



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA

**EFFECTO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Eryngium carlinae* F.  
Delaroche SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DEL TRANSPORTE  
INTESTINAL DEL COLESTEROL EN RATONES CON  
HIPERCOLESTEROLEMIA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

**IBRAHIM GUILLERMO CASTRO TORRES**

**DIRECTOR DE TESIS**

DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ  
INSTITUTO DE QUÍMICA

**COMITÉ TUTOR**

DR. MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA  
FACULTAD DE MEDICINA  
DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS  
FACULTAD DE MEDICINA

**CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE DE 2018**



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.

El presente estudio se desarrolló en diferentes dependencias de investigación:

El apartado dedicado a la extracción vegetal, análisis químico y espectroscópico de los productos naturales, se llevó a cabo en el Laboratorio 1-4 del Instituto de Química en la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Mariano Martínez Vázquez.

El desarrollo del modelo experimental de hipercolesterolemia se llevó a cabo en el Bioterio del Instituto de Ciencias de la Salud, en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la asesoría de la Dra. Minarda De la O Arciniega.

Los estudios bioquímicos, histopatológicos y moleculares se llevaron a cabo bajo asesoría de personal capacitado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México y del Instituto Nacional de Cancerología.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y al Instituto de Química por haberme alojado durante todo este lapso de mi proyecto experimental.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología por haberme otorgado una beca durante mis estudios de doctorado.

Al Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM y al Instituto Nacional de Cancerología por haberme recibido con las puertas abiertas para llevar a cabo diferentes estudios experimentales de mi proyecto.

Al Dr. Mariano Martínez Vázquez por la dirección de mi trabajo y su apoyo incondicional en todos los aspectos de mi formación como investigador.

A mi comité tutorial integrado por los doctores Marco Antonio Juárez Oropeza y Samuel Canizales Quinteros por la asesoría que en cada semestre brindaron hacia mi proyecto.

A las Dras. Minarda De la O Arciniega y Elia Brosla Naranjo Rodríguez por su invaluable apoyo durante mi doctorado.

## **DEDICATORIAS**

A mi madre dedico este trabajo experimental, ella es la persona más importante que existe en mi vida y quien me ha apoyado en todos los proyectos que he emprendido.

También dedico este trabajo a todo mi núcleo familiar, mi abuelita y hermanos, porque los quiero mucho y también me han brindado su apoyo constante.

Dedico este trabajo a todos los estudiantes de posgrado, que son el futuro de nuestro país y particularmente a aquellos que se dediquen a investigar plantas medicinales, lípidos, cálculos biliares, farmacología, porque mi trabajo versa sobre estas temáticas.

## ÍNDICE

<b>Índice de cuadros</b> .....	7
<b>Índice de figuras</b> .....	7
<b>Abreviaturas</b> .....	9
<b>Resumen</b> .....	10
<b>Abstract</b> .....	12
<b>1. Introducción</b> .....	14
<b>2. Antecedentes</b> .....	16
2.1 Colesterol.....	16
2.1.1 Funciones biológicas .....	16
2.1.2 Biosíntesis .....	19
2.1.3 Transporte .....	21
2.2 Enfermedades del colesterol.....	22
2.2.1 Hipercolesterolemia .....	22
2.2.2 Aterosclerosis .....	23
2.2.3 Litiasis biliar de colesterol .....	24
2.3 Tratamiento farmacológico de la hipercolesterolemia .....	25
2.3.1 Inhibidores de la síntesis hepática .....	25
2.3.2 Inhibidores de la absorción intestinal .....	26
2.3.3 Otros fármacos .....	26
2.3.4 Tratamiento con agentes naturales.....	27
2.4 <i>Eryngium carlinae</i> F. Delaroche .....	28
<b>3. Pregunta de investigación</b> .....	30
<b>4. Hipótesis</b> .....	30
<b>5. Objetivos</b> .....	31
5.1 Objetivo general.....	31
5.2 Objetivos específicos .....	31
<b>6. Material y métodos</b> .....	32
6.1 Material vegetal .....	32
6.2 Análisis fitoquímico .....	33

6.3 Ensayos de toxicidad .....	34
6.4 Animales de experimentación y tratamientos .....	35
6.5 Análisis bioquímicos .....	36
6.6 Análisis histopatológicos .....	37
6.7 Cuantificación de transportadores Abcg5 y Abcg8 .....	37
6.8 Análisis estadístico .....	39
<b>7. Resultados</b> .....	<b>40</b>
7.1 Obtención del extracto hidroalcohólico.....	40
7.2 Análisis fitoquímico .....	40
7.3 Pruebas de toxicidad .....	41
7.4 Inducción de la hipercolesterolemia .....	43
7.5 Análisis bioquímicos .....	44
7.6 Histopatología.....	45
7.7 Transportadores Abcg5 y Abcg8.....	48
<b>8. Discusión</b> .....	<b>50</b>
<b>9. Conclusiones</b> .....	<b>57</b>
<b>10. Referencias bibliográficas</b> .....	<b>58</b>

## Índice de cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Productos naturales con propiedades hipocolesteremiantes .....	25
<b>Cuadro 2.</b> Diseño experimental para evaluar el efecto hipocolesteremiante.....	33
<b>Cuadro 3.</b> Toxicidad aguda del extracto, evaluada de acuerdo con el protocolo de la OECD .....	39
<b>Cuadro 4.</b> Análisis de la concentración de parámetros bioquímicos .....	40
<b>Cuadro 5.</b> Concentración de colesterol total, HDL y No-HDL .....	42



## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Biosíntesis del colesterol .....	17
<b>Figura 2.</b> Proceso de colecta, secado, molienda, maceración y extracción del material vegetal .....	29
<b>Figura 3.</b> Obtención de sangre a través del seno venoso retroorbital .....	34
<b>Figura 4.</b> Método para tratar la muestra del tejido usado para el análisis molecular de proteínas intestinales .....	35
<b>Figura 5.</b> Espectros de RMN del a) D-manitol y b) hexacetato de D-manitol .....	37
<b>Figura 6.</b> Análisis histopatológicos en el hígado de los ratones .....	44
<b>Figura 7.</b> Resultados del análisis de Western Blot de los transportadores Abcg5 y Abcg8 .....	45
<b>Figura 8.</b> Expresión relativa de los transportadores Abcg5 y Abcg8. ....	46

## Abreviaturas

ABC	Casete de Unión a ATP
Abcg5 y g8	Casete de Unión a ATP, Subfamilia g, Miembro 5 y 8
ALT	Alanina transaminasa
ANDEVA	Análisis de varianza
Apo	Apolipoproteína
AST	Aspartato aminotransferasa
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HMGCoAr	2-hidroxi-2-metil glutaril Coenzima A reductasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad
NPC1L1	Proteína de Niemann-Pick C1L1
OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
PCSK9	Convertasa de proteínas subtilisina/kexina 9
RMN	Resonancia magnética nuclear
SCAP	Proteína activadora a través de clivaje
SREBP-2	Proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad

## Resumen

La hipercolesterolemia es una alteración metabólica definida como el incremento en la concentración del colesterol plasmático. *Eryngium carlinae* F. Delaroche es una planta medicinal utilizada en el tratamiento de enfermedades de los lípidos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del extracto hidroalcohólico de *Eryngium carlinae* F. Delaroche y de su principal metabolito, D-manitol en un modelo experimental de hipercolesterolemia. La concentración de colesterol total, HDL y no-HDL (LDL y VLDL) fue medida mediante ensayos fotocolorimétricos, también se midió la concentración de las enzimas hepáticas AST y ALT como indicadores de toxicidad. La expresión de los transportadores intestinales de colesterol Abcg5 y Abcg8 fue medida utilizando la técnica estandarizada del Western Blot. Nuestros resultados demostraron que el extracto hidroalcohólico administrado a una dosis de 100 mg/kg y el D-manitol a una dosis de 10 mg/kg tuvieron efectos significativos para disminuir la concentración plasmática de colesterol no-HDL sin alterar la concentración del colesterol HDL, asimismo, estas dosis no ejercieron toxicidad hepática en los ratones tratados. El tratamiento con el extracto incrementó la expresión del transportador intestinal Abcg8, mientras que el D-manitol disminuyó la expresión de los dos transportadores Abcg5/Abcg8, en comparación con la expresión de las proteínas en ratones alimentados con una dieta libre de colesterol. Considerando que los transportadores Abcg5/Abcg8 llevan a cabo el eflujo de colesterol, nuestros resultados demuestran que el efecto hipolipemiante del extracto hidroalcohólico puede estar asociado con el

incremento en la expresión de Abcg8, pero el efecto hipolipemiante del D-manitol es independiente de la expresión de estos transportadores.

**Palabras clave:** *Eryngium carlinae*, efecto hipocolesterolémico, effect, D-manitol, Unbeliferae

## Abstract

Hypercholesterolemia is a metabolic disorder characterized by a high concentration of cholesterol in the blood. *Eryngium carlinae* F. Delaroche is a medicinal plant used to treat lipid diseases. The goal of this work was to evaluate, in a model of hypercholesterolemia in mice, the hypocholesterolemic effect of a hydro alcohol extract of *E. carlinae* and its main metabolite, D-mannitol. The concentrations of HDL and non-HDL (VLDL and LDL) cholesterol were determined by colorimetric assays using hypercholesterolemic male CD1 mice treated with hydro alcohol extract or D-mannitol. The concentrations of aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) were determined as hepatotoxicity indices. The expression of the intestinal cholesterol transporters Abcg5 and Abcg8 was determined by standard western blot method. Our results showed that hydro alcohol extract at 100 or D-mannitol at 10 mg/kg doses reduced the concentration of non-HDL cholesterol, without altered the concentration of HDL cholesterol and devoid of damage to hepatocytes. Treatment with the extract increased Abcg8 intestinal transporter expression, while D-mannitol decreased the expression of both Abcg5 / Abcg8 transporters, all these data were compared to the expression of these proteins in mice fed with a cholesterol-free diet. Considering that Abcg5/Abcg8 transporters perform cholesterol efflux, our results demonstrate that the lipid-lowering effect of the hydro alcohol extract may be associated with increased Abcg8 expression. However, the hypocholesterolemic effect of D-mannitol is independent of expression of these intestinal transporters.

**Keywords:** *Eryngium carlinae*, hypocholesterolemic effect, D-mannitol,  
Umbeliferae

## 1. Introducción

La hipercolesterolemia es una alteración metabólica caracterizada por un incremento en la concentración plasmática del colesterol que, de acuerdo con la Asociación Americana para el Estudio del Corazón, debe de encontrarse en valores superiores a los 200 mg/dL o 5.5 mmol/L (Goff et al., 2014). Esta alteración metabólica puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis y con ello, la consecuencia de generar alguna enfermedad cardiovascular (Badimon et al., 2017). Existen varios fármacos utilizados en la terapia contra la hipercolesterolemia, tales como ezetimiba, bezafibratos, colestiramina, entre otros (Farnier et al., 2017); sin embargo, el tratamiento farmacológico más utilizado es con las estatinas, cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis hepática del colesterol. El tratamiento con estatinas produce reacciones adversas de importancia clínica, principalmente las asociadas con la toxicidad muscular y hepática, por lo que se continúan investigando nuevas sustancias y dianas terapéuticas que a futuro produzcan el mínimo número de efectos colaterales (Ramkumar et al., 2016).

Algunos productos naturales han demostrado eficacia para tratar la hipercolesterolemia, por lo que la investigación en materia de plantas medicinales es un importante campo de exploración (Castro-Torres et al., 2013). Asociado con esto último, algunas especies vegetales consideradas medicinales han demostrado eficacia para el tratamiento del colesterol elevado. Entre ellas destacan las plantas del género *Eryngium*. Las plantas medicinales *E. heterophyllum* y *E. carlinae* F. Delaroché (Apiaceae) son utilizadas en la medicina

tradicional mexicana para disminuir el colesterol plasmático (Noriega-Cisneros et al., 2012; Carreón-Sánchez et al., 2013). A pesar de su amplio uso en la medicina tradicional existen pocos estudios experimentales que demuestran su eficacia y no existe una investigación rigurosa sobre el mecanismo de acción implicado en los efectos hipocolesterolemiantes. Con el fin de aportar evidencias acerca del efecto hipocolesterolémico así como de los posibles blancos moleculares involucrados en esta actividad de *Eryngium carlinae*, se decidió evaluar un extracto hidroalcohólico de esta especie en un modelo experimental de hipercolesterolemia.



## **2. Antecedentes**

### **2.1 Colesterol**

El colesterol pertenece al grupo de los llamados esteroides, el cual se caracteriza por tener por lo menos un grupo hidroxilo en el esqueleto hidrocarbonado principal constituido por 27 carbonos. Este esteroide, fue descubierto por F. Poulletier de la Salle en 1769 como la fracción “aceitosa” de la bilis obtenida de la vesícula biliar extraída de cadáveres. La estructura del colesterol fue elucidada por Wieland por lo que recibió el premio Nobel en 1927 (Vance y Van den Bosch, 2000; Zárate et al., 2016). Por otro lado, los estudios de Marchand y Reinhold-Windaus indicaron la importancia del colesterol en la génesis de la aterosclerosis (Zárate et al., 2016). Así mismo, Cornforth, premio Nobel 1975, demostró la importancia de la enzima HMG-CoA reductasa en la síntesis del colesterol. Una investigación fundamental fue el descubrimiento del receptor celular hepático para el acoplamiento de la lipoproteína de baja densidad (r-LDL) realizada por Brown y Goldstein por lo que recibieron el Nobel de Fisiología y Medicina en 1985 (Zárate et al., 2016).

#### **2.1.1 Funciones biológicas**

El colesterol desempeña múltiples funciones en el organismo, dentro de las más destacadas podemos mencionar las siguientes: forma parte de la composición de la membrana celular y es un precursor para la biosíntesis de ácidos biliares, vitamina D y hormonas esteroideas (Anderson, 2003).

*Composición de las membranas.* El colesterol es un componente químico esencial de las membranas eucariotas, su concentración en dicho sitio es muy importante para proporcionar fluidez y grosor a la membrana y para estructurar los dominios

de lípidos implicados en la transducción de señales (Jesch y Carr, 2017). Más del 90% del colesterol que se encuentra en la célula se localiza en la membrana plasmática, en donde forma parte de las denominadas balsas de lípidos, junto con fosfolípidos, esfingolípidos, otros esteroides y proteínas de membrana (Fielding y Fielding, 2004). En dichas balsas, el colesterol se sitúa junto a los fosfolípidos, de tal manera que su esqueleto esteroide se ubica en paralelo a la cadena de ácidos grasos y su grupo hidroxilo cercano a los ésteres de ácido fosfórico de los fosfolípidos (Goluszko y Nowicki, 2005). La estructura química del colesterol y otros esteroides es rígida, a diferencia de otros lípidos de membrana, y esto disminuye la fluidez de la membrana haciéndola selectiva y estable al transporte de sustancias y microorganismos (Huang y London, 2016).

*Precursor de la biosíntesis de ácidos biliares.* Los ácidos biliares primarios son sintetizados dentro del hígado a partir del colesterol y, posteriormente, por acción bacteriana se convierten en ácidos biliares secundarios (Yang et al., 2016). El colesterol entra a una ruta metabólica en la cual se generan muchas reacciones bioquímicas, dentro de las cuales la enzima colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa es muy importante (Martinot et al., 2017). Esta enzima es importante en la denominada vía clásica para la síntesis de ácidos biliares ya que inicia el metabolismo del colesterol mediante una saturación del doble enlace, posteriormente otros cambios como lo son la epimerización del grupo 3 $\alpha$  hidroxilo y la hidroxilación en las posiciones 7 $\alpha$  y 12 $\alpha$ , precedidas por la ruptura oxidativa de la cadena lateral (Juřica et al., 2016). Los ácidos biliares se conjugan con glicina y taurina y a su vez, estos pueden formar sales sódicas o potásicas que conforman la bilis. Los

ácidos biliares neutralizan el quimo de la digestión y emulsifican una amplia gama de lípidos en el intestino delgado, debido a su naturaleza anfipática (Chiang, 2004).

*Influencia en la síntesis de vitamina D<sub>3</sub>.* La síntesis de la vitamina D<sub>3</sub> se produce principalmente cuando la radiación ultravioleta que proviene de la luz solar (longitud de onda entre 290 y 315 nm) incide en la piel y reacciona con un intermediario del colesterol, que es el 7-dehidrocolesterol (Mason et al., 2011). Se produce una reacción fotolítica, seguida por una isomerización térmica que no requiere de la participación de enzimas, finalizando con la síntesis de la vitamina D<sub>3</sub> (Gui-Dong y Okamura, 1995). Esta vitamina también recibe el nombre de colecalciferol, debido a que el 7-dehidrocolesterol es el precursor esteroide en las células animales. El término “colé” significa bilis y es comúnmente asociado con el colesterol, que es una de las sustancias más abundantes en la vesícula biliar (Zuluaga et al., 2011). La vitamina D también es considerada como una prohormona, su estructura química es similar a la estructura de aquellas hormonas que poseen la estructura básica del anillo ciclopentanoperhidrofenantreno, tales como cortisol, aldosterona, estradiol, entre otras (Zuluaga et al., 2011).

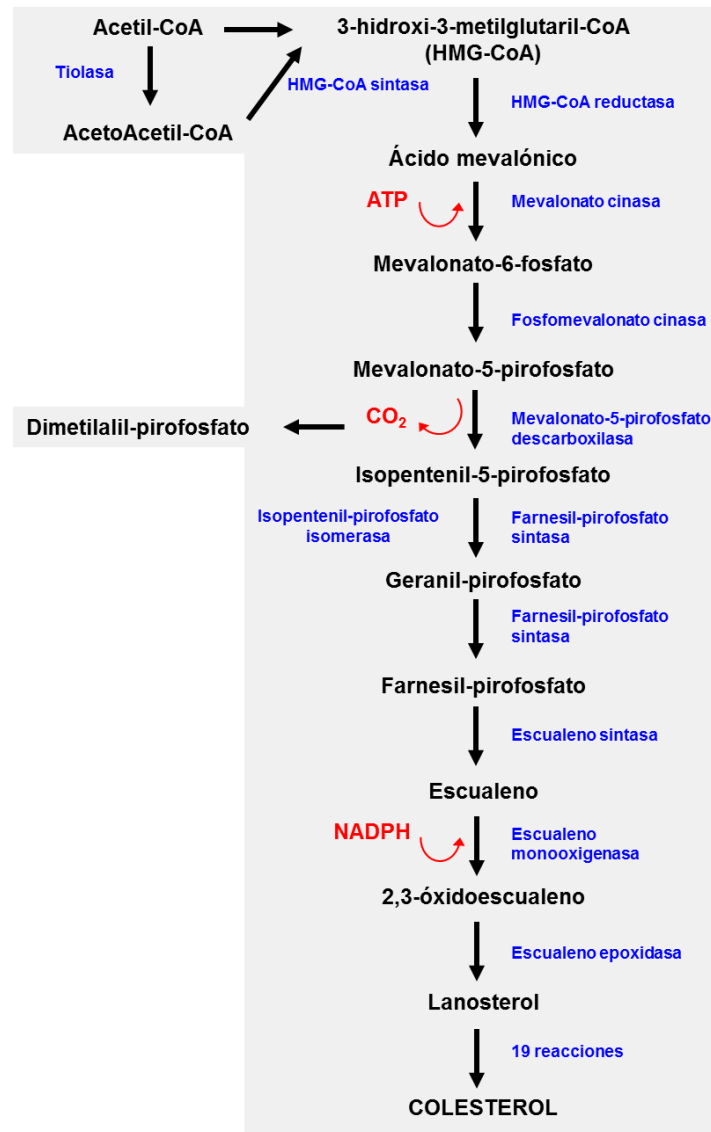
*Papel en la formación de hormonas esteroideas.* El colesterol es el precursor de cinco principales clases de hormonas denominadas esteroideas, que son los progestágenos, glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos y estrógenos. Estas hormonas cumplen con muchas funciones en el organismo; por ejemplo, la progesterona, que es uno de los principales progestágenos, prepara el revestimiento uterino para la implantación del óvulo y es indispensable durante el

desarrollo embrionario. El desarrollo de características sexuales masculinas es influenciado por los andrógenos; mientras que, los estrógenos son necesarios para el desarrollo de las características sexuales femeninas (Berg et al., 2002). Los glucocorticoides promueven la gluconeogénesis y la formación del glucógeno, incrementan el catabolismo de lípidos y proteínas e inhiben la respuesta inflamatoria. Los mineralocorticoides actúan en los túbulos distales del riñón para incrementar la reabsorción iónica de sodio y la excreción de iones potasio e hidrógeno, esto conlleva a un incremento en el volumen sanguíneo y en la presión arterial (Berg et al., 2002).

### **2.1.2 Biosíntesis**

El retículo endoplásmico es el principal organelo que controla la síntesis de colesterol y de otros lípidos de membrana (Sozen y Ozer, 2017). El colesterol es uno de los tantos esteroides que el organismo puede sintetizar, su ruta metabólica está conformada por reacciones químicas específicas catalizadas por más de 20 enzimas (Singh et al., 2013). Existen dos vías paralelas que sintetizan colesterol en las células del organismo, la vía clásica de Kandutsch-Russell y la vía de Bloch (Singh et al., 2013). Ambas vías tienen muchos pasos en común, desde las reacciones que se inician a partir del acetil coenzima A hasta la formación del lanosterol (Mitsche et al., 2015). Dentro de la ruta metabólica existe una enzima considerada como limitante para la síntesis de colesterol, la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCoAr), que se encarga de catalizar la conversión de HMGCoA a mevalonato. Posteriormente, el mevalonato se utiliza para la síntesis de isoprenoides no esteroideos y de colesterol (Chen et al., 1975).

En la figura 1 se resumen los productos de reacción y enzimas más importantes en la biosíntesis del colesterol.



**Figura 1.** Biosíntesis del colesterol.

La biosíntesis de colesterol está regulada principalmente por la Proteína de Unión al Elemento de Respuesta a Esteroides 2 (SREBP-2). Cuando la concentración de colesterol es alta, SREBP-2 se localiza en la membrana del retículo endoplásmico

formando un complejo con la Proteína Activadora a través del Clivaje de SREBP (SCAP) y cuando las células agotan la reserva de esteroides, el complejo SCAP-SREBP-2 se moviliza del retículo endoplásmico al aparato de Golgi donde se escinde y queda libre SREBP-2, quien puede ingresar al núcleo de la célula para unirse a regiones potenciadoras del elemento de respuesta a esteroides, activando su transcripción e influyendo en la síntesis de muchos esteroides (Singh et al., 2007).

### **2.1.3 Transporte**

El colesterol es una molécula lipofílica y debido a esta naturaleza química, requiere de mecanismos específicos de transporte en el organismo, donde la mayor parte de los fluidos están constituidos por agua. Dos de los medios más importantes a través de los cuales el colesterol se transporta son la bilis y la sangre, siendo este último el de mayor relevancia clínica (Horton et al., 2002). El colesterol se transporta en la sangre por medio de lipoproteínas, dentro de las cuales se destacan los quilomicrones, VLDL, LDL y HDL (van der Wulp et al., 2013). Las lipoproteínas son macromoléculas conformadas por un núcleo lipídico, una capa externa de fosfolípidos y apoproteínas, estas últimas son los ligandos específicos de los receptores de membrana (Errico et al., 2013). Los quilomicrones presentan el mayor tamaño y la menor densidad de todas las lipoproteínas, en su mayor parte se ensambla en el intestino delgado y transportan lípidos, principalmente triglicéridos. La principal apolipoproteína de los quilomicrones es la apo B-48 (Carroll et al., 2002). La lipoproteína VLDL transporta triglicéridos, y colesterol; sus principales apolipoproteínas son las apo B-100 y apo A-1; a partir

de estas se sintetizan las LDL (Johansen et al., 2011). La LDL transporta el colesterol hacia tejidos periféricos. Las principales apolipoproteínas de LDL son apo B-100 y apo E, quienes son ligandos específicos del receptor de LDL que se expresa principalmente en los hepatocitos (Zilversmit, 1995). La lipoproteína HDL también transporta colesterol desde los tejidos periféricos hacia el hígado, captándolo a través de su principal apolipoproteína que es la apo A-1 (Goldstein and Brown, 2009).

## **2.2 Enfermedades del colesterol**

### **2.2.1 Hipercolesterolemia**

La hipercolesterolemia se caracteriza por un incremento en la concentración del colesterol plasmático (valores superiores a los 200 mg/dL) y es considerada como el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Choi et al., 2017). Esta alteración metabólica se clasifica como primaria o secundaria atendiendo a su etiología. Los factores de riesgo del primer tipo son la vida sedentaria, malos hábitos alimenticios y trastornos genéticos. La hipercolesterolemia secundaria se puede desarrollar por la presencia de algunas enfermedades, tales como diabetes mellitus, falla aguda renal, hipotiroidismo o la ingesta de algunos fármacos como las tiazidas o los  $\beta$ -bloqueantes no selectivos (Zárate et al., 2016). Dentro de la clasificación primaria, se encuentra una alteración muy frecuente denominada hipercolesterolemia familiar homocigótica, que es un trastorno autosómico dominante en el que incrementa la concentración plasmática del colesterol LDL ( $>190$  mg/dL) (Chang y Robidoux, 2017). Elevados índices de riesgo cardiovascular son debidos a este tipo de hipercolesterolemia;

antes de los 60 años, el 80% de hombres y el 50% de las mujeres presentan estos problemas cardiacos (Varghese, 2014). El diagnóstico de este tipo de hipercolesterolemia está fundamentado en el análisis de algunas manifestaciones clínicas, el historial familiar de cada paciente, el estudio de la concentración del colesterol LDL y, actualmente, algunos ensayos que involucran análisis moleculares (Gouni-Berthold y Berthold, 2014).

### **2.2.2 Aterosclerosis**

La aterosclerosis es considerada como un síndrome que se presenta en los vasos sanguíneos, quienes se ven estrechados en su luz por la acumulación de capas de lípidos (Torres et al., 2015). En esta alteración se forma una placa de colesterol en el endotelio vascular de las arterias de grueso y mediano calibre, el colesterol que llega hasta estas zonas es transportado por la lipoproteína LDL, quien experimenta algunos cambios químicos como la oxidación de sus componentes, principalmente lípidos y proteínas (Carvajal-Carvajal, 2015). Cuando la LDL se oxida, ya no puede ser reconocida por su principal ligando, que es el receptor de LDL; ahora es reconocida por otro tipo de receptores denominados “scavenger” o basureros (Olguin-Contreras et al., 2004). La oxidación de las LDL produce reacciones bioquímicas específicas, alterando la homeostasis de los vasos sanguíneos (Torres et al., 2015); por ejemplo, se producen proteínas que inducen la llegada de monocitos al espacio endotelial en donde se están acumulando los lípidos y esto conlleva a que se sobre expresen los factores estimulantes de macrófagos y granulocitos (Peng et al., 2017). Las LDL oxidadas se acumulan dentro de macrófagos y otros fagocitos para formar las células espumosas, se



produce la secreción de péptidos vasoconstrictores y factores de crecimiento que inducen inflamación y fibrosis. La incapacidad de las células espumosas para metabolizar los ésteres del colesterol da como resultado su acumulación en el citoplasma de las células; posteriormente el colesterol sigue depositándose en la capa íntima de las arterias y su pared se adelgaza (Handelsman y Shapiro, 2017). Con esto se incrementa el riesgo de formación de un coágulo que puede obstruir el espacio vascular, produciendo un evento cardiovascular o cerebrovascular (Handelsman y Shapiro, 2017).

### **2.2.3 Litiasis biliar de colesterol**

Los cálculos biliares de colesterol son una enfermedad muy común en el ámbito de la gastroenterología (Rebholz et al., 2018). La fisiopatología de esta enfermedad es poligénica, porque están involucrados desajustes en la secreción biliar de colesterol (transportadores canaliculares del tipo ABC: ABCB4, ABCB11, ABCG5/8 y la proteína NPC1L1), reacciones de inflamación en el epitelio de la vesícula biliar, producción de mucinas (lodo biliar) y alteraciones en la motilidad biliar (Portincasa y Wang, 2012). Esto hace muy difícil la búsqueda de una diana terapéutica, ya que existen muchos puntos para analizar. Los fármacos empleados para el tratamiento de cálculos biliares, muchas veces tiene propiedades para disminuir el colesterol, pero sólo el ácido ursodesoxicólico es el fármaco autorizado (Portincasa et al., 2012). Las estatinas y ezetimiba tienen propiedades para prevenir el desarrollo de cálculos, pero cuando esta enfermedad ya está instaurada, los efectos de dichos fármacos son muy limitados (Lioudaki et al., 2015). Debido a esto, la investigación en productos naturales es un campo

alternativo que puede explorarse con el fin de encontrar posibles nuevos fármacos.

### **2.3 Tratamiento farmacológico de la hipercolesterolemia**

En el tratamiento para la hipercolesterolemia se usan fármacos que actúan en sitios clave en donde el colesterol se sintetiza o se absorbe. Entre los medicamentos más utilizados se encuentran las estatinas, ezetimiba, colestiramina y, en la actualidad, anticuerpos monoclonales (Aronow, 2015).

#### **2.3.1 Inhibidores de la síntesis hepática**

Las estatinas son los fármacos indicados para el tratamiento de la hipercolesterolemia (Wald y Law, 2012). El mecanismo de las estatinas consiste en inhibir de forma selectiva la enzima HMGCoA reductasa. Esta inhibición implica la sobre expresión del factor de transcripción SREBP-2, quien produce la expresión de receptores de LDL para captar el colesterol de la periferia (Kobayashi et al., 2013). El uso de estatinas, tanto en modelos biológicos como en seres humanos, conlleva a muchos efectos adversos, entre los que destacan la toxicidad muscular y hepática. En cultivos de hepatocitos aislados de la rata, se ha demostrado que la atorvastatina, simvastatina y lovastatina producen efectos citotóxicos a diferentes concentraciones, incrementando la cantidad de especies reactivas de oxígeno y de productos de la peroxidación lipídica (Abdoli et al., 2013). En ratones CD1 se ha demostrado que dosis alta de pravastatina (500 mg) produce efectos hepatotóxicos en un tratamiento a corto plazo (Díaz-Zagoya et al., 1999). En estudios clínicos, las estatinas incrementan la concentración de

transaminasas, creatina quinasa y causan alteraciones en la respiración mitocondrial y homeostasis del calcio, produciendo toxicidad muscular (du Souich et al., 2017).

### **2.3.2 Inhibidores de la absorción intestinal**

En este grupo farmacológico destaca ezetimiba, un fármaco que pertenece a la familia de compuestos de azetidinona y es un inhibidor selectivo de la absorción intestinal de colesterol (Wang et al., 2011). Esta sustancia fue desarrollada por los laboratorios Shering-Plough a finales de la década de los 90, como un tratamiento eficaz para disminuir la hipercolesterolemia (Lipka, 2003). La diana terapéutica de ezetimiba es la proteína NPC1L1 que se expresa en el intestino delgado, y actúa como un transportador del colesterol que proviene de la dieta (Johnson y Pfeffer, 2016). La aplicación terapéutica de este fármaco ha llevado a un importante avance en el tratamiento de la hipercolesterolemia y en la prevención de enfermedades cardiovasculares.

### **2.3.3 Otros fármacos**

En la terapia de la hipercolesterolemia se han investigado nuevos blancos farmacológicos, tales como la convertasa de proteínas subtilisina/kexina 9 (PCSK9) y la proteína de transferencia de triglicéridos microsomales. Algunos fármacos que actúan sobre PCSK9 son los anticuerpos monoclonales Evolocumab y Alirocumab (Cicero et al., 2018). Dichas sustancias han sido autorizadas por la FDA y por la Agencia Europea de Medicamentos como complemento de la dieta, incluso pueden utilizarse en una terapia concomitante con estatinas para pacientes que tengan un alto riesgo de un evento cardiovascular o bien

hipercolesterolemia familiar heterocigótica, en el caso de evolocumab, también se utiliza para tratar la hipercolesterolemia homocigótica (Agabiti et al., 2016). Algunas sustancias que actúan como secuestradores de ácidos biliares también han demostrado eficacia en la disminución de la concentración plasmática de colesterol, como la colestiramina, el colestipol y el colesevelam (Scaldaferri et al., 2013).

#### **2.3.4 Tratamiento con agentes naturales**

Numerosas plantas medicinales y algunos de sus metabolitos han demostrado eficacia en el tratamiento de la hipercolesterolemia. En algunos estudios su eficacia se ha complementado con el análisis de los mecanismos de acción o posibles mecanismos involucrados en el tratamiento (Castro-Torres et al., 2013). En el cuadro 1 se presentan algunas plantas medicinales y metabolitos que han demostrado efectos significativos en el tratamiento de la hipercolesterolemia.

## Cuadro 1

Productos naturales con propiedades hipocolesterolemiantes.

Producto natural	Estudios sobre hipercolesterolemia	Referencia
Ajo ( <i>Allium sativum</i> )		Srinivasan, 2013
Cebolla ( <i>Allium cepa</i> )	Estos productos naturales, que incluyen extractos vegetales y metabolitos secundarios, han demostrado efectos hipocolesterolémicos en ratones de las cepas CD1 y C57BL/6, a los cuales se les ha inducido la hipercolesterolemia con una dieta enriquecida con colesterol y ácido cólico. En algunos casos, se ha reportado que el incremento de la expresión de los transportadores intestinales <b>ABCG5 y ABCG8</b> está involucrado en los efectos terapéuticos, sin embargo, aún falta complementar los estudios moleculares de otras proteínas que funcionan como transportadores y receptores del colesterol.	Vidyashankar et al., 2010
Fenogreco ( <i>Trigonella foenum- graecum</i> )		Reddy y Srinivasan, 2009
Capsaicina y curcumina		Shubha et al., 2011
Rábano negro ( <i>Raphanus sativus</i> L. var <i>niger</i> )		Castro- Torres et al., 2013

### 2.4 *Eryngium carlinae* F. Delaroche

*Eryngium carlinae* F. Delaroche, comúnmente conocida como “hierba del sapo” es una planta utilizada en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento del colesterol elevado en sangre y de la diabetes mellitus (Noriega-Cisneros et al., 2012). Pertenece a la familia Umbelliferae, se distribuye en ecosistemas donde abundan bosques de abetos, pino y roble; por lo general, en donde los suelos son profundos y fértiles. La altura a la que esta planta puede vivir se encuentra entre 2020 y 2590 metros sobre el nivel del mar. Las decocciones de las partes aéreas se utilizan para el tratamiento de la tos, enfermedades de la próstata, alteraciones en la concentración de lípidos y diabetes mellitus (Bello, 2006).

Existen muy pocos estudios reportados sobre *Eryngium carlinae* F. Delaroche, en uno de ellos se demostraron efectos significativos para disminuir la concentración de creatinina, ácido úrico, colesterol total y triglicéridos en un modelo experimental de diabetes mellitus en ratas Wistar; las cuales fueron administradas con el extracto orgánico de la planta a dosis de 30 mg/kg durante 40 días (Noriega-Cisneros et al., 2012). En otro estudio, esta planta disminuyó la concentración de glucosa, ácido úrico y creatinina en ratas obesas; además, indujo un efecto hipolipemiante en riñón y disminuyó el estrés oxidativo (Pérez-Ramírez et al., 2016).

Otra especie que también es conocida como “Hierba del Sapo” es *Eryngium heterophyllum* y ha demostrado importantes efectos hipocolesterolemiantes en animales de experimentación (Navarrete et al., 1990); sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado el efecto hipolipemiante de *Eryngium carlinae* y mucho menos su mecanismo de acción, por lo que ambos estudios representan un trabajo importante en nuestra investigación.

El género *Eryngium* comprende más de 250 especies, algunas de ellas se han analizado y dentro de los fitoquímicos aislados se encuentran flavonoides, taninos, saponinas y triterpenos; se ha identificado a eryngial como uno de los aceites esenciales que ha demostrado propiedades antibacterianas (Erdem et al., 2015).

Los estudios fitoquímicos de la hierba del sapo son escasos, está reportado que *Eryngium heterophyllum* contiene manitol, glucosa y beta-sitosterol (Navarrete et al., 1990); sin embargo, de *Eryngium carlinae* aún no se reportan componentes fitoquímicos activos.

### **3. Pregunta de investigación**

¿Cuál es el posible mecanismo de acción que ejerce *Eryngium carlinae* F. Delaroche en el tratamiento de la hipercolesterolemia en un modelo experimental?

### **4. Hipótesis**

El extracto hidroalcohólico y el metabolito mayoritario (D-manitol) de *E. carlinae* producen efectos hipocolesterolémicos en ratones mediante el incremento en la expresión de las proteínas Abcg5 y Abcg8 involucradas en el transporte intestinal del colesterol.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del extracto hidroalcohólico de *Eryngium carlinae* F. Delaroche así como del metabolito más abundante del extracto sobre la expresión de proteínas del transporte intestinal del colesterol en ratones con hipercolesterolemia.

### 5.2 Objetivos específicos

- a) Colectar y clasificar taxonómicamente la planta medicinal *Eryngium carlinae* F. Delaroche.
- b) Obtener el extracto hidroalcohólico de las partes aéreas del vegetal.
- c) Evaluar la toxicidad aguda y crónica del extracto vegetal.
- d) Evaluar el efecto del extracto en las concentraciones del colesterol total, HDL y LDL en ratones con hipercolesterolemia.
- e) Evaluar el efecto del extracto en la expresión de las proteínas intestinales Abcg5 y Abcg8.
- f) Aislar y elucidar estructuralmente el metabolito más abundante del extracto de *Eryngium carlinae* F. Delaroche.
- g) Evaluar el efecto del metabolito más abundante en los parámetros bioquímicos y expresión de proteínas antes mencionados.
- h) Realizar estudios histopatológicos de los ratones tratados con el extracto y con el metabolito mayoritario.



## 6. Material y métodos

### 6.1 Material vegetal

Las partes aéreas de *Eryngium carlinae* F. Delaroche (flores, hojas y tallos) se colectaron en julio de 2006 en los alrededores de la ciudad de Atlixco, Estado de Puebla. La especie vegetal fue identificada por la Dra. Isolda Luna, taxónoma del Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM. Un ejemplar de la planta se almacenó en dicho herbario con el número de identificación 097586. Se utilizó 1 kg de material vegetal, el cual fue secado a temperatura ambiente y posteriormente molido. El material vegetal se maceró en 4 litros de etanol/agua (7:3). Posteriormente la mezcla de disolventes se destiló a presión reducida (60 °C durante dos horas). En la figura 2 se observa el material vegetal utilizado y parte del procedimiento para obtener el extracto.



**Figura 2.** Proceso de colecta, secado, molienda, maceración y extracción del material vegetal

## 6.2 Análisis fitoquímico

**Síntesis del hexacetato de D-Manitol.** Un gramo del extracto hidroalcohólico de *E. carlinae* se mezcló con 100 mL de metanol, obteniéndose una solución y un precipitado. El residuo insoluble (510 mg) obtenido por filtración se disolvió en una mezcla de piridina (1mL) y anhídrido acético (1 mL) (ambas sustancias en grado reactivo), se mantuvo con agitación constante a 60 °C durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se extrajo con acetato de etilo, realizando 3 lavados de 10 mL cada uno. La solución orgánica se lavó sucesivamente con una disolución de HCl al 10 % y posteriormente con agua. La solución de AcOEt se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se separó por medio de cromatografía en columna, utilizando una fase estacionaria de sílice y una fase móvil formada por una mezcla de disolventes, iniciando con hexano y luego con hexano-acetato de etilo. En la mezcla de hexano-acetato 9:1 se separó el componente acetilado y los resultados de su identificación se compararon con datos de la literatura. Al corroborar que nuestro derivado acetilado se trató del D-manitol, el siguiente paso del análisis fitoquímico fue extraer dicho metabolito sin acetilar.

**Extracción del D-manitol.** Se utilizaron 4 g del extracto hidroalcohólico, el cual se resuspendió en 50 mL de metanol. La mezcla se filtró y a la solución resultante se le adicionó carbón activado, posteriormente la mezcla se calentó durante 5 minutos en baño María a 40<sup>0</sup> C. Después de enfriar la mezcla a temperatura ambiente, el carbón activado fue removido de la solución mediante filtración al vacío utilizando un embudo Büchner con celita. El disolvente se destiló a presión

reducida, obteniéndose residuos sólidos que se recrystalizaron, al final se obtuvieron 650 mg de D-manitol, cuya identificación fue realizada a partir de sus datos espectroscópicos en comparación con aquellos de la literatura.

### **6.3 Ensayos de toxicidad**

Se realizó un primer estudio de toxicidad aguda de acuerdo con el protocolo de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD, 2011). Se utilizaron ratones hembra de la cepa CD1 con un peso entre 28-32 gramos y una edad entre 8-10 semanas. Se administró el extracto vegetal en 4 dosis diferentes por vía oral (175, 550, 1750 y 2000 mg/kg), usando como vehículo agua destilada. Las administraciones se realizaron a través de una sonda gastroesofágica de acero inoxidable a las 10 AM.

Realizamos un segundo ensayo de toxicidad más prolongado, con una duración de 4 semanas para igualar el tiempo en el que los ratones fueron tratados para el estudio de hipercolesterolemia. Para este estudio utilizamos ratones con las mismas características físicas que el estudio de toxicidad anterior. Los animales fueron tratados con el extracto vegetal a dos dosis (100 y 500 mg/kg/día) y con los metabolitos (10 mg/kg) durante 4 semanas. Para complementar este estudio de toxicidad y asociarlo con nuestro estudio de hipercolesterolemia, se midieron las concentraciones de colesterol total y de enzimas hepáticas ALT y AST. Para la cuantificación del colesterol total (mg/dL) y de las enzimas (UI/L) se utilizaron kits comerciales de la Marca Accelab, México y un fotolorímetro Daytona-Randox.

#### **6.4 Animales de experimentación y tratamientos**

Se utilizaron ratones machos de la cepa CD1 ( $9\pm 2$  semanas de edad y  $30\pm 2$  g de peso) que fueron comprados en los Laboratorios Harlan, México (Actualmente llamado ENVIGO, México S.A.) y almacenados en el Bioterio de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo en condiciones estándares de presión, humedad, temperatura y ciclo luz/oscuridad. El almacenamiento de los animales se realizó en cajas de policarbonato y posterior a una semana de aclimatación se dividieron al azar en siete grupos experimentales, con una  $n=6$ . El tratamiento para cada grupo experimental se ve resumido en el cuadro 2. La hipercolesterolemia se indujo con una dieta estandarizada con 1% de colesterol y 0.5% de colato de sodio. Después de 4 semanas con libre acceso a la dieta, se iniciaron los tratamientos durante 4 semanas más, sin suspender la dieta hipercolesterolémica. El extracto y los compuestos se administraron una vez al día por vía oral, utilizando una sonda de acero inoxidable.

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité Interno Ético para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio (15-CIEQUAL) del Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; asimismo, la investigación se desarrolló bajo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999.

## Cuadro 2

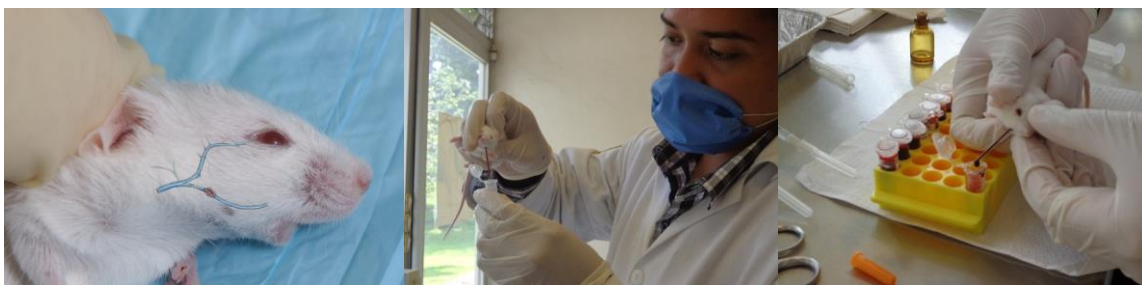
Diseño experimental para evaluar el efecto hipocolesterolemiante.

N°	Grupo experimental	Tratamiento
1	Control	Dieta estandarizada para roedores (Laboratory Rodent Chow 5001, Harlan, México) a libre acceso.
2	Hipercolesterolemia	Dieta hipercolesterolémica (colesterol 1% y colato de sodio 0.5%, TD 03451, Harlan, México) a libre acceso.
3	Ezetimiba	Ezetimiba (Merck/Schering-Plough, Pharmaceuticals, USA) a dosis de 10 mg/kg y dieta hipercolesterolémica a libre acceso.
4	Extracto hidroalcohólico	Extracto de <i>Eryngium Carlinae</i> F. Delaroche a dosis de 100 mg/kg y dieta hipercolesterolémica a libre acceso.
5	Extracto hidroalcohólico	Extracto de <i>Eryngium Carlinae</i> F. Delaroche a dosis de 500 mg/kg y dieta hipercolesterolémica a libre acceso.
6	Hexacetato de D-manitol	Hexacetato de D-manitol a dosis de 10 mg/kg y dieta hipercolesterolémica a libre acceso.
7	D-manitol	D-manitol a dosis de 10 mg/kg y dieta hipercolesterolémica a libre acceso.

### 6.5 Análisis bioquímicos

Al finalizar el protocolo experimental, los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico (70 mg/kg) y se les extrajo de 1 a 1.5 mL de sangre a través del seno venoso retro-orbital, posteriormente, fueron eutanizados por dislocación cervical (Figura 3). La sangre fue centrifugada para la obtención del suero y se midieron las concentraciones de colesterol total, colesterol HDL y LDL con un fotolorímetro (Daytona Randox, México). Para el análisis bioquímico se

utilizaron kits comerciales con fundamentos enzimáticos (total cholesterol CH201, 6 x 100 mL; HDL cholesterol-direct clearance method, CH1383, R1 3 x 2.5 L R2 1 x 2.5 L; LDL cholesterol CH2656 R1 6 x 78 mL R2 3 x 52 mL and glucose, GOD-PAP, and hexokinase, GL 364 10 x 100 mL, Accelab, México).



**Figura 3.** Obtención de sangre a través del seno venoso retroorbital

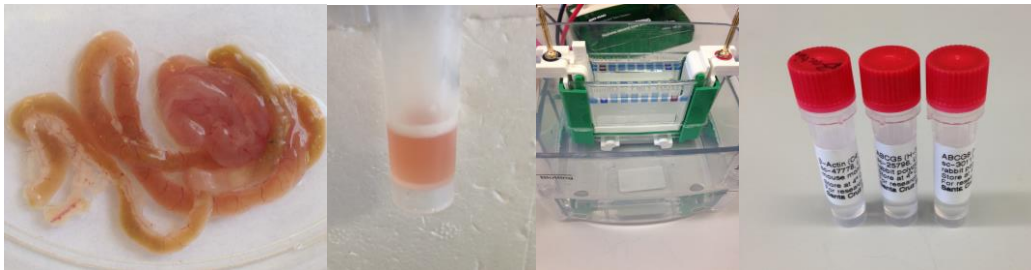
## **6.6 Análisis histopatológicos**

Posteriormente, se extrajo el hígado, se dividió en cuatro partes iguales y finalmente se almacenó en formaldehído al 4%. Los tejidos hepáticos se embebieron en parafina y se realizaron cortes (8 micras) utilizando un micrótomo. Las muestras se tiñieron con hematoxilina-eosina y revisadas por la patóloga Samantha Romero de la Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

## **6.7 Cuantificación de transportadores Abcg5 y Abcg8**

Para determinar la presencia de los transportadores Abcg5 y Abcg8 se extirparon el duodeno y yeyuno de cada ratón y se almacenaron a una temperatura de -70 °C. Cada muestra se mezcló con un inhibidor de proteasas y se homogenizó; posteriormente, la mezcla se centrifugó a 3,500 rpm y se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Lowry. Se trabajó con la técnica estandarizada de

Western Blot para el análisis proteico de los transportadores Abcg5 y Abcg8 (Figura 4). Se realizaron cuatro réplicas de cada muestra para demostrar la reproducibilidad del experimento. Los anticuerpos utilizados se adquirieron en Santa Cruz, Biotecnology, Inc, México. Una vez cuantificada la proteína, se aplicó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% para separarlas; posteriormente, los geles se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno, que se incubaron con una solución de bloqueo. Los anticuerpos fueron diluidos en proporción 1:100 en una disolución buffer e incubados con las membranas toda la noche a una temperatura de 4°C. El anticuerpo secundario fue diluido a razón de 1:2000 y acoplado con peroxidasa de rábano. Se cuantificaron las proteínas por quimioluminiscencia y los resultados se normalizaron con  $\beta$ -actina.



**Figura 4.** Método para tratar la muestra del tejido usado para el análisis molecular de proteínas intestinales

## **6.8 Análisis estadístico**

Se utilizó el programa estadístico Sigma Plot y se realizó un análisis de varianza de una vía (ANDEVA), con la prueba post hoc de Tukey para comparar los efectos en los diferentes grupos experimentales. Los resultados se presentan graficados como la media  $\pm$  el error estándar, considerando una diferencia estadística significativa de  $p < 0.05$



## 7. Resultados

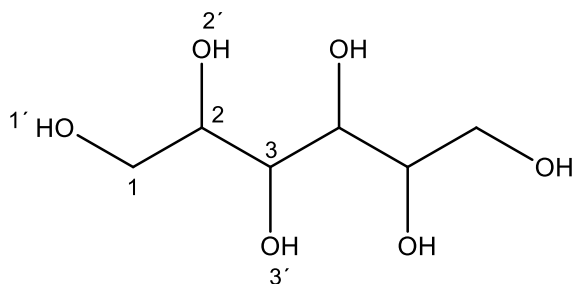
### 7.1 Obtención del extracto hidroalcohólico

Se obtuvieron 10.55 g de extracto hidroalcohólico de la hierba del sapo a partir de 1 kg de material vegetal seco (1.05% de rendimiento). El extracto presentó una consistencia viscosa, coloración verde bandera y un olor a cítricos.

### 7.2 Análisis fitoquímico

A partir de 4 gramos de extracto hidroalcohólico se obtuvieron 650 mg de D-manitol, consiguiéndose un rendimiento del 16.86%, mientras que de 650 mg de extracto acetilado se obtuvieron 113 mg de hexacetato de D-manitol, con rendimiento del 16.25%, el D-manitol constituyó el metabolito mayoritario del extracto. Las masas de las sustancias obtenidas por medio de cromatografía en columna no fueron más allá de los 2 mg, por lo que no se consideraron para evaluarlas. Por medio de polarimetría se determinó que el manitol giró el plano de polarización de la luz hacia la derecha, por esto lo reportamos como D-manitol. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) del D-manitol y su derivado acetilado se presentan en la figura 5.

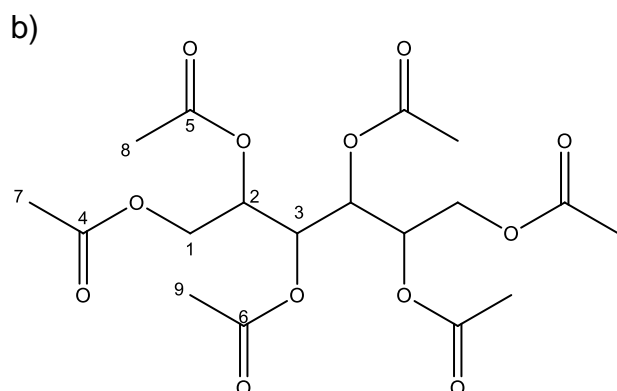
a)



a) D-manitol

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  4.4 (d, 2H, OH-2',  $J= 6\text{Hz}$ ), 4.32 (t, 2H, OH-1',  $J= 6\text{Hz}$ ), 4.13 (d, 2H, OH-3',  $J= 6\text{Hz}$ ), 3.62-3.33 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-1, CH-2, CH-3).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  71.75 (C-2), 70.12 (C-3), 64.28 (C-1).



b) Hexacetato de D-manitol

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  15.33 (d, 2H, OH,  $J= 8.1\text{ Hz}$ ), 5.00 (m, 2H, OH), 4.17 (dd, 2H, ,  $J_1= 3\text{ Hz}$ ,  $J_2= 12\text{ Hz}$ ), 4.05 (dd, 2H, ,  $J_1= 5.7\text{ Hz}$ ,  $J_2= 12\text{ Hz}$ ), 2.05 (s, 6H, CH<sub>3</sub>-), 2.00 (s, 6H, CH<sub>3</sub>-), 1.98 (s, 6H, CH<sub>3</sub>-).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  170.4 (C-4), 169.85 (C-5), 169.81 (C-6), 68.0 (C-3), 67.5 (C-2), 61.8 (C-1), 21.0 (C-8), 20.8 (C-7, C-9).

**Figura 5.** Espectros de RMN del a) D-manitol y b) hexacetato de D-manitol.

### 7.3 Pruebas de toxicidad

En la prueba de toxicidad aguda no se observaron signos de toxicidad durante las primeras 3 horas (incoordinación motora, piloerección y dilatación de pupilas) Esto

permite sugerir que la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) se encuentra en un valor superior a los 2000 mg/kg de acuerdo con el protocolo de la OECD. Los resultados se presentan en el cuadro 3.

### Cuadro 3

Toxicidad aguda del extracto, evaluada de acuerdo con el protocolo de la OECD.

Dosis del extracto (mg/kg) vía oral	% Mortalidad	Signos de toxicidad	% Supervivencia
Control	0	0/1	100
Vehículo (agua)	0	0/1	100
175	0	0/1	100
550	0	0/1	100
1750	0	0/1	100
2000	0	0/1	100

El extracto fue solubilizado en agua y administrado en las dosis indicadas por vía oral (0.1 mL/10 g de peso del ratón). DL<sub>50</sub>>2000 mg/kg.

Con respecto al ensayo de toxicidad crónica, los ratones administrados con el extracto no mostraron variación en su peso, incoordinación motora, piloerección o dilatación de pupilas; sin embargo, en las 4 semanas que duró el estudio, los datos bioquímicos demostraron que la dosis de 500 mg/kg del extracto incrementó los valores de las enzimas hepáticas ALT y AST a valores promedio de 159.5 y 182.2 UI/L respectivamente. Estos resultados son indicio de toxicidad hepática y fueron comparados con los del grupo control (84.3 UI/L para ALT y 42.2 UI/L para AST), que fueron similares con los valores de los demás grupos experimentales, incluso con el que recibió la dosis de 100 mg/kg del extracto vegetal. El extracto

vegetal, D-manito y hexacetato de D-manitol no modificaron la concentración de colesterol en los ratones que recibieron dieta normal. Los resultados de estos estudios se resumen en el cuadro 4.

#### **Cuadro 4**

Análisis de la concentración de parámetros bioquímicos.

<b>N°</b>	<b>Grupo experimental</b>	<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	<b>ALT (UI/L)</b>	<b>AST (UI/L)</b>
1	Control	125.1 ± 2.1	84.3 ± 1.3	42.2 ± 0.5
2	Extracto hidroalcohólico (100 mg/kg)	129.6 ± 1.2	92.6 ± 0.6	46.3 ± 0.8
3	Extracto hidroalcohólico (500 mg/kg)	120.2 ± 3.3	159.5 ± 4.8*	182.2 ± 2.6*
4	Hexacetato de D-manitol (10 mg/kg)	130.1 ± 3.3	84.7 ± 0.5	53.3 ± 0.8
5	D-manitol (10 mg/kg)	127.1 ± 3.7	91.9 ± 0.8	58.5 ± 0.4

Los datos se encuentran reportados como la media ± el error estándar, considerando una n=6 en cada grupo experimental. \*Diferencia estadística significativa de  $p > 0.05$  entre los grupos evaluados con la prueba de toxicidad. Análisis de varianza de una vía y la prueba post-hoc de Tukey.

#### **7.4 Inducción de la hipercolesterolemia**

Después de cuatro semanas con libre acceso a la dieta hipercolesterolémica, los ratones mostraron un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en la concentración plasmática de colesterol (211.4 mg/dL) con respecto al grupo control (133.6 mg/dL).

## 7.5 Análisis bioquímicos

Los tratamientos con ezetimiba (10 mg/kg), utilizado como control positivo, extracto hidroalcohólico (100 y 500 mg/kg) y D-manitol demostraron ser eficaces para disminuir significativamente la concentración plasmática de colesterol total en comparación con el grupo de hipercolesterolemia, quien mostró valores de 223 mg/dL de colesterol. El hexacetato de D-manitol disminuyó la concentración de colesterol (198 mg/dL en promedio); sin embargo, este efecto no fue significativo en comparación con el grupo con hipercolesterolemia. Con respecto a la concentración plasmática de colesterol HDL, la dieta hipercolesterolémica produjo un descenso significativo de esta fracción del colesterol, obteniéndose un promedio de 97 mg/dL, que fue comparable con el grupo que recibió el hexacetato de D-manitol, quien tuvo valores promedio de 98 mg/dL. Los demás tratamientos tuvieron un efecto significativo para incrementar la concentración plasmática de colesterol HDL, sus valores son comparables con el grupo control. La fracción de colesterol no-HDL se vio incrementada de forma significativa en el grupo experimental con hipercolesterolemia en comparación con el grupo control. Los tratamientos con el extracto vegetal, ezetimiba y D-manitol disminuyeron la concentración de la fracción no-HDL en animales con hipercolesterolemia, de hecho, el tratamiento con el extracto vegetal mostró valores de 17 mg/dL, mientras que, el grupo control tuvo valores de 21 mg/dL. Los resultados se encuentran en el cuadro 5.

## Cuadro 5

Concentración de colesterol total, HDL y No-HDL

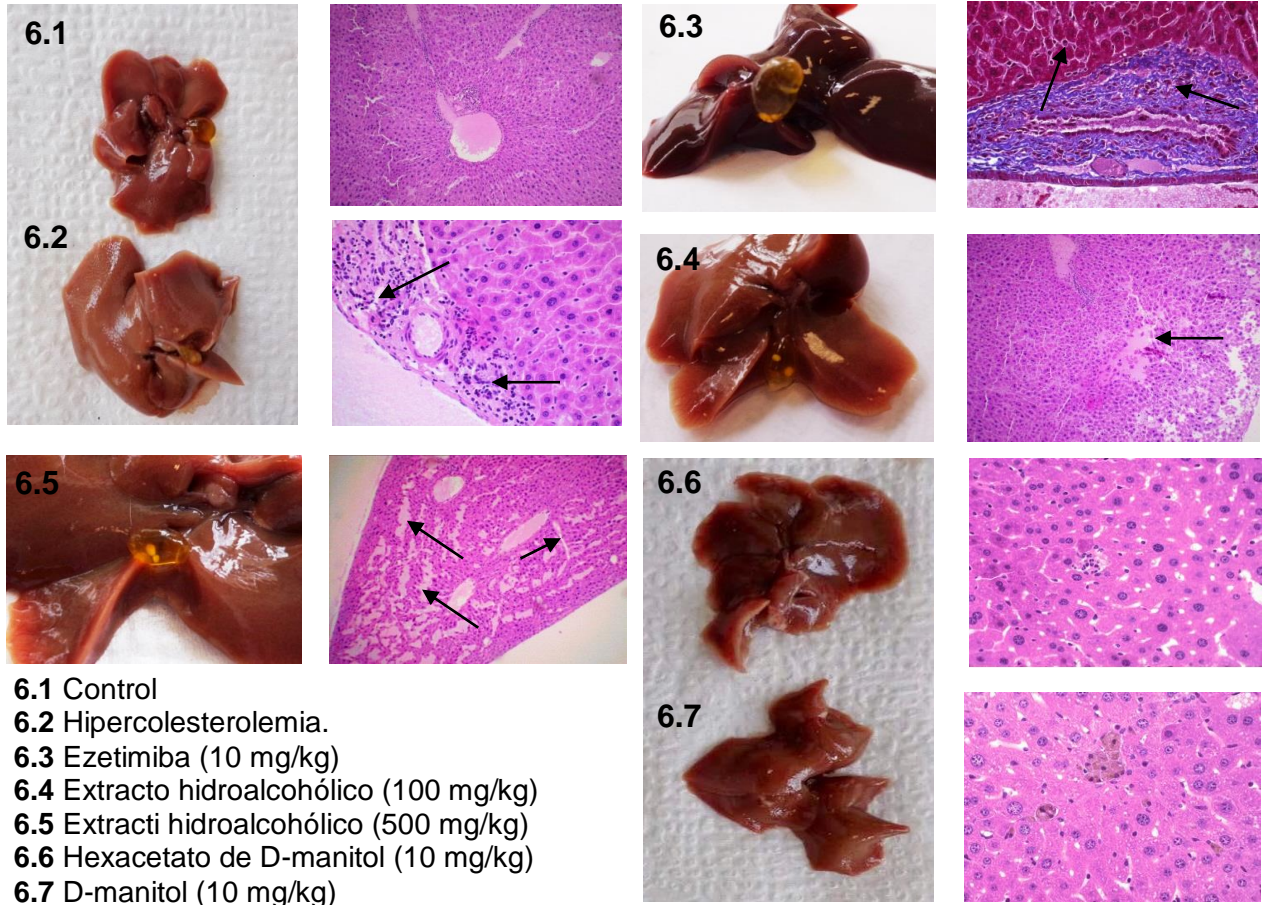
N°	Grupo experimental	Concentración de colesterol (mg/dL)		
		Total	HDL	No-HDL
1	Control	148.3 ± 4.4	126.5 ± 4.8	21.8 ± 0.7*
2	Hipercolesterolemia	223.5 ± 2.6	97.5 ± 5.6	132.8 ± 4.8
3	Ezetimiba (10 mg/kg)	128.1 ± 1.8*	119.8 ± 2.8*	10.5 ± 0.7*
4	Extracto hidroalcohólico (100 mg/kg)	139.7 ± 2.8*	120.9 ± 3.7*	17.1 ± 0.6*
5	Extracto hidroalcohólico (500 mg/kg)	129.6 ± 2.9*	112.5 ± 3.1	17.2 ± 0.9*
6	Hexaacetato de D-manitol(10 mg/kg)	198.1 ± 4.9	98.1 ± 3.2	93.7 ± 2.2*
7	D-Mannitol (10 mg/kg)	137.6 ± 3.3*	117.9 ± 2.7*	19.1 ± 1.5*

Los datos se encuentran reportados como la media ± el error estándar, considerando una n=6 en cada grupo experimental. \*Diferencia estadística significativa de  $p > 0.05$  entre los grupos tratados comparados con el grupo hipercolesterolémico. ANDEVA de una vía y la prueba post-hoc de Tukey.

### 7.6 Histopatología

Los estudios histopatológicos del hígado fueron comparados entre los diferentes grupos experimentales del estudio (figura 6). El grupo control no presentó cambios histopatológicos, se observó un poco de infiltrado inflamatorio, no obstante, esta condición no es indicio de alteración tisular (figura 6.1). En el corte de tejido hepático del grupo con hipercolesterolemia, las flechas negras indican abundante

infiltrado inflamatorio y congestión hepatocelular moderada difusa, también se observó inflamación periportal y daño al endotelio de los vasos sinusoides ocasionado por la acumulación de fibrina (figura 6.2). En esta misma imagen se pueden apreciar líneas blancas que indican la acumulación de grasa en el hígado. El tejido hepático del grupo experimental tratado con ezetimiba a dosis de 10 mg/kg, mostró ciertos acúmulos de grasa, que se presentan como líneas blancas, ambas flechas de la figura están señalando importantes daños en los hepatocitos: fibrosis periportal, congestión hepática difusa y colestasis moderada (figura 6.3). El tratamiento con el extracto hidroalcohólico de la planta a dosis de 100 mg/kg no produjo cambios histopatológicos aparentes, la morfología de los hepatocitos es similar a la que se presentó en el grupo control (figura 6.4), pero en la dosis de 500 mg/kg del extracto hubo cambios histológicos significativos, que son indicios de toxicidad hepática; también se observa una alteración en la morfología de los hepatocitos, las flechas negras indican bandas de fibrosis periportal, se reportó colestasis moderada y congestión hepática difusa, esta dosis del extracto fue la misma que reportó un incremento en la concentración de las enzimas ALT y AST (figura 6.5). Los metabolitos no produjeron daño en los tejidos hepáticos, los resultados son comparable con el grupo control (D-manitol, figura 6.6 y hexacetato de D-manitol, figura 6.7).



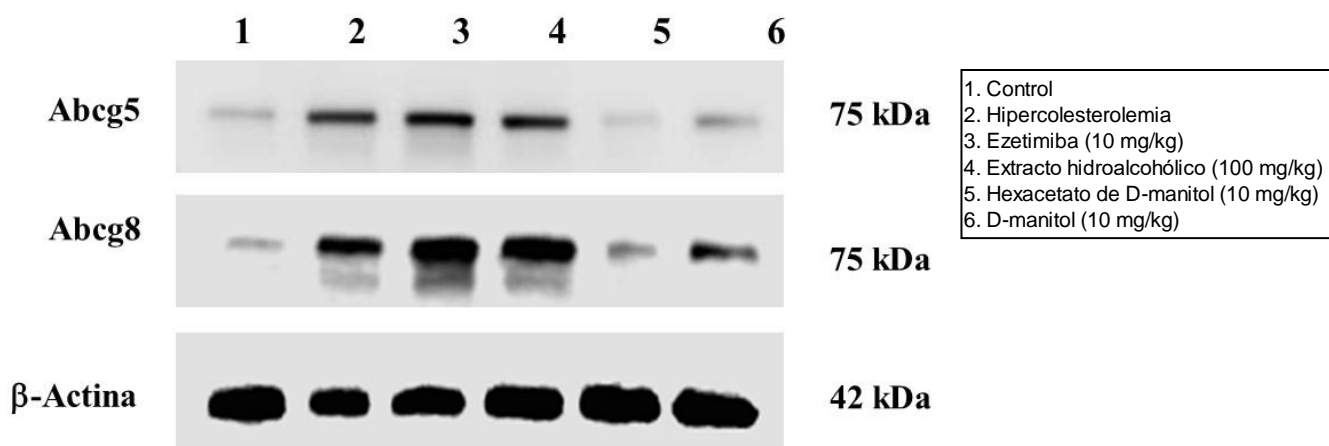
Se utilizó la técnica de hematoxilina-eosina y las imágenes se presentan en aumentos de 10x y 40x para la observación detallada de las lesiones.

**Figura 6.** Análisis histopatológicos en el hígado de los ratones.

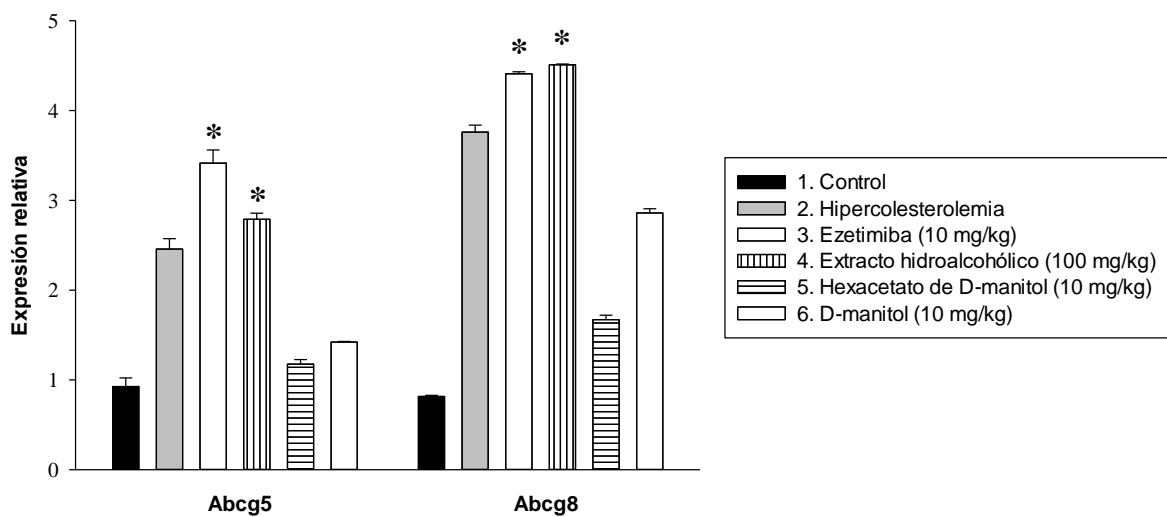


## 7.7 Transportadores Abcg5 y Abcg8

En los estudios moleculares se omitió el análisis del extracto con la dosis de 500 mg/kg debido a los signos de toxicidad bioquímica e histopatológica encontradas. Los resultados de las proteínas intestinales Abcg5/8 por Western Blot, demostraron que el grupo que recibió la dieta hipercolesterolémica (2) incrementó de forma significativa la expresión de ambas proteínas frente al grupo control (1). El extracto hidroalcohólico (4) y ezetimiba (3) incrementaron la expresión intestinal de Abcg5 y Abcg8. El incremento observado en estos tratamientos fue mayor al del grupo con hipercolesterolemia. Los metabolitos (5 y 6) no produjeron cambios en la expresión de las proteínas, los valores normalizados encontrados son similares en comparación con el grupo control. En las figuras 7a y 7b se encuentran resumidos estos resultados.



**Figura 7a.** Resultados del análisis de Western Blot de los transportadores Abcg5 y Abcg8.



\*Diferencia estadística significativa  $p < 0.05$  entre los grupos experimentales. ANDEVA de 1 vía con la prueba adicional de Student-Newman-Keuls.

**Figura 7b.** Expresión relativa de los transportadores Abcg5 y Abcg8

## 8. Discusión

Se ha documentado que *Eryngium carlinae* F. Delaroché, conocida como “hierba del sapo”, es una planta utilizada en muchas regiones de México para disminuir el colesterol en la sangre. Una de las mayores preocupaciones al utilizar plantas medicinales es que muchas veces se desconocen sus riesgos tóxicos. Nuestros resultados indican que el extracto hidroalcohólico de *Eryngium carlinae* no es tóxico en un tratamiento agudo ( $DL_{50} > 2000$  mg/kg), sin embargo, a una dosis crónica de 500 mg/kg produjo necrosis en los hepatocitos. Debido al efecto tóxico, evaluamos una dosis menor del extracto (100 mg/kg) y ya no reportamos daños en los hepatocitos.

Los datos de toxicidad que encontramos con la dosis de 500 mg/kg son interesantes en comparación con lo poco que se sabe sobre los usos tradicionales de la hierba del sapo. En algunas regiones de México, las personas emplean el extracto hidroalcohólico de *Eryngium carlinae*, pero la manera de ingerirlo es diferente al procedimiento que seguimos en nuestro estudio y los consumidores no han reportado signos de toxicidad después del consumo del extracto. La manera de ingerirlo es que las personas adicionan unas cuantas gotas del extracto en un vaso de agua y lo ingieren como agua de tiempo. Dependiendo de cada región donde la planta se consume, puede haber una variación con respecto a la cantidad del extracto que se adiciona. En nuestro estudio administramos una dosis de 500 mg/kg del extracto en los ratones, esta dosis en seres humanos representaría una gran cantidad de producto natural y un factor para desarrollar toxicidad. La dosis antes mencionada incrementó significativamente la

concentración de dos enzimas, que son importantes para evaluar toxicidad hepática: aspartato amino transferasa (AST) y la alanina transaminasa (ALT). De acuerdo con datos reportados por los Laboratorios Charles-River, la concentración promedio de AST y ALT en ratones CD1 sanos es de 139 y 95 UI/L respectivamente (Charles-River Laboratories, 1986). En nuestro estudio demostramos que la dosis de 500 mg/kg del extracto vegetal incrementó la concentración de AST y ALT a 159 y 182 UI/L respectivamente, lo cual fue un indicio de toxicidad. En los análisis histopatológicos del hígado, demostramos que la dosis de 500 mg/kg del extracto alteró la morfología de los hepatocitos, en muchos casos se observó necrosis. Debido a que ALT y AST son enzimas que se encuentran dentro de los hepatocitos, la destrucción de los mismos produce una liberación excesiva de estas enzimas al torrente sanguíneo, incrementando su concentración (García-Martín y Zurita-Molina, 2010). Las enzimas ALT y AST tienen la función de transferir grupos amino, que se utilizan para diferentes rutas metabólicas, la citólisis produce su liberación y el desarrollo de toxicidad (Moreira y Garrido, 2015).

Asociado con los efectos hipolipemiantes, ambas dosis del extracto disminuyeron la concentración de colesterol total en los ratones. La dosis más estudiada fue la de 100 mg/kg que no causó toxicidad hepática y disminuyó el colesterol no-HDL e incrementó el HDL. El descenso del colesterol no-HDL (VLDL y LDL) es un efecto importante para prevenir los riesgos cardiovasculares causados por aterosclerosis, pues en esta enfermedad se incrementa el colesterol LDL y disminuye el HDL (Cortes et al., 2014). El colesterol total que ingresa a nuestro organismo se

absorbe en el intestino delgado y lo reconocen las apolipoproteínas de los quilomicrones, quienes circulan por la vena porta para llegar al hígado (Dalla-Riva et al., 2010). En este órgano se lleva a cabo el metabolismo de lipoproteínas, partiendo desde las de menor densidad hasta las de alta densidad (Cole et al., 2012). La lipoproteína LDL transporta el colesterol hacia los tejidos periféricos, en donde se encuentran células que tienen los ligandos específicos del receptor de LDL, para capturar y almacenar el colesterol (Khosravi et al., 2018). Cuando se incrementa la concentración de esta lipoproteína existe un riesgo de acumulación de colesterol en los tejidos periféricos, pudiendo desarrollar ateromas (Chapman et al., 1998). Por el contrario, la lipoproteína HDL lleva a cabo el transporte reverso del colesterol, desde la periferia hasta el hígado para su aprovechamiento (Egom, 2015). El incremento de los valores de HDL puede disminuir el desarrollo de hipercolesterolemia y aterosclerosis (Parhofer, 2015).

En un reciente estudio se demostró que hámsteres tratados con germinados de frijol durante 28 días, disminuyeron significativamente la concentración del colesterol plasmático (entre 21 y 24% con respecto al grupo hipercolesterolémico) (Lopes et al., 2018); el tiempo de tratamiento de este estudio fue el mismo que nosotros utilizamos con la hierba del sapo, sólo que nuestros resultados mostraron una disminución del colesterol entre 58 y 62% en animales con hipercolesterolemia. Se ha reportado que las ratas y los hámsteres son los mejores modelos para estudiar la hipercolesterolemia (Guo et al., 2018); sin embargo, los ratones comparten con los seres humanos muchas similitudes con las vías reguladoras genéticas del metabolismo de lípidos, es por ello que también

se usan para estudiar la hipercolesterolemia, ofreciendo ventajas en su manejo. El modelo animal ideal debe imitar al sujeto humano metabólicamente y fisiológicamente y dada la compleja naturaleza de la hipercolesterolemia, todos los modelos presentarán desventajas (Russell y Proctor, 2006). En otro estudio experimental se evaluó el extracto etanólico de *Auricularia auricula* en ratones CD1 hipercolesterolémicos, los cuales redujeron el colesterol total en un 55% (Chen et al., 2011), resultados que pueden compararse con la actividad hipocolesterolémica que obtuvimos del 58%.

El D-manitol fue el metabolito más abundante en nuestro estudio, obtuvimos 650 mg a partir de 4 g del extracto vegetal. Durante la separación cromatográfica, las otras fracciones del extracto no alcanzaron un peso de 2 mg, por lo que descartamos su evaluación en el modelo de hipercolesterolemia. El derivado acetilado del D-manitol sí fue evaluado en nuestro estudio. El manitol tiene importantes usos aprobados por la Organización para los Alimentos y Medicamentos: es utilizado para disminuir la presión intracraneal, intraocular y para promover la diuresis ante falla renal, o para la excreción de sustancias tóxicas (Tenny y Thorell, 2018). No tiene reportes sobre su efecto para disminuir la concentración plasmática de colesterol y sobre su posible mecanismo de acción, por lo que nuestros hallazgos son importantes. Los resultados sobre la expresión de las proteínas intestinales fueron evidentes en el tratamiento con el extracto vegetal, a diferencia del efecto del D-manitol, metabolito que podría estar actuando por otra vía para la actividad hipocolesterolémica. En condiciones fisiológicas normales, el colesterol de la dieta es emulsificado en micelas mixtas o vesículas

compuestas por sales biliares y fosfolípidos (Lichtenberg, 1990); este lípido se transporta a través del flujo biliar, que recorre el hígado, la vesícula biliar y el intestino, los transportes que se efectúan son de tipo paracelular y transcelular y se ven favorecidos por la presión osmótica (Schwartz, 1995); el D-manitol es un diurético osmótico que se transporta por la ruta paracelular, por lo que que nuestro estudio pudo favorecer la presión osmótica y el flujo biliar, facilitando el transporte intestinal del colesterol y evitando su acumulación. El D-manitol no tuvo un efecto importante sobre las proteínas Abcg5/8 en el ratón, comparado con el efecto del extracto vegetal, quien sí pudo estar actuando a través del incremento en la expresión de dichas proteínas. Los efectos en la expresión de los transportadores Abcg5/8 fueron corroborados por la técnica de Western Blot, considerado un método semi-cuantitativo en la biología molecular, no obstante, constituyen la premisa para realizar otro tipo de estudios en donde se encuentre el nivel al que la proteína se está inhibiendo, por ejemplo, cuantificando su ARN mensajero. Los resultados de este trabajo mostraron un efecto sobre la disminución de la hipercolesterolemia en un 38%. Considerando que las dietas hipercolesterolémicas llevan su tránsito hacia el intestino delgado, la absorción del colesterol fue nuestro punto de partida para investigar el posible mecanismo de acción del extracto y para esto usamos como control positivo a la ezetimiba, que es un inhibidor de la absorción intestinal de colesterol. El blanco farmacológico de ezetimiba es la proteína de Niemann-Pick C1L1, que transporta al colesterol (Miura y Saku, 2008). La estructura química de ezetimiba no está relacionada con la estructura del D-manitol y considerando que agentes hipocolesterolémicos

como las estatinas tienen una similitud íntima en su estructura química y todas ellas van por el mismo mecanismo de acción, el D-manitol difícilmente tendría como posible blanco la proteína NPC1L1 como ezetimiba, por lo que decidimos estudiar los principales transportadores del colesterol: ABCG5 y ABCG8. Se ha propuesto que las proteínas ABCG5 y ABCG8 son los transportadores que llevan a cabo el eflujo de colesterol a nivel del intestino delgado y que un incremento en la concentración de estas proteínas podría reducir la absorción intestinal de colesterol, favoreciendo los efectos hipolipemiantes (Yu et al., 2002). Algunos autores han propuesto que la expresión de los ABCG5/8 asociada con efectos hipolipemiantes es controversial (Wang et al., 2015). Se han reportado incrementos en la expresión de dichas proteínas después de la ingesta de dietas ricas en colesterol, y también se ha demostrado que no existe diferencia significativa en la expresión de estas proteínas cuando animales de experimentación son sometidos al consumo de dietas hipercolesterolémicas; sin embargo, en nuestro caso demostramos que cuando se administra una dieta rica en colesterol sí existe un incremento significativo de la expresión de ABCG5/8 en el intestino delgado, comparado con un grupo control, que se alimenta con una dieta estandarizada. Aunado a esto, el tratamiento con ezetimiba (10 mg/kg) y con el extracto vegetal a dosis de 100 mg/kg incrementaron la expresión de los transportadores de colesterol y redujeron significativamente la concentración de colesterol plasmático. Los transportadores ABCG5 y ABCG8 se expresan tanto en hígado como en intestino y a partir de estudios experimentales, se ha demostrado que estas proteínas protegen de la acumulación de esteroides y en el caso



específico del intestino delgado, propician el eflujo de colesterol extrahepático (Repa et al., 2002). Nuestros resultados indicaron que el extracto vegetal a dosis de 100 mg/kg incrementó significativamente la expresión de las proteínas ABCG5/8 y esto pudo ocasionar un incremento en el eflujo de colesterol hacia el espacio extracelular, evitando su acumulación en los enterocitos y posteriormente en la circulación portal; no obstante, los metabolitos no mostraron el mismo efecto que el extracto hidroalcohólico, aunque sí generaron efectos hipolipemiantes, su mecanismo de acción parece ser independiente de la expresión de ABCG5 y ABCG8. Nuestro estudio experimental deja un antecedente muy importante en la investigación de productos naturales con efectos hipocolesterolemiantes y su posible mecanismo de acción.

## 9. Conclusiones

El extracto hidroalcohólico de *Eryngium carlinae* F. Delaroche administrado a dosis de 100 mg/kg no produce efectos tóxicos en el hígado de los ratones; sin embargo, la dosis de 500 mg/kg sí produce toxicidad hepática, incrementado la concentración de las enzimas AST y ALT, así como necrosis en los tejidos hepáticos.

El extracto hidroalcohólico de *Eryngium carlinae* F. Delaroche disminuyó la concentración de colesterol total y colesterol no-HDL en ratones con hipercolesterolemia.

Los efectos hipocolesterolemicos del extracto vegetal parecen estar asociados con el incremento en la expresión de las proteínas intestinales Abcg5 y Abcg8.

El D-manitol produce efectos hipocolesterolemicos a través de un mecanismo de acción que parece ser independiente de la expresión de Abcg5 y Abcg8.

## 10. Referencias bibliográficas

1. Abdoli N, Heidari R, Azarmi Y, Eghbal MA. Mechanisms of the statins cytotoxicity in freshly isolated rat hepatocytes. *J Biochem Mol Toxicol* 2013; 27(6): 287-94.
2. Agabiti Rosei E, Salvetti M. Management of Hypercholesterolemia, Appropriateness of Therapeutic Approaches and New Drugs in Patients with High Cardiovascular Risk. *High Blood Press Cardiovasc Prev* 2016; 23(3): 217-230.
3. Anderson RG. Joe Goldstein and Mike Brown: from cholesterol homeostasis to new paradigms in membrane biology. *Trends Cell Biol* 2003; 13(10): 534-549.
4. Aronow WS. Treatment of Hypercholesterolemia in 2015. *Am J Ther* 2017; 24(2): e121-e129.
5. Badimon L, Padró T, Cubedo J. Protein changes in non-LDL-lipoproteins in familial hypercholesterolemia: implications in cardiovascular disease manifestation and outcome. *Curr Opin Lipidol* 2017; 28(5):427-433.
6. Bello GMA. Catálogo de Plantas Medicinales de la Comunidad Indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro. Michoacán, México: 2006. (Libro Técnico no. 4. Campo Experimental Uruapan. CIRPAC. INIFAP).
7. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Section 26.4 Important Derivatives of Cholesterol Include Bile Salts and Steroid Hormones. *Biochemistry*, 5th edition. New York: W H Freeman; 2002.

8. Carreón-Sánchez R, Marroquín-Segura R, Mora-Guevara JLA, Valadez-Sánchez CS, Flores-Cabrera Y, Flores-Pimentel M, Hernández-Abad VJ. Study of ethanolic extract of *Eryngium heterophyllum* (herb frog). To make sure its hypoglycemic and anti-inflammatory activity. *Rev Mex Cienc Farm* 2013; 44(2): 41-45.
9. Carroll MD, Lacher DA, Sorlie PD, Cleeman JI, Gordon DJ, Wolz M, Grundy SM, Johnson CL. Trends in serum lipids and lipoproteins of adults, 1960-2002. *JAMA* 2005; 294(14): 1773-1781.
10. Carvajal-Carvajal C. LDL oxidada y la aterosclerosis. *Med Leg Costa Rica* 2015; 32(1): 1-9.
11. Castro-Torres IG, De la O-Arciniega M, Gallegos-Estudillo J, Martínez-Vázquez M, Naranjo-Rodríguez EB, Domínguez-Ortíz MA, Cruz-Sánchez JS. Natural products in the research of cholesterol gallstones. *TANG Humanitas Traditional Medicine* 2013; 3(3): 21.1-21.5.
12. Castro-Torres IG, López-Velázquez JA, Sánchez-Valle V, Martínez-Vázquez M, Uribe M, Méndez-Sánchez N. Prevention of cholesterol gallstones by two extracts of *Raphanus sativus* L. var *niger* in mice. *J Hepatol* 2013; 58: S281.
13. Chang Y, Robidoux J. Dyslipidemia management update. *Curr Opin Pharmacol* 2017; 33: 47-55.
14. Chapman MJ, Guérin M, Bruckert E. Atherogenic, dense low-density lipoproteins. Pathophysiology and new therapeutic approaches. *Eur Heart J* 1998; 19 Suppl A: A24-30.

15. Chen G, Luo YC, Ji BP, Li B, Su W, Xiao ZL, Zhang GZ. Hypocholesterolemic effects of *Auricularia auricula* ethanol extract in ICR mice fed a cholesterol-enriched diet. *J Food Sci Technol* 2011; 48(6): 692-698.
16. Chen HW, Heiniger HJ, Kandutsch AA. Relationship between sterol synthesis and DNA synthesis in phytohemagglutinin-stimulated mouse lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72(5): 1950-1954.
17. Chiang JY. Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J Hepatol* 2004; 40(3): 539-551.
18. Choi HY, Hafiane A, Schwertani A, Genest J. High-Density Lipoproteins: Biology, Epidemiology, and Clinical Management. *Can J Cardiol* 2017; 33(3): 325-333.
19. Cicero AFG, Bove M, Borghi C. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical efficacy of non-statin treatments for hypercholesterolemia. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2018; 14(1): 9-15.
20. Cole LK, Vance JE, Vance DE. Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1821(5): 754-761.
21. Cortes VA, Busso D, Maiz A, Arteaga A, Nervi F, Rigotti A. Physiological and pathological implications of cholesterol. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2014; 19: 416-428.
22. Dalla-Riva J, Garonna E, Elliott J, Botham KM, Wheeler-Jones CP. Endothelial cells as targets for chylomicron remnants. *Atheroscler Suppl* 2010; 11(1): 31-37.

23. Díaz-Zagoya JC, Asenjo-Barrón JC, Cárdenas-Vázquez R, Martínez F, Juárez-Oropeza MA. Comparative toxicity of high doses of statins currently used by clinicians, in CD-1 male mice fed with a hypercholesterolemic diet. *Life Sci* 1999; 65(9): 947-956.
24. du Souich P, Roederer G, Dufour R. Myotoxicity of statins: Mechanism of action. *Pharmacol Ther* 2017; 175: 1-16.
25. Egom EE. HDL-C/HDL-P Ratio: A Measure of reverse cholesterol transport rather than HDL functionality. *J Am Coll Cardiol*. 2015; 65(23): 2576.
26. Erdem SA, Nabavi SF, Orhan IE, Daglia M, Izadi M, Nabavi SM. Blessings in disguise: a review of phytochemical composition and antimicrobial activity of plants belonging to the genus *Eryngium*. *Daru* 2015; 23: 53.
27. Errico TL, Chen X, Martin-Campos JM, Julve J, Escolá-Gil JC, Blanco-Vaca F. Mecanismos básicos: estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasm. *Clin Invest Arterioscl* 2013; 25(2): 98-103.
28. Farnier M, Civeira F, Descamps O; FH expert working group. How to implement clinical guidelines to optimise familial hypercholesterolaemia diagnosis and treatment. *Atheroscler Suppl* 2017; 26: 25-35.
29. Fielding CJ, Fielding PE. Membrane cholesterol and the regulation of signal transduction. *Biochem Soc Trans* 2004; 32(Pt 1): 65-69.
30. García-Martín M, Zurita-Molina A. Transaminasas: valoración y significación clínica. *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHP-AEP* 2010; 267-275

31. Goff DC Jr, Lloyd-Jones DM, D'Agostino RB Sr. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2014; 129(suppl 2): S49-S73.
32. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 431-438.
33. Goluszko P, Nowicki B. Membrane cholesterol: a crucial molecule affecting interactions of microbial pathogens with mammalian cells. *Infect Immun* 2005; 73(12): 7791-7796.
34. Gouni-Berthold I, Berthold HK. Familial hypercholesterolemia: etiology, diagnosis and new treatment options. *Curr Pharm Des* 2014; 20(40): 6220-6229.
35. Gui-Dong Z, Okamura WH. Synthesis of Vitamin D (Calciferol). *Chem. Rev* 1995; 95(6): 1877-1952.
36. Guo CF, Yuan YH, Yue TL, Li JY. Hamsters are a better model system than rats for evaluating the hypocholesterolemic efficacy of potential probiotic strains. *Mol Nutr Food Res* 2018: e1800170.
37. Handelsman Y, Shapiro MD. Triglycerides, atherosclerosis, and cardiovascular outcome studies: focus on omega-3 fatty acids. *Endocr Pract* 2017; 23(1): 100-112.
38. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002; 109(9): 1125-1131.

39. Huang Z, London E. Cholesterol lipids and cholesterol-containing lipid rafts in bacteria. *Chem Phys Lipids* 2016; 199: 11-16.
40. Jesch ED, Carr TP. Food Ingredients That Inhibit Cholesterol Absorption. *Prev Nutr Food Sci* 2017; 22(2): 67-80.
41. Johansen CT, Kathiresan S, Hegele RA. Genetic determinants of plasma triglycerides. *J Lipid Res* 2011; 52: 189-206.
42. Johnson TA, Pfeffer SR. Ezetimibe-sensitive cholesterol uptake by NPC1L1 protein does not require endocytosis. *Mol Biol Cell* 2016; 27: 1845-52.
43. Juřica J, Dovrtělová G, Nosková K, Zendulka O. Bile acids, nuclear receptors and cytochrome P450. *Physiol Res* 2016; 65(S4): S427-S440.
44. Khosravi M, Hosseini-Fard R, Najafi M. Circulating low density lipoprotein (LDL). *Horm Mol Biol Clin Investig* 2018; 35(2): 024.
45. Kobayashi M, Gouda K, Chisaki I, Asada K, Ogura J, Takahashi N, et al. Regulation of multidrug resistance protein 2 (MRP2, ABCC2) expression by statins: involvement of SREBP-mediated gene regulation. *Int J Pharm* 2013; 452(1-2): 36-41.
46. Lichtenberg D, Ragimova S, Bor A, Almog S, Vinkler C, Peled Y, Halpern Z. Stability of mixed micellar systems made by solubilizing phosphatidylcholinecholesterol vesicles by bile salts. *Hepatology* 1990; 12(3): 149S-153S.
47. Lioudaki E, Ganotakis ES, Mikhailidis DP. Lipid lowering drugs and gallstones: a therapeutic option? *Curr Pharm Des* 2011; 17: 3622-3631.



48. Lipka LJ. Ezetimibe: a first-in-class, novel cholesterol absorption inhibitor. *Cardiovasc Drug Rev* 2003; 21: 293-312.
49. Lopes LAR, Martins MDCCE, Farias LM, Brito AKDS, Lima GM, Carvalho VBL, Pereira CFC, Conde Júnior AM, saldanha t, arêas jag, silva kjde, frota kmg. cholesterol-lowering and liver-protective effects of cooked and germinated mung beans (*Vigna radiata* L.). *Nutrients* 2018; 10(7): E821.
50. Martinot E, Sèdes L, Baptissart M, Lobaccaro JM, Caira F, Beaudoin C, Volle DH. Bile acids and their receptors. *Mol Aspects Med* 2017; 56: 2-9.
51. Mason RS, Sequeira VB, Gordon-Thomson C. Vitamin D: the light side of sunshine. *Eur J Clin Nutr* 2011; 65(9): 986-993.
52. Mitsche MA, McDonald JG, Hobbs HH, Cohen JC. Flux analysis of cholesterol biosynthesis in vivo reveals multiple tissue and cell-type specific pathways. *Elife* 2015; 4: e07999.
53. Moreira VF, Garrido E. Pruebas de función hepática: B, AST, ALT, FA y GGT. *Rev Esp Enf Dig* 2015.
54. Navarrete A, Niño D, Reyes B, Sixtos C, Aguirre E, Estrada E. On the hypocholesterolemic effect of *Eryngium heterophyllum*. *Fitoterapia* 1990; 61(2): 182-184.
55. Noriega-Cisneros R, Ortiz-Ávila O, Esquivel-Gutiérrez E, Clemente-Guerrero M, Manzo-Avalos S, Salgado-Garciglia R, Cortés-Rojo C, Boldogh I, Saavedra-Molina A. Hypolipidemic activity of *Eryngium carlinae* on streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem Res Int.* 2012; 2012: 603501.

56. OECD, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity- Acute Toxic Class Method, OECD, Paris, France, 2011.
57. Olguin-Contreras G, Meléndez-Mier G, Zúñiga A, Pasquetti-Ceccatelli A. Antioxidantes y aterosclerosis. *Rev Endocrinol Nutr* 2004; 12(4): 199-206.
58. Parhofer KG. Increasing HDL-cholesterol and prevention of atherosclerosis: A critical perspective. *Atheroscler Suppl.* 2015; 18: 109-111.
59. Peng J, Luo F, Ruan G, Peng R, Li X. Hypertriglyceridemia and atherosclerosis. *Lipids Health Dis* 2017; 16(1): 1-12.
60. Pérez-Ramírez IF, Enciso-Moreno JA, Guevara-González RG, Gallegos-Corona MA, Loarca-Piña G, Reynoso-Camacho R. Modulation of renal dysfunction by *Smilax cordifolia* and *Eryngium carlinae*, and their effect on kidney proteome in obese rats. *J Funct Foods* 2016; 20: 545-555.
61. Portincasa P, Ciaula AD, Bonfrate L, Wang DQ. Therapy of gallstone disease: What it was, what it is, what it will be. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2012; 3: 7-20.
62. Portincasa P, Wang DQ. Intestinal absorption, hepatic synthesis, and biliary secretion of cholesterol: where are we for cholesterol gallstone formation? *Hepatology* 2012; 55: 1313-1316.
63. Ramkumar S, Raghunath A, Raghunath S. Statin therapy: review of safety and potential side effects. *Acta Cardiol Sin* 2016; 32(6): 631-639.
64. Rebholz C, Krawczyk M, Lammert F. Genetics of gallstone disease. *Eur J Clin Invest* 2018; 48(7): e12935.

65. Reddy RL, Srinivasan K. Fenugreek seeds reduce atherogenic diet-induced cholesterol gallstone formation in experimental mice. *Can J Physiol Pharmacol* 2009; 87: 933-943.
66. Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, Richardson JA, Hobbs H, Mangelsdorf DJ. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 2002; 277(21): 18793-18800.
67. Russell JC, Proctor SD. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol* 2006; 15(6): 318-330.
68. Scaldaferrri F, Pizzoferrato M, Ponziani FR, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Use and indications of cholestyramine and bile acid sequestrants. *Intern Emerg Med* 2013; 8(3): 205-210.
69. Schwartz RM, Furne JK, Levitt MD. Paracellular intestinal transport of six-carbon sugars is negligible in the rat. *Gastroenterology* 1995; 109(4): 1206-1213.
70. Shubha MC, Reddy RR, Srinivasan K. Antilithogenic influence of dietary capsaicin and curcumin during experimental induction of cholesterol gallstone in mice. *Appl Physiol Nutr Metab* 2011; 36: 201-209.
71. Singh P, Paila YD, Chattopadhyay A. Differential effects of cholesterol and 7-dehydrocholesterol on the ligand binding activity of the hippocampal serotonin1A receptor: implications in SLOS. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 495-499.

72. Singh P, Saxena R, Srinivas G, Pande G, Chattopadhyay A. Cholesterol biosynthesis and homeostasis in regulation of the cell cycle. *PLoS One* 2013; 8(3): e58833.
73. Sozen E, Ozer NK. Impact of high cholesterol and endoplasmic reticulum stress on metabolic diseases: An updated mini-review. *Redox Biol* 2017; 12: 456-461.
74. Srinivasan K. Dietary spices as beneficial modulators of lipid profile in conditions of metabolic disorders and diseases. *Food Funct* 2013; 4: 503-521.
75. Tenny S, Thorell W. Mannitol. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018-2017 Dec 4.
76. Torres N, Guevara-Cruz M, Velázquez-Villegas LA, Tovar AR. Nutrition and Atherosclerosis. *Arch Med Res* 2015; 46(5): 408-426.
77. van der Wulp MY, Verkade HJ, Groen AK. Regulation of cholesterol homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* 2013; 368(1-2): 1-16.
78. Vance DE, Van den Bosch H. Cholesterol in the year 2000. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1529(1-3): 1-8.
79. Varghese MJ. Familial hypercholesterolemia: A review. *Ann Pediatr Cardiol* 2014; 7(2): 107-117.
80. Vidyashankar S, Sambaiah K, Srinivasan K. Regression of preestablished cholesterol gallstones by dietary garlic and onion in experimental mice. *Metabolism* 2010; 59: 1402-1412.

81. Wald N, Law M. Statins for people at low risk of cardiovascular disease. *Lancet* 2012; 380(9856): 1818.
82. Wang J, Mitsche MA, Lütjohann D, Cohen JC, Xie XS, Hobbs HH. Relative roles of ABCG5/ABCG8 in liver and intestine. *J Lipid Res* 2015; 56(2): 319-330.
83. Wang Y, Haiqian, Huang W, Zhang H, Zhou J. Synthesis and biological evaluation of ezetimibe analogs as possible cholesterol absorption inhibitors. *Lett Drug Des Discov* 2011; 8: 500-5.
84. Yang ST, Kreuzberger AJB, Lee J, Kiessling V, Tamm LK. The role of cholesterol in membrane fusion. *Chem Phys Lipids* 2016; 199: 136-143.
85. Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest* 2002; 110(5): 671-680.
86. Zárate A, Manuel-Apolinar L, Basurto L, De la Chesnaye E, Saldívar I. Cholesterol and atherosclerosis. Historical considerations and treatment. *Arch Cardiol Mex* 2016; 86: 163-169.
87. Zárate A, Manuel-Apolinar L, Saucedo R, Hernández-Valencia M, Basurto L. Hypercholesterolemia as a risk factor for cardiovascular disease: current controversial therapeutic management. *Arch Med Res* 2016; 47(7): 491-495.
88. Zilversmit DB. Atherogenic nature of triglycerides, postprandial lipidemia, and triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Clin Chem* 1995; 41: 153-158.

89. Zuluaga-Espinosa NA, Alfaro-Velásquez JM, Balthazar-González V, Jiménez-Blanco KE, Campuzano-Maya G. Vitamin D: new paradigms. *Medicina & Laboratorio* 2011; 17(5-6): 211-246.