 1m de altura. Hojas opuestas, elípticas de margen serrado, miden 14-25mm de longitud y 6-14mm de anchura. Flores blancas de hasta 20mm de longitud.
<i>Hamamelis virginiana</i>	Nominal	Presente	Árbol de 2-7m de altura. Hojas alternas y perennes. Flores en grupos de 3-4 sujetas en el mismo involucro. Fruto en una cápsula con forma de avellana.
<i>Arctostaphylos pungens</i>	Nominal	Presente	Arbusto de la familia Ericaceae, crece hasta 3m. Hojas maduras, coriáceas, verdes, ovals de hasta 4cm., con flores en racimo. El fruto es una drupa de 5-8mm de ancho.

VARIABLE	TIPO	ESCALA MEDICIÓN	DEFINICIÓN OPERACIONAL
Crecimiento nuclear	Cualitativa dicotómica	Presente / Ausente	Hepatocitos de 25 a 30 miras con núcleo central de mas de 20 micras de diámetro.
Binucleación	Cualitativa dicotómica	Presente / Ausente	Hepatocitos con dos núcleos centrales.
Necrosis hepatocelular	Cualitativa dicotómica	Presente / Ausente	Se define como zonas de hepatocitos necróticos o hepatocitos apoptóticos individuales caracterizados por núcleo picnótico hipercromático y citoplasma eosinofílico.
Inflamación interlobulillar	Cualitativa dicotómica	Presente / Ausente	Presencia de linfocitos, células plasmáticas o eosinófilos en el

			parénquima interlobulillar.
Granulomas	Cualitativa dicotómica	Presente / Ausente	Presencia de granulomas no caseificantes.
Inflamación centrolobuillar	Cualitativa dicotómica	Presente / Ausente	Células inflamatorias localizadas en el centro del lobulillo.
Células plasmáticas	Cualitativa dicotómica	Presente / Ausente	Célula inflamatoria de 10 micras con núcleo excéntrico, cromatina en "rueda de carreta" citoplasma eosinófilo con área perinuclear clara.
Neutrófilos	Cualitativa Dicotómica	Presente / Ausente	Célula inflamatoria de 7 micras con núcleo multilobulado, hipercromático, citoplasma eosinófilo.
Eosinófilos	Cualitativa Dicotómica	Presente / Ausente	Célula inflamatoria de 7 micras con

			núcleo bilobulado, hiper cromático, citoplasma con gránulos eosinófilos.
Degeneración balonizante	Cualitativa dictotómica	Presente / Ausente	Hepatocitos con aumento 2 veces del tamaño normal con citoplasma amplio, claro y núcleo excéntrico.
Datos de regeneración	Cualitativa dicotómica	Presente / Ausente	Hepatocitos dispuestos en estructuras circulares tipo rosetas o binucleación.
Colestasis	Cualitativa dicotómica	Presente / Ausente	Presencia de pigmento biliar verde, granular en el citoplasma de hepatocitos o denso en el canalículo o en los conductos biliares.

Ductopenia	Cualitativa dicotómica	Presente / Ausente	Ausencia de conductos biliares en más de 50% de los espacios porta.
Proliferación de colangiolo	Cualitativa dicotómica	Presente / Ausente	Aumento en el número de colangiolo en el espacio porta, adyacente a la placa limitante.
Inflamación portal y periportal	Cualitativa- Dicotómica	Presente / Ausente	Presencia de linfocitos, células plasmáticas, macrófagos o eosinófilos en el espacio portal, en placa limitante o en zona 1 del lobulillo.
Esteatosis macrovesicular	Cualitativa- Dicotómica	Presente / Ausente	Presencia de hepatocitos con vacuola grande de lípido citoplasmática que desplaza el núcleo a la periferia.

Esteatosis microvesicular	Cualitativa dicotómica y cuantitativa	Presente/Ausente Porcentaje	Porcentaje de hepatocitos con múltiples vacuolas pequeñas de lípidos citoplasmática que no desplazan el núcleo a la periferia.
Esteatosis mixta	Cualitativa Dicotómica	Presente / Ausente	Presencia de hepatocitos con múltiples vacuolas lipídicas intracitoplasmáticas pequeñas y hepatocitos con una vacuola lipídica grande intracitoplasmática.
Dilatación sinusoidal	Cualitativa dicotómica	Presente/Ausente	Aumento en el tamaño y congestión de eritrocitos en la luz del sinusoide
Peliosis hepática	Cualitativa dicotómica	Presente/Ausente	Cavidades grandes llenas de sangre no revestidas de endotelio.

Enfermedad veno-oclusiva	Cualitativa dicotómica	Presente/Ausente	Obliteración de las venas hepáticas pequeñas con depósito de colágeno laxo y edematoso entre el endotelio y el colágeno subyacente.
Fibrosis portal	Cualitativa dicotómica	Presente/ausente	Ensanchamiento del espacio porta por depósito de colágena.
Puentes de fibrosis	Cualitativa dicotómica	Presente/ausente	Depósito de colágena que va de un espacio porta a otro, de vena central a espacio portal o de vena central a vena central.
Cirrosis	Cualitativa dicotómica	Presente/ausente	Pérdida de la arquitectura hepática por nódulos de regeneración

			rodeados por colágena.
Neoplasias	Cualitativa dicotómica	Presente/ausente	Proliferación de células atípicas neoplásicas malignas o benignas.

Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva para las variables nominales. Los resultados se expresaron en proporciones, media (\pm DE), y mediana (intervalos). Los datos estadísticos fueron evaluados utilizando ANOVA, seguido por la prueba de Turkey (análisis posthoc). Un valor de $p < 0.05$ será estadísticamente significativo.

Consideraciones éticas

Se consideró como objetivo primordial el obtener resultados experimentales sin causar dolor o angustia a los animales. Se procuró refinar los procedimientos para evitar que estos causen sufrimiento por lo que se tuvo en cuenta el respeto, afecto y gratitud. Se siguió el principio de las tres R propuesta por William Russel y Rex Burch en 1959: Reducir, Reemplazar y Refinar. Reducir al máximo el número total de animales utilizados en investigación. Reemplazar, siempre que sea posible, el animal de experimentación por otro modelo experimental, cuando no resulte imprescindible el uso de animales. Refinar los métodos y técnicas utilizados de modo que produzcan al animal el menor sufrimiento posible. Para

lograr esto y para evitar riesgos ocupacionales se siguieron normas de buenas prácticas de laboratorio. La manipulación de los animales de laboratorio se realizó en apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Anexo A), sobre técnicas para el cuidado y uso de animales de laboratorio. En el apartado 4 correspondiente a las disposiciones generales de uso de animales, todo el artículo 5.1 que especifica condiciones del uso de roedores como animales en experimentación. Los animales de laboratorio se mantuvieron y se manipularon en el Bioterio del CMN S XXI que contó con las especificaciones del artículo 6; nos apeamos al artículo 8.2 para la administración de fluidos y sustancias. Se realizó eutanasia de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999 en su artículo 9.5.

Carta de consentimiento

El protocolo no involucra trabajo con seres humanos por lo que no se requiere carta de consentimiento (Anexo C).

Comité de Investigación y Ética.

Este protocolo y cualquier material que lo acompañe fueron sometidos por el investigador a un Comité de Ética e Investigación. La aprobación se obtuvo antes de iniciar el estudio y se documentó en una carta al investigador en la que se especificó la fecha en que se obtuvo dicha aprobación.

Aspectos de bioseguridad

La Unidad de Investigaciones Médicas en Farmacología y el bioterio del CMN Siglo XXI cuenta con el material, equipo, infraestructura y logística necesarios

para el desarrollo del proyecto de investigación de acuerdo con las normas y reglamentos:

a) Se cuenta con los permisos y/o licencias oficiales que se requieran para llevar a cabo el trabajo propuesto.

b) NOM-062-ZOO-1999 artículos 4o fracción III, 12 fracción XIV, 17 y 18 fracción VI de la Ley Federal de Sanidad Animal

c) Reglamento de la Ley de Protección a los Animales del Distrito Federal artículo 5º fracción IV

d) NOM-033-ZOO-1995 artículo 4o fracciones I, III y V, 12, 16, 17 y 44 de la Ley Federal de Sanidad Animal

e) NOM-087-ECOL-SSA1-2002

f) Reglamento de la Ley General de Salud en Material de Investigación para la Salud: Título cuarto, capítulo I, artículo 75, 77; Título séptimo, capítulo único

En el momento que sea requerido las comisiones de Ética y bioseguridad podrán revisar:

a) Las instalaciones de los laboratorios participantes para constatar que se encuentran en estado ideal de operación y son adecuadas para llevar a cabo la investigación propuesta.

b) El equipo utilizado se encuentra en condiciones óptimas para su operación.

c) El equipo personal de protección se encuentran en estado satisfactorio de operación.

d) Los involucrados en el proyecto, incluyendo a los estudiantes que participaron en las diferentes etapas de la investigación, tienen la capacitación y experiencia necesaria para trabajar con el material señalado anteriormente.

e) Se mantuvieron las condiciones adecuadas de instalaciones, equipo y personal durante el desarrollo del proyecto.

f) Los desechos biológicos se transportaron en bolsas amarillas al bioterio del CMN Siglo XXI o del laboratorio de Farmacia de la UAEH en contenedores dentro de un cuarto frío para su incineración por parte de la empresa contratada para este servicio.

g) Los desechos químicos que se generaron durante el desarrollo de los experimentos y procesamiento de muestras se colocaron en recipientes de vidrio para ser recogidos por una empresa encargada en recuperar los solventes

RESULTADOS

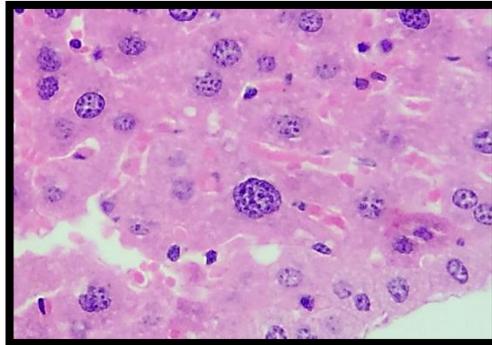
Después de la administración de diferentes dosis de: *Gymnema sylvetres*, *Crataegus oxyacantha*, *Morus alba*, *Laurus nobilis*, *Agathosma betulina*, *Hamamelis virginiana*, y *Arctostaphylos pungens*, los ratones fueron monitoreados para signos de toxicidad. Los ratones mostraron actividad normal y no hubo mortalidad hasta el final del estudio.

Hallazgos histopatológicos en hígado

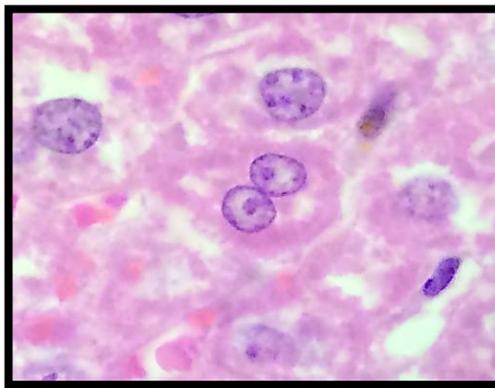
El hígado del grupo control mostro la arquitectura de los hepatocitos conservada, con núcleos prominentes, la zona portal y vena central con signos de inflamación o necrosis no significativos.

El hígado de los ratones tratados con el extracto herbal muestran diferentes cambios morfológicos: crecimiento nuclear ($p=.001$), binucleación ($p=.002$), degeneración balonzante ($p=.000$), inflamación interlobulillar ($p=.000$), inflamación centrolobuillar ($p= .000$), inflamación portal ($p=.000$), infiltrado por neutrófilos ($p=.002$), granulomas no caseificantes ($p=.000$) y dilatación sinusoidal ($p=.000$). Otros hallazgos no significativos fueron: inflamación periportal ($p=.860$), infiltrado por eosinófilos ($p=.905$), necrosis hepatocelular $<5\%$ ($p=.057$), colestasis hepatocelular ($p=.980$), esteatosis macrovesicular ($p=.180$), esteatosis microvesicular ($p=1$), y esteatosis mixta ($p=.999$). En toda la muestra no observamos: hepatitis de interfase, células plasmáticas, necrosis hepatocelular del 5-30%, necrosis hepatocelular del 30-70%, necrosis hepatocelular $>70\%$, patrón rosetoide, colestasis canalicular, ductopenia,

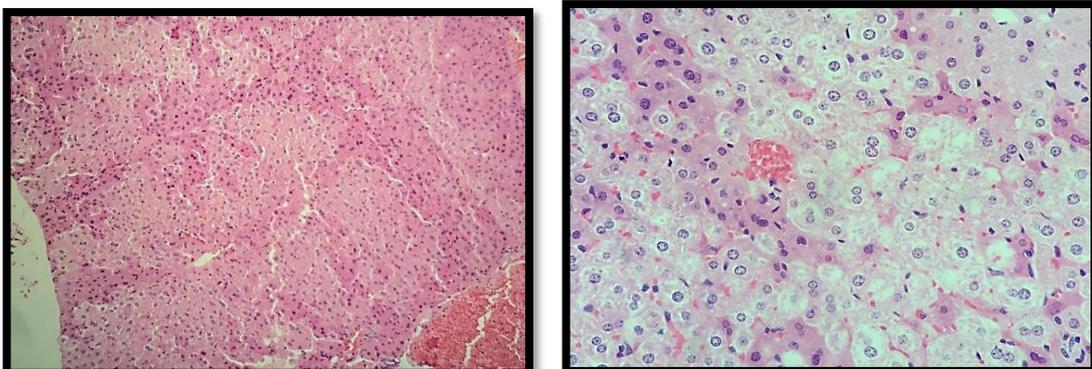
proliferación de colangiolas, fibrosis hepática, puentes de fibrosis, peliosis hepática, enfermedad veno oclusiva, cirrosis o neoplasias.



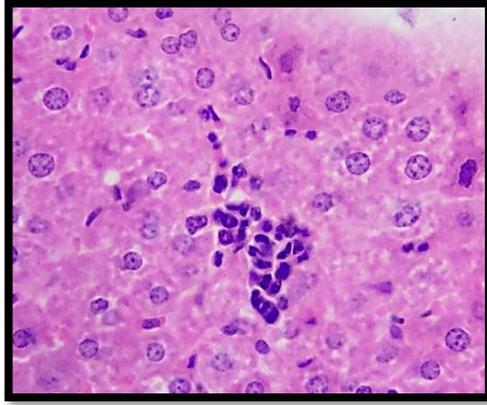
Fotografía 1.- Hepatocito con núcleo central de más de 20 micras de diámetro (40x H&E).



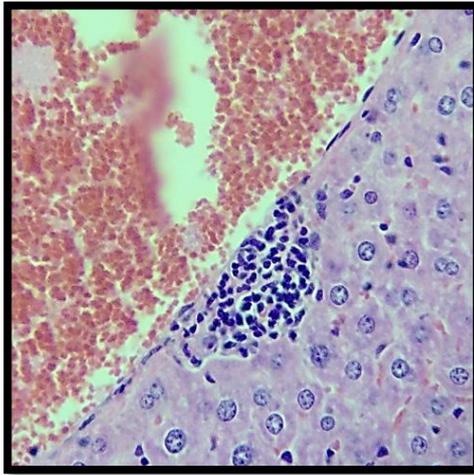
Fotografía 2.- Hepatocito con dos núcleos (100x H&E).



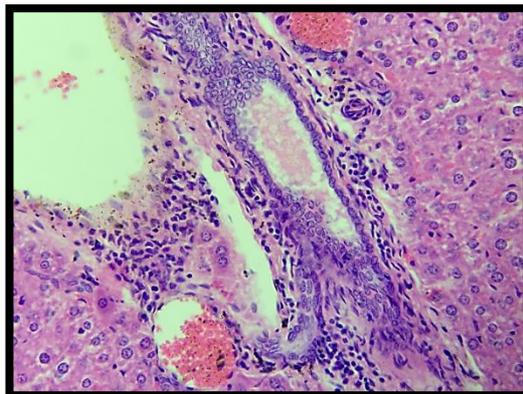
Fotografía 3. Degeneración balonzante. A, zonas claras en el lobulillo (4x H&E). Hepatocitos aumentados de tamaño a expensas de citoplasma amplio, claro y núcleo periférico (40x H&E).



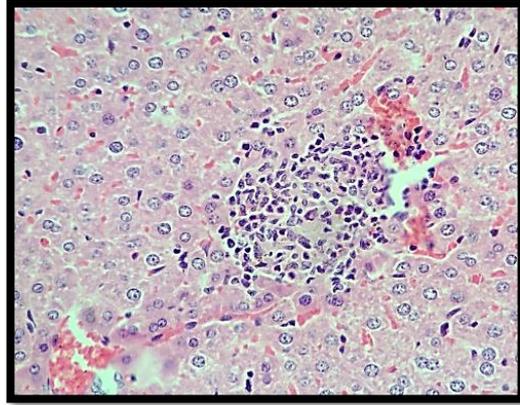
Fotomicrografía 4.- Acúmulo de neutrófilos interlobulillares (40x H&E).



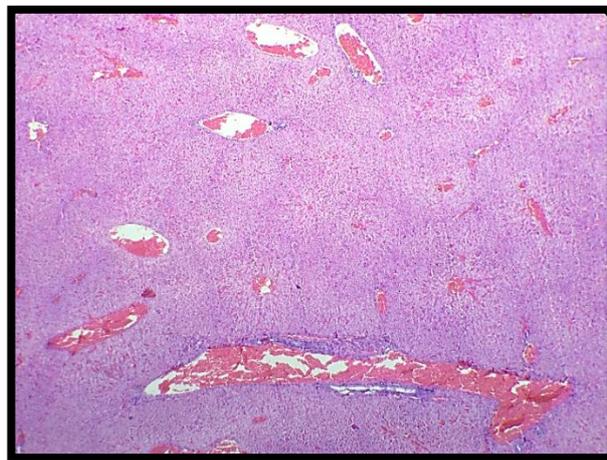
Fotomicrografía 5.- Grupo de neutrófilos centrolbulillares (40x H&E).



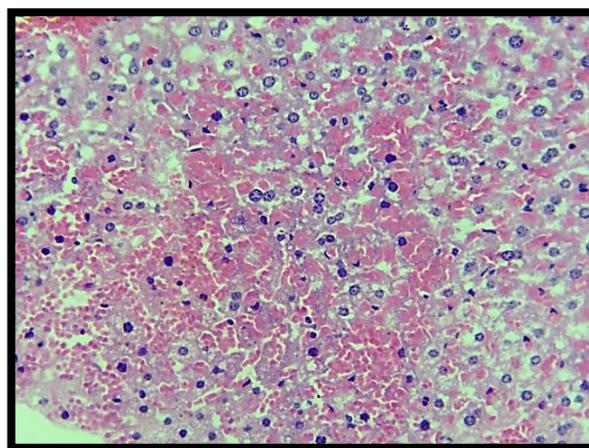
Fotografía 6.- Agregado de linfocitos en el espacio porta. (10x H&E).



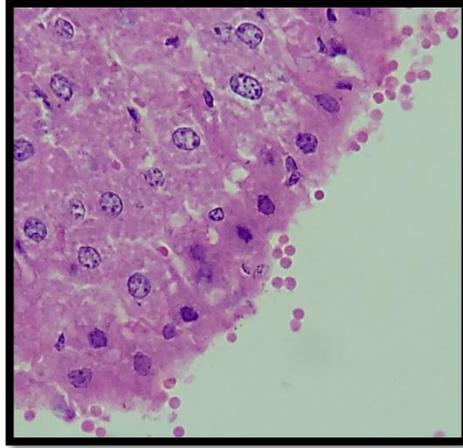
Fotografía 7.- Granuloma no caseificante. Acúmulo de linfocitos y macrófagos epitelioides interlobuillares sin necrosis..



Fotografía 8. Congestión venosa y sinusoidal intensa (5x H&E)



Fotografía 9. Dilatación y congestión sinusoidal intensa (40x H&E).



Fotografía 10 . Necrosis hepatocelular. Hepatocitos con citoplasma escaso, eosinófilo denso con núcleo central, pequeño e hiper Cromático (40x H&E) .

Planta 1: *Arctostaphylos pungens* (pingüica)

Los cambios morfológicos producidos por esta planta son los siguientes.

Los 6 ratones (100%) que recibieron el extracto a 30mg presentaron binucleación, neutrófilos y granulomas no caseificantes; el 83% presentó dilatación sinusoidal; el 66% mostró inflamación interlobulillar y solo el 50% mostró inflamación centrolobulillar; el 33% presentó crecimiento nuclear, inflamación portal y necrosis hepatocelular en menos del 5% del hígado analizado; el 16% presentó degeneración balonizante e inflamación periportal. A dosis de 300mg, los 6 ratones (100%) que recibieron el extracto, presentaron inflamación interlobulillar; el 83% presentó neutrófilos, granulomas no caseificantes y dilatación sinusoidal; el 66% resultó con crecimiento nuclear; 50% con binucleación; 33% con inflamación centrolobulillar y esteatosis microvesicular en menos del 5% del hígado analizado; el 16% mostró degeneración balonizante e inflamación portal. En caso de los ratones que recibieron la dosis mayor (3000mg) los cambios se presentaron en menor

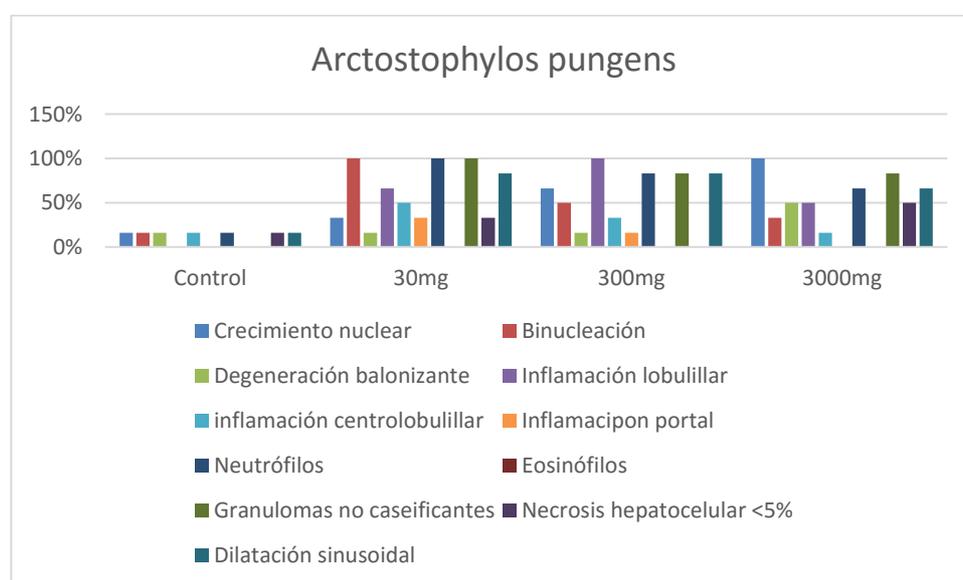
proporción. El único cambio que se presentó en los 6 ratones (100%) es el crecimiento nuclear; el 83% de los ratones con esta dosis presentó granulomas no caseificantes; el 66% neutrófilos y dilatación sinusoidal; el 50% degeneración balonizante, inflamación interlobulillar y necrosis hepatocelular en menos del 5% del hígado; y únicamente el 16% presentó inflamación centrolobulillar.

Estos resultados muestran que los ratones que recibieron la dosis menor (30mg) presentaron un patrón morfológico de hepatotoxicidad de tipo granulomatoso en el 100%. Además del patrón granulomatoso el 83% lo presenta en combinación con daño vascular y solo el 33% en combinación con patrón necro inflamatorio tipo hepatitis aguda caracterizado por necrosis hepatocelular menor al 5%, como característica principal, acompañada de binucleación, inflamación interlobulillar e inflamación centrolobulillar con neutrófilos. Los ratones expuestos a la mayor dosis (3000mg) presentaron un patrón de tipo granulomatoso combinado con daño vascular caracterizado por dilatación y congestión sinusoidal en el 83% de los casos; mientras que el 50% de estos se encuentran combinados con patrón necro inflamatorio de tipo hepatitis aguda.

El patrón morfológico que se concluye con estos hallazgos es mixto, siendo constante el patrón granulomatoso con daño vascular de tipo dilatación y congestión sinusoidal en 50% de los casos que recibieron en combinación con necro inflamatorio en el 50% de los casos.

Hallazgos	Placebo (%)	30mg/kg (%)	300mg/kg (%)	3000mg/kg (%)	p
<i>Arctostophylos pungens</i>					
Núcleo grande	16	33	66	100	0.001
Binucleación	16	100	50	33	0.002
Degeneración balonoide	16	17	17	50	0.001
Inflamación interlobulillar	0	66	100	50	0.001
Inflamación centrolobulillar	16	50	33	17	0.001
Inflamación portal	0	33	17	0	0.001
Inflamación periportal	16	16	0	0	0.86
Infiltrado por neutrófilos	16	100	83	67	0.002
Granuloma no caseificante	0	100	83	83	0.001
Necrosis hepatocelular	16	67	0	50	0.057

Tabla 1. Tabla de porcentajes de hallazgos morfológicos en ratones que recibieron extracto de hoja de *Arctostophylos pungens*.



Gráfica 1.- Porcentajes de hallazgos morfológicos en ratones que recibieron extracto de hoja de *Arctostophylos pungens*.

Planta 2: *Laurus nobilis* (Laurel)

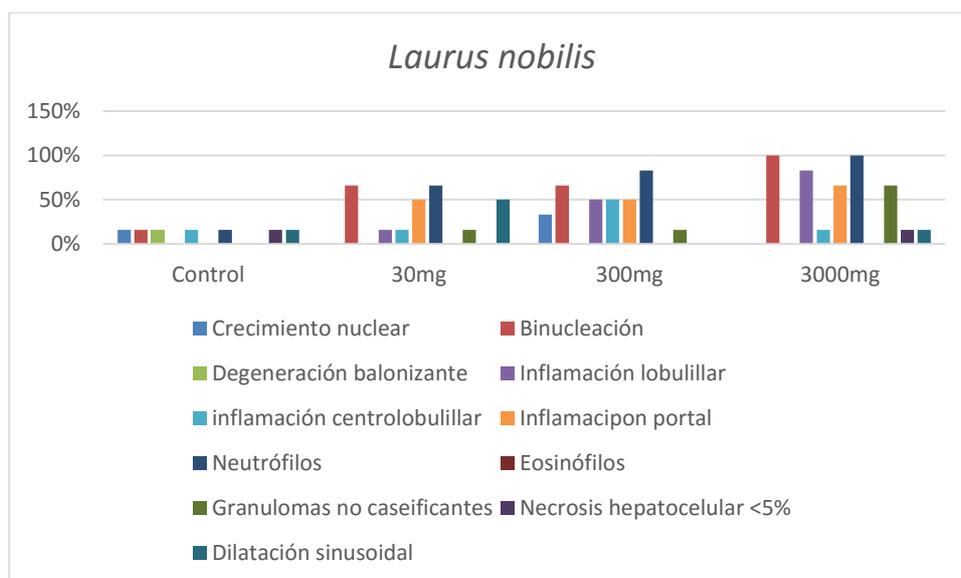
En los ratones expuestos a 30mg (n=6), los cambios más frecuentes fueron la binucleación y los neutrófilos, presentes en el 66% de los ratones; el 50% presentó inflamación portal y dilatación sinusoidal; y solo el 16% mostraron inflamación interlobulillar, inflamación centrolobuillar y granulomas.

Los ratones que recibieron 300mg de extracto (n=6), el 83% de ellos presentó neutrófilos, el 66% binucleación, el 50% inflamación lobulillar, inflamación centrolobulillar e inflamación portal y el 16% inflamación periportal, granulomas, colestasis canalicular y esteatosis microvesicular. Ninguno mostró necrosis hepatocelular, ni degeneración balonizante; la presencia de binucleación e inflamación interlobulillar, centrolobuillar y portal en el 50% no concluye un patrón de daño necro inflamatorio tipo hepatitis aguda. Los porcentajes en los que se presentaron la colestasis, la esteatosis y los granulomas no son suficientes para concluir otros patrones de daño hepatotóxicos.

A dosis de 3000mg, el 100% de los ratones presentaron binucleación y neutrófilos; el 83% mostró inflamación interlobulillar; el 66% resultó con inflamación portal y granulomas; el 16% desarrolló inflamación centrolobuillar, inflamación periportal, necrosis hepatocelular en menos del 5% del tejido y dilatación sinusoidal. Estos ratones muestran un patrón de daño granulomatoso puro dependiente de la dosis, solo en el 66% de los casos ya que no se reúnen criterios para ningún otro tipo patrón de daño hepatotóxicos.

Hallazgos <i>Laurus nobilis</i>	Placebo (%)	30mg/kg (%)	300mg/kg (%)	3000mg/kg (%)	p
Núcleo grande	16	0	33	0	0.001
Binucleación	16	66	66	100	0.002
Degeneración balonoide	16	0	0	0	0.001
Inflamación interlobulillar	0	16	50	83	0.001
Inflamación centrolobulillar	16	16	50	16	0.001
Inflamación portal	0	50	50	66	0.001
Inflamación periportal	16	0	16	66	0.86
Infiltrado por neutrófilos	16	66	83	100	0.002
Granuloma no caseificante	0	16	16	66	0.001
Necrosis hepatocelular	16	0	0	16	0.057

Tabla 2. Tabla de porcentajes de hallazgos morfológicos en ratones que recibieron extracto de hoja de *Laurus nobilis* (Laurel).



Gráfica 2. Porcentajes de hallazgos morfológicos en ratones que recibieron extracto de hoja de *LAURUS NOBILIS*.

Planta 3: *Crataegus oxyacantha* (espino de albar)

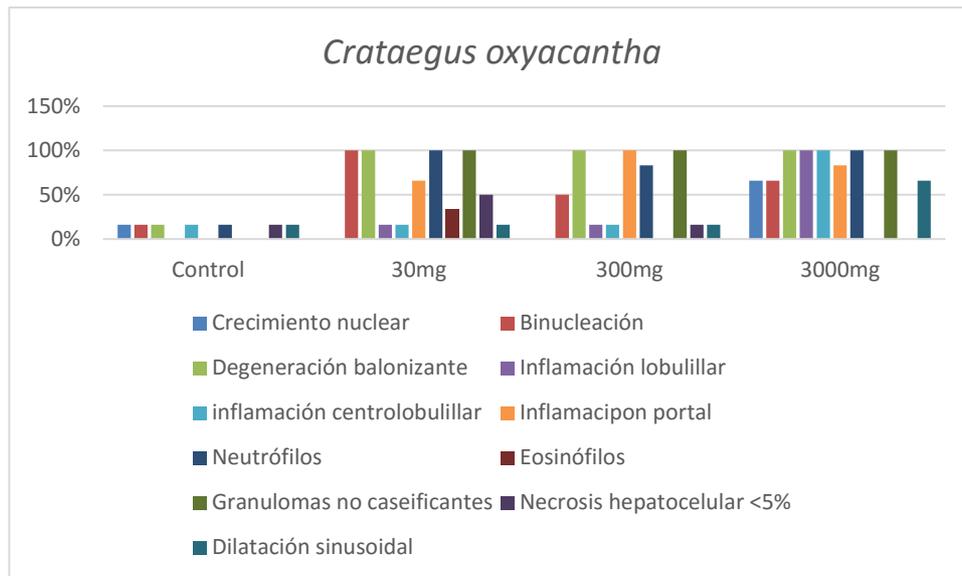
Esta planta provocó cambios morfológicos relacionados con hepatotoxicidad. Los 6 (100%) ratones a los que se les administró el extracto acuoso a 30mg mostraron binucleación, degeneración balonizante, inflamación interlobulillar,

neutrófilos parenquimatosos y granulomas no caseificantes; el 66% mostró inflamación portal; el 50% necrosis hepatocelular <5%; el 33% mostró eosinófilos y sólo el 16% mostró inflamación centrolobulillar y dilatación sinusoidal. A dosis de 300mg, el 100% de los ratones mostraron degeneración balonizante, inflamación interlobulillar, inflamación portal y granulomas no caseificantes; el 83% mostró neutrófilos; el 50% binucleación; sólo el 16% resultaron con inflamación centrolobuillar, necrosis hepatocelular <5% y dilatación sinusoidal. Y a dosis de 3000mg el 100% de los ratones mostraron inflamación interlobulillar, inflamación portal, neutrófilos parenquimatosos y granulomas no caseificantes; el 83% resultó con degeneración balonizante, inflamación portal; el 66% con crecimiento nuclear, binucleación y dilatación sinusoidal. La inflamación interlobulillar y los granulomas no caseificantes son cambios presentes independientes de la dosis, lo que se puede interpretar como cambios producidos por la simple administración del extracto sin relación con la dosis. Mientras que, a mayor dosis, la inflamación portal es prominente relacionada con neutrófilos intraparenquimatosos, esto puede explicar una relación dosis dependiente. Inversamente, a menor dosis la binucleación es mayor, así como la necrosis hepatocelular <5% presente en los ratones que recibieron la menor dosis. El patrón morfológico mayor de hepatotoxicidad conocido como necro inflamatorio de tipo hepatitis aguda está caracterizado por necrosis hepatocelular focal, inflamación interlobulillar con neutrófilos, degeneración balonizante y binucleación. Dichos cambios están presentes, de manera significativa, a cualquier dosis dada; sin embargo, a menor dosis se presentaron en mayor proporción. La presencia de granulomas es una constante independiente de la dosis. La inflamación portal es un dato morfológico del patrón necroinflamatorio

de tipo hepatitis crónica. Sin embargo, el daño vascular representado por la dilatación sinusoidal solo está presente en la dosis máxima. Con esto se concluye que: El extracto de la hoja de *Crataegus oxyacantha*, a cualquier dosis, genera un daño hepático con patrón morfológico de tipo granulomatoso y en algunos casos, se presenta combinado con patrón morfológico necroinflamatorio de tipo hepatitis aguda.

Hallazgos <i>Crataegus oxyacantha</i>	Placebo (%)	30mg/kg (%)	300mg/kg (%)	3000mg/kg (%)	p
Núcleo grande	16	0	0	67	0.001
Binucleación	16	100	50	67	0.002
Degeneración balonoide	16	100	100	83	0.001
Inflamación interlobulillar	0	100	100	83	0.001
Inflamación centrolobulillar	16	16	16	100	0.001
Inflamación portal	0	67	100	83	0.001
Inflamación periportal	16	0	0	0	0.86
Infiltrado por neutrófilos	16	100	83	100	0.002
Granuloma no caseificante	0	100	100	100	0.001
Necrosis hepatocelular	16	50	17	0	0.057

Tabla 3.- Tabla de porcentajes de hallazgos morfológicos en hígado de ratones que recibieron extracto de hoja de *Crataegus oxyacantha*.



Gráfica 3. Hallazgos morfológicos con la administración del extracto de hoja de *Crataegus oxyacantha*.

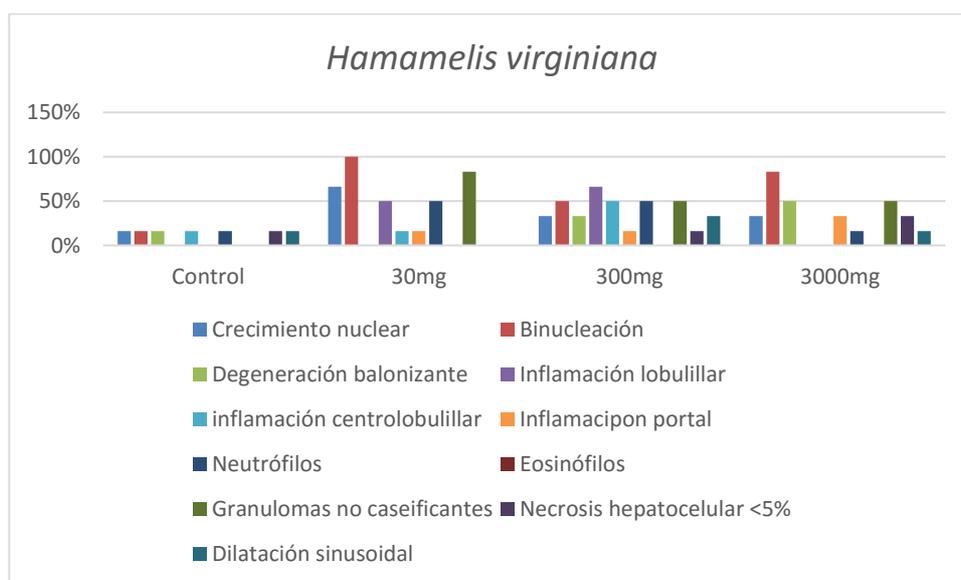
Planta 4. *Hamamelis virginiana*

El cambio más frecuentemente observado fue la binucleación, presentada por el 100% de los ratones expuestos a 30mg mientras que a 300mg y 3000mg lo presentaron el 50% y el 83%, respectivamente. La binucleación es un cambio que representa regeneración celular y puede estar presente en muchas condiciones no específicas, puede estar acompañado por crecimiento nuclear, característica presentada en el 66% de los ratones que recibieron 30mg del extracto mientras que solo se presentó en el 33% de los ratones que recibieron 300mg y 3000mg. Los granulomas no caseificantes, un hallazgo muy frecuente y en altos porcentajes en las plantas anteriores, solo se presentaron en el 83% de los ratones expuestos a 30mg, y en 50% de los ratones expuestos a 300mg y 3000mg. La dilatación sinusoidal no es lo suficientemente frecuente como para concluir un daño vascular ya que solo se presentó en el 33% y 16% de los ratones expuestos a 300mg y 3000mg, respectivamente. La necrosis hepatocelular en menos del 5% del tejido solo se presentó en 16% y 33% de los

ratones expuestos a 300mg y 3000mg, respectivamente. La Inflamación interlobulillar se presentó en el 50% y 66% de los ratones expuestos a 30mg y 300mg, respectivamente. La inflamación centrolobulillar se mostró en el 16% y 50% de los ratones que recibieron 30mg y 300mg, respectivamente. Con estos hallazgos no se concluye ningún patrón de daño hepatotóxicos.

Hallazgos <i>Hamamelis virginiana</i>	Placebo (%)	30mg/kg (%)	300mg/kg (%)	3000mg/kg (%)	p
Núcleo grande	16	67	33	33	0.001
Binucleación	16	100	50	83	0.002
Degeneración balonoide	16	0	33	50	0.001
Inflamación interlobulillar	0	50	67	0	0.001
Inflamación centrolobulillar	16	16	50	0	0.001
Inflamación portal	0	16	16	33	0.001
Inflamación periportal	16	0	0	0	0.86
Infiltrado por neutrófilos	16	50	50	17	0.002
Granuloma no caseificante	0	83	50	50	0.001
Necrosis hepatocelular	16	0	17	33	0.057

Tabla 4. Tabla de porcentajes de hallazgos morfológicos en ratones que recibieron extracto de hoja de *Hamamelis virginiana*.

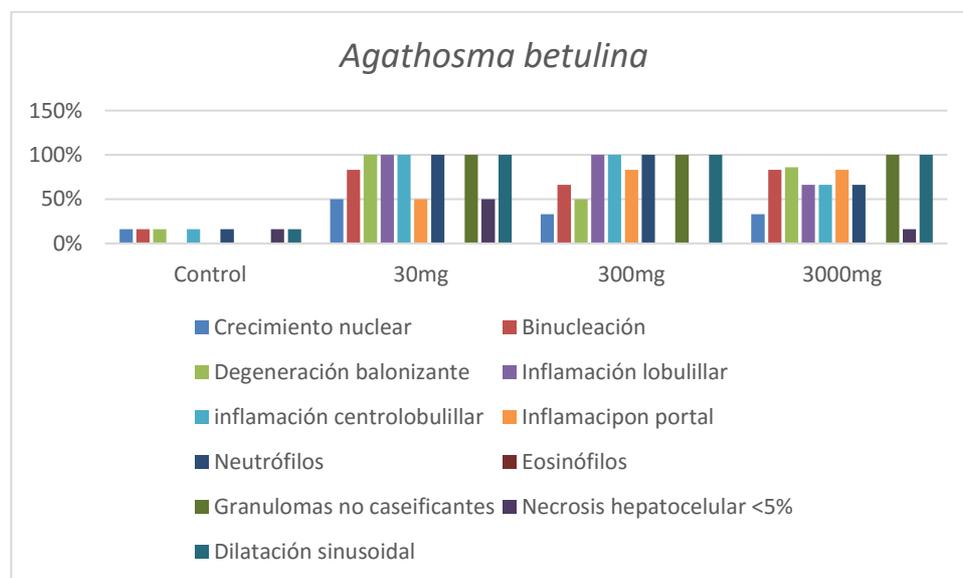


Gráfica 4. Hallazgos morfológicos con la administración del extracto de hoja de *Hamamelis virginiana*.

Planta 5. *Agathosma betulina* (Bechu). también generó cambios morfológicos relacionados con toxicidad hepática. El 100% de los ratones (n=6), expuestos a 30mg del extracto de hoja de dicha planta, presentaron degeneración balonizante, inflamación interlobulillar, inflamación centrolobulillar, neutrófilos, granulomas no caseificantes y dilatación sinusoidal; el 83% presentó binucleación y el 50% mostraron crecimiento nuclear, inflamación portal y necrosis hepatocelular <5%. Los ratones expuestos a 300mg del extracto herbal, el 100% resultaron con inflamación interlobulillar, inflamación centrolobulillar, neutrófilos, granulomas caseificantes y dilatación sinusoidal; el 83% mostraron inflamación portal, el 66% binucleación y el 50% degeneración balonizante. A dosis de 3000mg, 6/6 ratones (100%) presentaron granulomas no caseificantes y dilatación sinusoidal; 83% de los 6 ratones mostraron binucleación, degeneración balonizante e inflamación portal; el 66% resultaron con inflamación interlobulillar, inflamación centrolobulillar y neutrófilos; mientras que solo el 16% presentó necrosis hepatocelular <5%. Todos los ratones que recibieron el extracto de esta planta presentaron granulomas y dilatación sinusoidal; esto nos indica que la ingesta de esta planta generó hepatotoxicidad con un patrón de daño granulomatoso combinado con daño vascular, sin embargo, el daño de tipo necroinflamatorio solo se presentó a la menor dosis (30mg) en el 50% de los 6 ratones que recibieron esta dosis. Con esto se concluye que: El extracto de la hoja de *Agathosma betulina*, a cualquier dosis, genera un daño hepático con patrón morfológico de tipo granulomatoso y vascular con dilatación sinusoidal y solo a dosis menores se combinó con patrón necroinflamatorio de tipo hepatitis aguda.

Hallazgos <i>Agathosma betulina</i>	Placebo (%)	30mg/kg (%)	300mg/kg (%)	3000mg/kg (%)	p
Núcleo grande	16	50	33	33	0.001
Binucleación	16	83	67	84	0.002
Degeneración balonoide	16	100	50	86	0.001
Inflamación interlobulillar	0	100	100	67	0.001
Inflamación centrolobulillar	16	100	100	67	0.001
Inflamación portal	0	50	83	83	0.001
Inflamación periportal	16	0	0	0	0.86
Infiltrado por neutrófilos	16	100	100	67	0.002
Granuloma no caseificante	0	100	100	100	0.001
Necrosis hepatocelular	16	50	0	17	0.057

Tabla 5. Tabla de porcentajes de hallazgos morfológicos en ratones que recibieron extracto de hoja de *Agathosma betulina*.



Gráfica 5. Hallazgos morfológicos con la administración del extracto de hoja de *Agathosma betulina*.

Planta 6. *Gymnema sylvestre*

Los 6 ratones ,expuestos a 30mg del extracto, presentaron granulomas no caseificantes y dilatación sinusoidal en el 100% de los casos; el 50% de los casos

presentaron binucleación, inflamación lobulillar, inflamación centrolobuillar y neutrófilos; el 33% presentó inflamación portal y necrosis hepatocelular en menos del 5% de la biopsia; y solo el 16% presentó crecimiento nuclear.

Los ratones que recibieron 300mg presentaron granulomas no caseificantes en el 100% de los casos; mientras que el 83% presentó inflamación lobulillar, inflamación centrolobuillar y neutrófilos; el 66% mostró crecimiento nuclear; el 50% mostró inflamación portal y necrosis hepatocelular en menos del 5% de la biopsia analizada y sólo el 33% mostró binucleación.

Los ratones expuestos a 3000mg presentaron granulomas no caseificantes en el 100% de los casos; el 83% mostró binucleación, inflamación lobulillar, inflamación centrolobulillar, inflamación portal y neutrófilos; el 50% presentó crecimiento nuclear y el 33% inflamación portal y necrosis hepatocelular en menos del 5% de la biopsia.

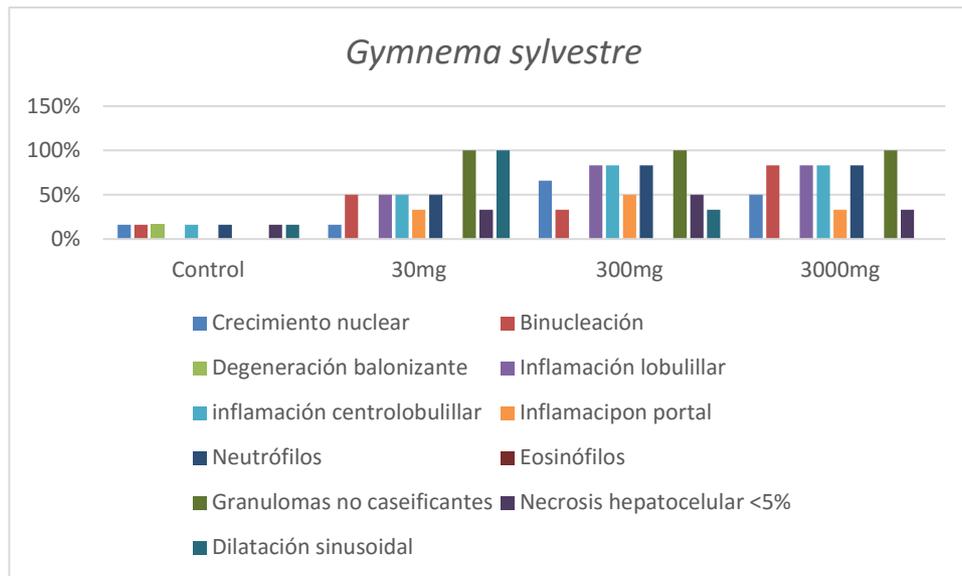
La administración de extracto de la hoja de *Gymnema sylvestre* produjo un patrón de daño hepático de tipo granulomatoso en el 100% de los ratones expuestos a esta planta a las 3 dosis diferentes (n=18). Esto significa que, sin importar la dosis a la que se administró, generó granulomas no caseificantes. Sin embargo, el daño de tipo vascular caracterizado por dilatación y congestión sinusoidal solo se presentó a menor dosis, afectando al 100%(n=6) de los ratones expuestos a 30mg de dicho extracto. Los expuestos a dosis de 30mg solo el 33% mostró dilatación y congestión sinusoidal, mientras que los que recibieron a dosis de 3000mg, ninguno presentó este cambio vascular. Los cambios necro inflamatorios, menores al 5% de la biopsia, solo se presentaron en 33% de los ratones expuestos a dosis de 30mg y 3000mg, pero a dosis intermedias el 50% presentó daño de tipo necro inflamatorio hepatocelular

acompañado de inflamación interlobulillar, centrolobulillar, portal, neutrófilos, crecimiento nuclear y binucleación; a pesar de no presentar degeneración balonizante, la usencia de este criterio no excluye la conclusión de daño necro inflamatorio de tipo hepatitis aguda. Sin embargo, en el caso de los ratones que recibieron la dosis mayor (3000mg) solo el 33% presentó necrosis hepatocelular en menos del 5% de la biopsia y ninguno presentó degeneración balonizante; la presencia de inflamación lobulillar, centrolobulillar y portal con neutrófilos orienta a un patrón del tipo necro inflamatorio-hepatitis aguda.

Hallazgos	Placebo (%)	30mg/kg (%)	300mg/kg (%)	3000mg/kg (%)	p
Núcleo grande	16	17	67	50	0.001
Binucleación	16	50	33	83	0.002
Degeneración balonoide	16	0	0	0	0.001
Inflamación interlobulillar	0	50	83	83	0.001
Inflamación centrolobulillar	16	50	83	83	0.001
Inflamación portal	0	33	50	33	0.001
Inflamación periportal	16	0	0	0	0.86
Infiltrado por neutrófilos	16	50	83	83	0.002
Granuloma no caseificante	0	100	100	100	0.001
Necrosis hepatocelular	16	33	50	33	0.057

Tabla 6. Tabla de porcentajes de hallazgos morfológicos en ratones que recibieron extracto de

hoja de *Gymnema sylvestre*.



Gráfica 6. Hallazgos morfológicos con la administración del extracto de hoja de *Gymnema sylvestre*.

Planta 7. *Morus alba* (Mora de árbol)

El extracto de la hoja de la mora de árbol generó cambios en menos porcentaje. Los ratones expuestos a 30mg del extracto presentaron granulomas solo en el 83% de los casos; el 66% mostró binucleación; el 33% inflamación interlobulillar, inflamación centrolobulillar, inflamación portal y neutrófilos; el 16% crecimiento nuclear, necrosis hepatocelular en menos del 5% del tejido y dilatación sinusoidal.

Los ratones expuestos a 300mg del extracto presentaron granulomas no caseificantes en el 100% de los casos; el 83% mostraron binucleación, inflamación centrolobuillar, inflamación portal y neutrófilos; el 66% con inflamación interlobulillar; 50% con dilatación sinusoidal y el 16% mostró necrosis hepatocelular en menos del 5% del tejido, así como esteatosis macrovesicular.

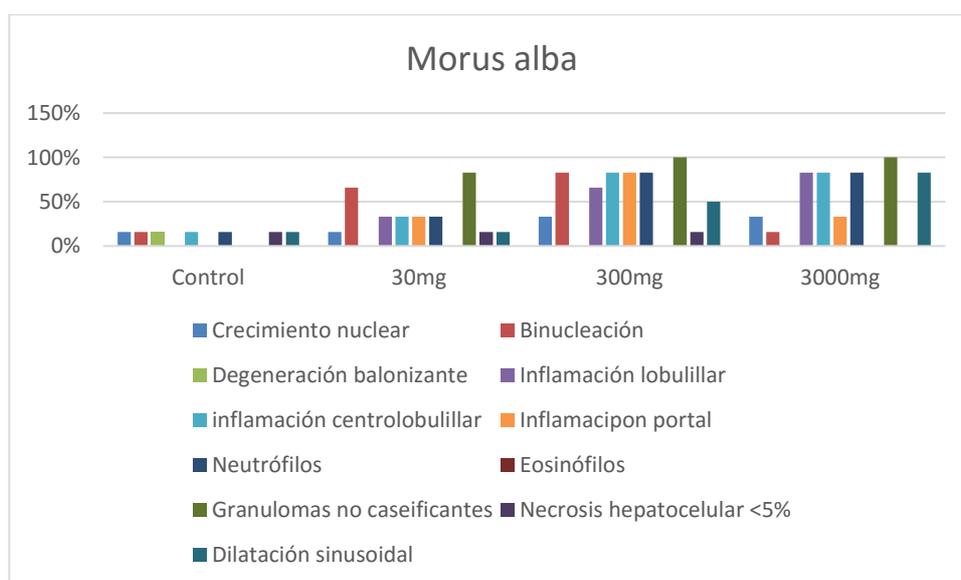
Los ratones que recibieron 3000mg del extracto mostraron granulomas no caseificantes en el 100% de los casos; el 83% resultó con inflamación

interlobulillar, inflamación centrolobulillar, neutrófilos y dilatación sinusoidal; el 33% mostró crecimiento nuclear e inflamación portal y solo el 16% presentó binucleación.

El único patrón de lesión representativo es el granulomatoso puro ya que no se reúnen suficiente porcentaje de criterios para algún otro patrón de lesión hepatotóxicos y es dosis dependiente.

Hallazgos	Placebo (%)	30mg/kg (%)	300mg/kg (%)	3000mg/kg (%)	p
Núcleo grande	16	17	33	33	0.001
Binucleación	16	67	83	17	0.002
Degeneración balonoide	16	0	0	0	0.001
Inflamación interlobulillar	0	33	67	83	0.001
Inflamación centrolobulillar	16	33	83	83	0.001
Inflamación portal	0	33	83	33	0.001
Inflamación periportal	16	0	0	0	0.86
Infiltrado por neutrófilos	16	33	83	83	0.002
Granuloma no caseificante	0	83	100	100	0.001
Necrosis hepatocelular	16	17	17	0	0.057

Tabla 7. Tabla de porcentajes de hallazgos morfológicos en ratones que recibieron extracto de hoja de *Morus alba*.



Gráfica 7. Hallazgos morfológicos con la administración del extracto de hoja de *Morus alba*

CONCLUSIÓN:

La planta que ocasionó más cambios morfológicos compatibles con daño hepatotóxico es *Crataegus oxyacantha* caracterizado por un patrón de daño hepatotóxico mixto de tipo necro inflamatorio hepatitis aguda combinado con granulomatoso. Estos cambios se observaron a cualquier dosis por lo que se concluye que no son dosis dependientes.

El extracto de la hoja de *Agathosma betulina*, a cualquier dosis, generó cambios morfológicos compatibles con un daño hepático tóxico con patrón morfológico de tipo granulomatoso y vascular con dilatación sinusoidal; solo a dosis menores se combinó con patrón necroinflamatorio de tipo hepatitis aguda.

Arctostophylos pungens generó cambios morfológicos compatibles con daño hepatotóxico con patrón mixto de tipo granulomatoso y vascular a dosis bajas; a dosis altas se encontró patrón necroinflamatorio en el 50% de los casos.

Gymnema sylvestre generó daño con patrón granulomatosos independiente de la dosis, presentándose a cualquier dosis. Sin embargo, el daño de tipo vascular caracterizado por dilatación y congestión sinusoidal solo se presentó a menor dosis. Los cambios de tipo necro inflamatorios, se presentaron a dosis intermedias en el 50% de los casos.

Laurus nobilis generó pocos cambios mostrando solo un patrón de daño granulomatoso puro dependiente a dosis altas.

Morus alba también ocasionó pocos cambios morfológicos, siendo el más evidente el patrón granulomatoso puro dosis dependiente.

Hamamelis virginiana es la planta que ocasionó menos cambios morfológicos sin concluir ningún patrón morfológico de hepatotoxicidad.

DISCUSIÓN:

Diversos estudios publicados han demostrado el efecto benéfico de *Crataegus oxyacantha*. Jalaly, et.al demostraron que la administración del extracto de dicha planta y el ejercicio aeróbico durante 12 semanas disminuye el riesgo de aterosclerosis y afecciones cardiacas (40). Hayrullah Alp, et.al. demostraron que el extracto alcohólico de *Crataegus oxyacantha* produce efectos anti arrítmicos inducidos por digoxina en un modelo experimental con ratas. Sin embargo, también encontraron un efecto hipotensor relacionado (41). Wang, et.al. indica que el consumo oral de *Crataegus oxyacantha* es bien tolerado, con escasos casos de eventos adversos severos reportados como vértigo/mareo, malestar gastrointestinal, cefalea, taquicardia. Recomiendan su uso por al menos de 4 a 8 semanas a dosis de 160mg a 1800mg al día para comenzar a notar el efecto cardioprotector deseado. Sin casos de interacción medicamentosa reportados (42). Tabach,et.al en su estudio experimental con 3 especies diferentes de animales mostraron que la administración de un preparado con extractos de *Crataegus oxyacantha*, *Passiflora incarnata* y *Valeriana officinales*, administradas de manera aguda o crónica, presentaron baja toxicidad (43).

Nuestro estudio reveló resultados discordantes a la literatura antes mencionada; la administración del extracto de la planta *Crataegus oxyacantha* generó cambios morfológicos compatibles con hepatotoxicidad con un patrón mixto caracterizado por granulomas, hepatitis aguda y dilatación sinusoidal. Por esta razón es necesario ampliar la investigación respecto a los efectos adversos que pueda generar esta planta. Conclusión que compartimos con diversos autores de publicaciones antes mencionadas.

No existen reportes de hepatotoxicidad relacionados a *Agathosma betulina*.

Villa-Ruano, et.al. en un estudio mexicano realizado en Oaxaca, concluyeron que *Arctostaphylos pungens*, *Gnaphalium roseum*, *Crotalaria pumila*, *Cuphea aequipetala*, *Rhus chondroloma*, y *Satureja laevigata* poseen actividad antioxidante (44). Sin embargo, no mencionan efectos tóxicos producidos por dichas plantas. Nuestro estudio mostró cambios morfológicos hepáticos relacionados con toxicidad.

La *Gymnema sylvestre* es una planta ampliamente estudiada debido a su efecto antidiabético, sin embargo sólo se ha reportado un caso de daño hepático en una mujer de 60 años, quien probablemente sufrió una reacción idiosincrática que desencadenó una respuesta autoinmune (12).

Las hojas de *Laurus nobilis* son ampliamente utilizadas como especias de cocina; el aceite esencial se obtiene por destilación de las hojas y empleado como aditivo en comida, medicamentos y cosméticos. También se han reportado propiedades antibacteriales, antioxidantes y antiinflamatorias.

En la literatura se han encontrado varios reportes de dermatitis de contacto producido por el uso tópico de preparados de *Brassica nigra*, *Rosmarinus officinalis* y *Laurus nobilis* (45). Sin embargo, no existen reportes de toxicidad hepática por su consumo oral.

Tampoco se encontraron reportes de hepatotoxicidad producida por consumo oral de *Morus Alba* o por *Hamamelis virginiana*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Ocegueda S, Moreno E, Koleff P. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *Biodiversitas*. 2005;12–5.
- 2.-Gad HA, El-Ahmady SH, Abou-Shoer MI, Al-Azizi MM. Application of chemometrics in authentication of herbal medicines: A review. *Phytochem Anal*. 2013;24(1):1–24.
- 3.-Bunchorntavakul C, Reddy KR. Review article: Herbal and dietary supplement hepatotoxicity. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;37(1):3–17.
- 4.- Salud S De. FEUM, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 2008;1–9.
- 5.- Muñetón P. Un complemento vital para la salud de los Mexicanos . entrevista con el Dr. Erick Estrada Lugo. *Rev Digit Univ*. 2009; 10:2–9.
- 6.- Teschke R, Eickhoff A, Wolff A, Frenzel C, Schulze J. Herbal hepatotoxicity and WHO global introspection method. *Ann Hepatol*. 2013;12(1):11–21.
- 7.-Boullata JI, Nace AM. Safety issues with herbal medicine. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther*. 2000;20(3):257–69.

8.- Serv AI, Alexanderson-rosas EG. Toxicidad hepática inducida por fármacos y herbolaria. 2013;75(4):230–7.

9.- Guo L, Fuscoe JC, Fu P, Mei N. Application of DNA Microarray in Studies of Herbal Dietary Supplements. Gen Appl Syst Toxicol [Internet]. 2011.

10.- Shiyovich A, Sztarkier I, Nesher L. Toxic hepatitis induced by *Gymnema sylvestre*, a natural remedy for type 2 diabetes mellitus. Am J Med Sci. 2010;340(6):514–7.

11.- Leach MJ. *Gymnema sylvestre* for Diabetes Mellitus: A Systematic Review. J Altern Complement Med [Internet]. 2007;13(9):977–83.

12.- Grattagliano I, Bonfrate L, Diogo CV, Et al. Biochemical mechanisms in drug-induced liver injury: certainties and doubts. World J Gastroenterol 2009; 15:4865-76.

13.- Benmalek Y, Yahia OA, Belkebir A, Fardeau ML. Anti-microbial and antioxidant activities of *illicium verum*, *Crataegus oxyacantha* ssp *monogyna* and *Allium cepa* red and white varieties. Bioengineered. 2013;4(4):244–8.

14.- Krajka-Kuźniak V, Paluszczak J, Oszmiański J, Baer-Dubowska W. Hawthorn (*Crataegus oxyacantha* L.) bark extract regulates antioxidant response element (ARE)-mediated enzyme expression via Nrf2 pathway activation in normal hepatocyte cell line. Phyther Res. 2014;28(4):593–602.

15.- Wu T, Yin J, Zhang G, Long H, Zheng X. Mulberry and cherry anthocyanin consumption prevents oxidative stress and inflammation in diet-induced obese mice. *Mol Nutr Food Res*.

16.- Padilha MM, Vilela FC, Rocha CQ, Dias MJ, Soncini R, Dos Santos MH, et al. Antiinflammatory properties of *Morus nigra* leaves. *Phyther Res*. 2010;24(10):1496–500.

17.- Kim TJ, Nam KW, Kim B, Lee SJ, Oh KB, Kim KH, et al. Inhibitory effects of costunolide isolated from *Laurus nobilis* on IgE-induced degranulation of mast cell-like RBL-2H3 cells and the growth of Y16 pro-B cells. *Phyther Res*. 2011;25(9):1392–7.

18.- Agathosma D, Herba B, Macroscopical D. *Agathosma betulina* herba. *Medicine (Baltimore)*. 1976; 42:2–6.

19.- EMA. European Medicines Agency. 2012;(September):1–15.

20.- Theisen LL, Erdelmeier CAJ, Spoden GA, Boukhallouk F, Sausy A, Florin L, et al. Tannins from *Hamamelis virginiana* bark extract: Characterization and improvement of the antiviral efficacy against influenza A virus and human papillomavirus. *PLoS One*. 2014;9(1):1–14.

21.- Márquez Linares M., Jurado E., Gonzalez Elizondo S., Algunos aspectos de la biología de la manzanita (*Arctostaphylos pungens* HBK) y su papel en el desplazamiento de bosques templados por Chaparrales. Ciencia UANL, enero-marzo2006pp.57-64.

22.- Kianbakht S, Abasi B, Hashem Dabaghian F. Improved lipid profile in hyperlipidemic patients taking vaccinium arctostaphylos fruit hydroalcoholic extract: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Phyther Res.* 2014;28(3):432–6.

23.- Navarro VJ. Herbal and dietary supplement hepatotoxicity. *Semin Liver Dis.* 2009;29:373-382.

24.- Teschke R, Wolff A, Frenzel C, Schulze J, Eickhoff A. Herbal hepatotoxicity: A tabular compilation of reported cases. *Liver Int.* 2012;32(10):1543–56.

25.- Kane JA, Kane SP, Jain S. Hepatitis induce by traditional Chines herbs; possible toxic components. *Gut* 1995; 36:146-147.

26.- Pierard S, Coche JC, Lanthier P, et al. Severe hepatitis associated with the use of black cohosh: a report of two cases and an advice for caution. *Eur J Gastroenterol Hepato* 2009; 21:941-945.

27.-Teschke R. Kava Hepatotoxicity: pathogenetic aspects and prospective consideration. *Liver international* 2010;30:1270-1279.

28.-García-Cortés M, Andrade RJ López-Ortega S,et al. Medicina natrual y hepatotoxicidad. Rev And Pat Digest 2006;29:54-60.

29.- Odze and Goldblum Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract, and Pancreas, Ed 3 Copyright © 2015, 2009, 2004 by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.

30.- Hussaini SH,Farrington EA. Idiosyncratic drug-induce liver injury: an overview. Expert Opin Drug Saf 2007;6:673-684.

31.- Grant LM,Rockey DC Drug-induced liver injury. Curr Opin Gastroenterol 2012;28:198-202.

32.-Abboud G. Kaplowitz N. Drug-induced liver injury. Drug Saf 2007; 30:277-294.

33.- Kleiner DE, Chalasani NP, Lee WM, Fontana RJ, Bonkovsky HL, Watkins PB, et al. Hepatic histological findings in suspected drug-induced liver injury: systematic evaluation and clinical associations. Hepatology [Internet]. 2014;59(2):661–70.

34.-Teschke R, Frenzel C, Glass X, Schulze J, Eickhoff A. Herbal hepatotoxicity: A critical review. Br J Clin Pharmacol. 2013;75(3):630–6.

35.- Kleiner DE, Ph D. The Pathology of Drug-Induced Liver Injury. *Semi Liver Dis.* 2009;29(4):364-72.

36.- MacSween's Pathology of the Liver, ED 6 Copy right© 2012, 2007, 2002, 1994, 1987, 1979 by Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier Inc.

37.- Seeff LB. Herbal Hepatotoxicity. *Clin Liver Dis.* 2007;11(3):577–96.

38.- Fuentes Paredes Flor de María, Mendoza Yanavilca Rosa Amelia y cols. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón. Ministerio de Salud de Perú. Lima 2008

39.- OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. 17th December 2001

40.- Jalaly L, Sharifi G, Faramarzi M, Nematollahi A, Rafieian-kopaei M, Amiri M, et al. Comparison of the effects of *Crataegus oxyacantha* extract, aerobic exercise and their combination on the serum levels of ICAM-1 and E-Selectin in patients with stable angina pectoris. *DARU J Pharm Sci [Internet]. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences;* 2015;23(1):54.

41.- Alp H, Soner BC, Baysal T, Şahin AS. Protective effects of Hawthorn (*Crataegus oxyacantha*) extract against digoxin-induced arrhythmias in rats. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2015;15(12):970–5.

42.-Wang J, Xiong X, Feng B. Effect of crataegus usage in cardiovascular disease prevention: An evidence-based approach. Evidence-based Complement Altern Med. 2013;2013.

43.- Tabach R., Rodrigues E. y Carlini A. Preclinical toxicological assessment of a phytotherapeutic product – CPV (based on dry extracts of *Crataegus oxyacantha* L., *Passiflora incarnata* L., and *Valeriana officinalis* L.) PHYTOTHERAPY RESEARCH *Phytother. Res.* 23, 33–40 (2009)

44.-Villa-Ruano N, Zurita-Vásquez GG, Pacheco-Hernández Y, Betancourt-Jiménez MG, Cruz-Durán R, Duque-Bautista H. Anti-lipase and antioxidant properties of 30 medicinal plants used in Oaxaca, México. *Biol Res [Internet]*. 2013;46(2):153–60.

45.- Karacor-Altuntas Z, ?nce B, Dadaci M, Altuntas M. A cause of severe chemical burn: Topical application of herbal medicines. *Ann Burns Fire Disasters*. 2014;27(3):151–3.