



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

“ESTUDIO DEL EFECTO PROTECTOR DEL BERRO (*Nasturtium officinale*)
CONTRA EL DAÑO HEPÁTICO AGUDO INDUCIDO
CON TETRACLORURO DE CARBONO EN RATONES CD1”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JOSÉ YADIR CAMPOS ORTEGA

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSÉ LUIS ALFREDO MORA GUEVARA

ASESOR DE TESIS: MTRA. YOLANDA FLORES CABRERA



FES
ZARAGOZA

CIUDAD DE MÉXICO 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

Quiero dedicar mi trabajo a diferentes personas que estuvieron a lo largo de mi de vida y me apoyaron para cumplir mi sueño de terminar la carrera fuera posible, por sostenerme cuando quería saltar del barco y ayudarme a seguir navegando.

A mi abuelo José Campos que siempre quiso que terminara una carrera y me apoyo para que no abandonara mis estudios, siempre estuvo al pendiente de mí y nunca me soltó. Lo logramos viejito, sé que estarías muy contento.

A mi abuela Esther Delgado por siempre apoyarme, darme un consejo y decirme que las cosas que tienen su momento siempre se darán y poco a poco.

A mi papá Ricardo Campos que le agradezco todo su amor y apoyo para que yo fuera un ser científico, nuestros pensamientos fueron siempre contrastantes, pero ahora veo que ese enfoque social que siempre me transmitiste fue desde tu conocimiento cómo filósofo, politólogo y sociólogo me fue de gran ayuda para aterrizar mi pensamiento y en este trabajo. Fuiste un gran ser humano y el mejor papá, gracias por todo. Siento mucho que no estés físicamente para compartir este logro, pero tu espíritu siempre estará conmigo, en toda la gente que te conoció y en cada una de las acciones que vengan en mi vida. Volveremos a coincidir en algún punto del infinito universo estoy seguro de que así será, este logro es de ambos, Te amo y como siempre decías: “nunca borregos”.

A mi mamá Verónica Ortega por todo tu amor y apoyo para que estudiara una carrera de ciencia, me preparará lo mejor que pudiera y siempre fuera una persona coherente con valores. En toda mi vida académica y cada uno de los pasos que he dado en mi vida siempre has estado, gracias a ti y a tu amor por sacar nuestra familia adelante, todo esto es gracias a ti. La mejor manera de demostrarlo es siempre concluir lo que se comienza y a esta idea siempre me aferre. Esté logro nuestro y es el primero de muchos, gracias. Té amo.

A mi hermano Carlos por siempre acompañarme, darme ánimos para concluir la carrera y la tesis.

A mis tíos Adolfo Campos, Vicky Campos, José Campos por apoyarme y animarme a seguir adelante con mis sueños.

A mis primos: Toño, Emilio, Brandon, Ximena, Melisa, Sheyla, Audrey por siempre estar unidos, por todas la risas, consejos y si yo pude ustedes también.

A mis amigos del laboratorio: Fany, Ale, Eber, Eddy, Gerardo, Italia sin ustedes no hubiera sido lo mismo, gracias por las risas, las comidas compartidas, los consejos.

A toda mi familia y amigos con las que he compartido y han aportado en mi vida de manera significativa para que este logro fuera posible, gracias.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi *alma mater* la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por formarme como profesionista, estoy muy orgulloso de ser parte de esta nuestra gran institución y con este trabajo contribuir un poco de lo mucho que la ciencia le debe a la sociedad para el progreso del conocimiento.

Al Dr. Rubén Marroquín por recibirme como su tesista en su laboratorio, siempre dispuesto compartir una taza de café, un tamal y sus conocimientos adquiridos a lo largo de una vida. Cuando más lejos me sentía lejos de la investigación me enseñó que siempre hay muchos caminos para resolver un problema y que la ciencia trata de eso, buscar evidencias que nos acerquen cada vez más a la verdad. Fue mi mentor y amigo, el concluir este proyecto es gracias a usted, estoy muy contento de haber coincidido en esta vida y compartido mi tiempo con tan grande persona e investigador.

Al Dr. Luis Mora le agradezco todo su apoyo desde un comienzo tanto en la parte teórica como experimental, a darle sentido y coherencia a los datos obtenidos. Gracias por apoyarme para retomar el proyecto dada las circunstancias y guiarme, me enseñó que el ámbito académico y lo humano no están separados, lo considero un maestro y amigo.

A la Mta. Yolanda Flores por tener paciencia y darse el tiempo para revisar este trabajo, por sus consejos y pláticas, sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible.

Al Mto. José Luis Trejo por sus comentarios en este trabajo, las pláticas en el laboratorio acompañadas de café y risas.

A la Q.F.B. Carina Iglesias por sus comentarios en este trabajo y enseñanzas, me da mucha alegría que conociéndola desde que entre a la carrera ahora sea parte de mi proyecto final, le agradezco mucho.

Al Q.F.B. Enrique Escalera gracias por sus comentarios en este trabajo y darle el sentido del porque seguir haciendo investigación en nuestro país es importante.

ÍNDICE

1. RESUMEN	8
2. INTRODUCCIÓN	9
3. MARCO TEÓRICO.....	10
3.1 El berro (<i>Nasturtium officinale</i>).....	10
3.2 Clasificación taxonómica	11
3.3 Etnobotánica del berro en México	11
3.4 Composición química.....	12
3.5 Actividad terapéutica.....	14
3.6 Hígado.....	15
3.7 Histología del hígado	16
3.8 Función del hígado.....	18
3.9 Enfermedades del hígado.....	20
3.10 Marcadores enzimáticos (AST, ALT y LDH).....	22
3.11 Toxicología	24
3.11.1 Toxicidad aguda y DL ₅₀	25
3.11.2 Método de Lorke para determinar dosis letal 50 (DL ₅₀)	25
3.7 Tetracloruro de carbono (CCl ₄).....	26
3.8 Silimarina	27
3.9 Ratones CD1.....	29
3.10 Antecedente para el diseño experimental del estudio del efecto hepatoprotector del berro con cirrosis aguda inducida con CCl ₄	30
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
5. HIPÓTESIS	32
6. OBJETIVOS	33
6.1 GENERAL.....	33
6.2 ESPECÍFICOS.....	34
7. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	35
8. MATERIAL, REACTIVOS, INSTRUMENTOS Y EQUIPO.....	36
8.1 MATERIAL	36
8.3 EQUIPO	37

8.4 INSTRUMENTOS.....	37
8.4 REACTIVOS BIOLÓGICOS.....	37
8.5 REACTIVOS Y SUSTANCIAS.....	37
9. MÉTODOS	38
9.1 Determinación de la dosis letal 50 (DL ₅₀) del CCL4 por el método de Lorke	38
9.2 Recolección y secado del berro (<i>Nasturtium officinale</i>)	39
9.3 Extracto acuoso de berro.....	40
9.4 Modelo experimental de daño hepático agudo inducido con CCl ₄ en ratones macho CD1	42
10. RESULTADOS	44
10.1 Ensayo DL ₅₀ con tetracloruro de carbono (CCl ₄) en ratones CD1.....	44
10.2 Marcadores enzimáticos analizados en suero de ratón CD1 en DL ₅₀	45
10.3 Rendimiento obtenido del extracto acuoso de berro a presión reducida	49
10.4 Resultados de los marcadores enzimáticos analizados en suero de ratón CD1 en ensayo de toxicidad aguda inducida con CCl ₄	50
10.5 Resultados del análisis estadístico del ensayo de toxicidad aguda con CCl ₄ comparado con los diferentes grupos.....	51
10.5.1 Tabla 6. Prueba de análisis de varianza ANOVA para los valores enzimáticos AST, ALT y LDH de los diferentes grupos estudiados	51
10.5.2 Tabla 7. Prueba de Tukey para la comparación de medias de la enzima AST comparados con los diferentes grupos del ensayo.....	52
10.5.3 Gráfico 4. Media enzimática de AST comparado con los diferentes grupos del ensayo	53
10.5.4 Tabla 8. Prueba de Tukey para la comparación de medias de la enzima ALT comparados con los diferentes grupos del ensayo.....	54
10.5.5 Gráfico 5. Media enzimática de ALT comparado con los diferentes grupos de ensayo	55
10.5.6 Tabla 9. Prueba de Tukey para la comparación de medias de la enzima LDH comparados con los diferentes grupos del ensayo.....	56
10.5.7 Gráfico 6. Media enzimática de LDH comparado con los diferentes grupos de ensayo.....	57
11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	58
12. CONCLUSIONES.....	64
13. PERSPECTIVAS	65
14. REFERENCIAS.....	66
ANEXO I. BASE DE DATOS DL ₅₀ CCl ₄ CON EL PROGRAMA IBM SPSS 23.....	70
ANEXO II. TABLA DE DL ₅₀ DE CCl ₄ CALCULADA POR MODELO PROBIT.....	71

ANEXO III. BASE DE DATOS DEL METODO EXPERIMENTAL EN EL PROGRAMA IBM SPSS 23.....	72
ANEXO IV. DOSIS ADMINISTRADAS DE CCl ₄	73
ANEXO V. IMÁGENES DEL MÉTODO EXPERIMENTAL	74
ANEXO VI. FUNDAMENTO DE LAS DETERMINACIONES ENZIMATICAS: AST, ALT y LDH CON EL ANALIZADOR AUTOMATIZADO PARA QUIMICA CLINICA ILAB 650.....	76

ABREVIATURAS

CCl ₄	tetracloruro de carbono
AST	aspartato aminotransferasa
ALT	alanina aminotransferasa
LDH	lactato deshidrogenasa
CD1	cepa de ratón
DL ₅₀	dosis letal 50
mg	miligramos
mL	mililitros
kg	kilogramos
µg	microgramos
g	gramos
U/L	unidades/litro
NADH	nicotianamina dinucleótida

1. RESUMEN

El berro (*Nasturtium officinale*) es una planta que se ha utilizado desde la antigüedad en la medicina tradicional como remedio herbolario para tratar empíricamente padecimientos renales, como protector cardíaco, para limpiar el organismo de toxinas, como antiinflamatorio e hipoglucemiante y como protector hepático. En años recientes se ha encontrado que tiene propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias, antibacteriales y cardioprotectoras. Por lo cual el objetivo de este trabajo es demostrar si el berro tiene capacidad protectora a nivel hepático o no.

Para ello se realizó un modelo experimental en ratones CD1 *in vivo* que se dividió en dos etapas. En la primer etapa se calculó la DL₅₀ del CCl₄ en un grupo de 15 ratones por el método de Lorke, es de 9 mL/kg. La segunda etapa se realizó el modelo experimental con 36 ratones y se dividieron en grupos de 6. El primer grupo: control positivo agua + alimento, el segundo grupo: control negativo agua + alimento + CCl₄, el tercer grupo: silimarina 100 mg/kg, el 4to, 5to y 6to grupo: se utilizó un extracto acuoso de berro a concentraciones de 8, 64 y 512 mg/kg. Todos los grupos se administraron por vía oral durante nueve días; el noveno día se les indujo daño hepático agudo con 9 mL/kg de CCl₄ y su posterior sacrificio el décimo día. Se cuantificaron los marcadores enzimáticos AST, ALT y LDH. Con estos valores se realizó el análisis de varianza ANOVA. Los resultados enzimáticos fueron: AST p=0.412, ALT, p= 0.362 y LDH p=0.054. En conclusión, el extracto acuoso de berro no tuvo efecto hepatoprotector en las concentraciones de 8, 64 y 512 mg/kg contra la administración aguda de CCl₄ a una concentración de 9 mL/kg en ratones macho CD1 proporción (1:2) con aceite de oliva por vía de administración oral.

2. INTRODUCCIÓN

La herbolaria es el uso de plantas medicinales en forma de remedio para tratar o aliviar enfermedades, esta tiene antecedentes prehispánicos en México y América Latina. El uso actual de plantas medicinales es un conocimiento empírico que se ha heredado de generación en generación.

Es una práctica que se sigue llevando a cabo con regularidad hasta nuestros días, el uso de remedios herbolarios es algo muy tradicional en la cultura mexicana. Según la NOM-248-SSA1-2011 Buenas prácticas de fabricación para establecimientos dedicados a la fabricación de remedios herbolarios define como remedio herbolario: “al preparado de plantas medicinales o sus partes, individuales o combinadas y sus derivados, presentado en forma farmacéutica, al cual se le atribuye por conocimiento popular o tradicional el alivio para algunos síntomas participantes o aislados de una enfermedad”.¹

El principal problema de los remedios herbolarios radica en que su uso es en forma empírica, no se sabe si realmente presentan un efecto terapéutico, su dosis efectiva o puedan llegar a ser tóxicos; lo cual hace que su uso cotidiano pueda ser un riesgo para la salud, diversas hierbas y preparados herbolarios han sido implicados como causa de daño hepático tanto en forma aguda como crónica. En nuestro país las muertes asociadas a enfermedades de hígado ocupan el quinto lugar en según el censo del INEGI y la Secretaria de Salud del 2022², por lo cual se requiere profundizar en su estudio por medio de modelos experimentales que puedan comprobar o descartar su efectividad.

En el presente trabajo se realizó un modelo experimental *in vivo* en ratones macho CD1, para evaluar si el berro (*Nasturtium officinale*) tiene efecto protector a nivel hepático o no, con la medición de marcadores enzimáticos AST, ALT y LDH que son específicos de inflamación hepática.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 El berro (*Nasturtium officinale*)

Esta especie es nativa de Europa, Norte de África y Asia. Ha sido introducida en numerosas regiones del mundo entre ellas Norte América y Sur América.³

Es una planta de agua exótica bien establecida en México que se cultiva a nivel comercial por sus hojas comestibles. En forma silvestre se presenta en cuerpo de agua en muchas partes del país, también en ambientes poco perturbados. Es conocida también por berro, cresón, y por algunos pueblos indígenas de México como: Canidejé (Otomís), Cresón Huanéburri (Tarahumaras).⁴

La planta del berro es planta de 10 a 60 cm de altura, tiene tallos con raíces, son carnosos y ramificados. Las hojas alcanzan hasta 1.5 cm de largo y están muy divididas; con las flores blancas o blanco violáceas, sus frutos son vainas alargadas.³

Es un miembro de la familia Brassicaceae, a la cual pertenecen también hortalizas como los repollos, coliflores, brócolis, kale, mostazas y nabos, entre otras. Ha sido consumida desde tiempos muy antiguos; tanto así, que griegos y romanos creían que el berro promovía la fortaleza y el carácter. Se dice que: Hipócrates recogía berros de las corrientes de agua cercanas al hospital y se los proporcionaba a sus pacientes como purificador de sangre.³

3.2 Clasificación taxonómica

Nombres comunes: Berro,
Mastuerzo de agua, Canidejé (Otomís),
Cresón Huanéburri (Tarahumaras).³

Sinónimo: *Nasturtium officinale*

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Brassicales

Familia: Brassicaceae

Tribu: Cardamineae

Género: *Nasturtium*

Especie: *officinale*

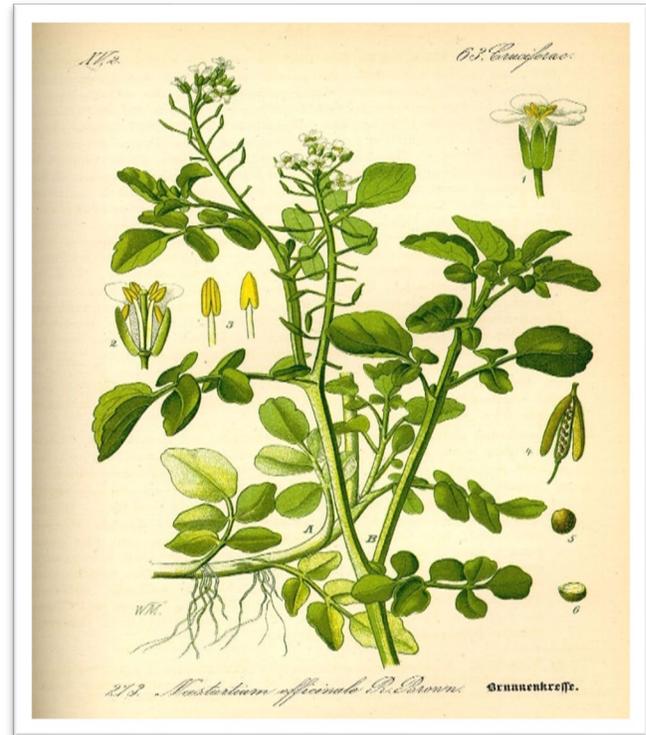


Ilustración 1. *Nasturtium officinale*.⁶

3.3 Etnobotánica del berro en México

Se usa en el tratamiento de problemas renales en Puebla, Michoacán y Tlaxcala es el principal uso. Se emplea molido o picado, con o sin raíz y se administra por vía oral cuando hay dolor de riñón. En Aguascalientes e Hidalgo se bebe licuado con agua, para los riñones; o cuando hay problemas pulmonares. En Durango, se toma molido y colado una vez al día o se come picado con limón en caso de tener el “pulmón delgado” (tuberculosis).⁴

En la Ciudad de México, se refiere que los tallos y hojas, comidos en forma de ensalada, diariamente por tiempo indefinido sirven para el corazón. En Oaxaca se menciona que cuando hay sobrecargo en el estómago, se da una infusión hecha con las ramas o la planta fresca y molida, la cual se puede tomar a cualquier hora del día.⁵

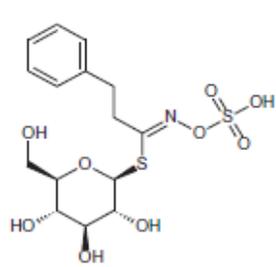
También se aprovecha para tratar alteraciones en la vesícula biliar, enfermedades del hígado, la inflamación de la boca (mejor conocido como: úlcera de estómago), para favorecer la menstruación, purificar la sangre, aumentar la secreción de orina, para los bronquios, el dolor de espalda, reumatismo y la hepatitis. Contra las afecciones de la piel, la anemia, el bocio, la diabetes, en enfermedades respiratorias y en la tuberculosis.⁴

3.4 Composición química

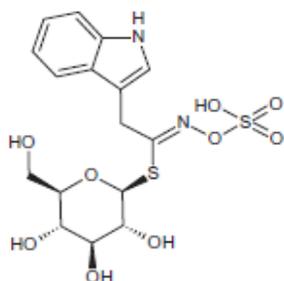
Las partes aéreas de la planta son las que contienen la mayor parte de componentes, el grupo principal de metabolitos secundarios son glucosinolatos, isotiocianatos y compuestos fenólicos.

Los más importantes encontrados en extractos las diferentes partes de la planta son: gluconasturtiin, glucobrassicin, glucohirsutin, glucoiberin, glucosiberin, glucotropaeolin, 4 hydroxy-glucobrassicin, 4-methoxy-glucobrassicin. Estos han sido detectados en las hojas, tallos, raíces, flores y unas partes en las semillas. La mayor concentración de glucosinolatos ha sido encontrada en las flores.

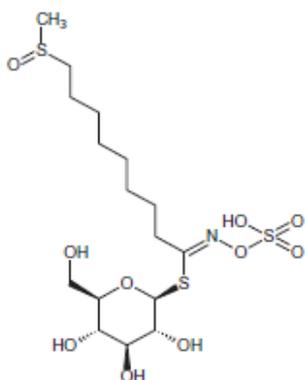
Glucosinolatos: Están divididos de acuerdo con su cadena amino terminal: glucosinolatos alifáticos derivados de alanina, leucina, isoleucina, metionina o valina, glucosinolatos aromáticos derivados de fenilalanina, tirosina, glucosinolatos indoles derivados del triptófano.⁷



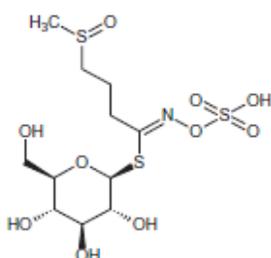
I. Gluconasturtiin



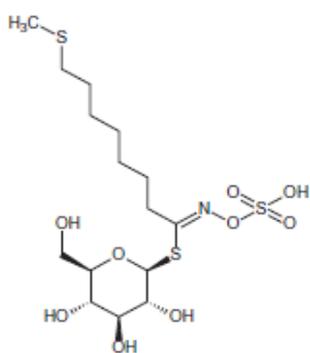
II. Glucobrassicin



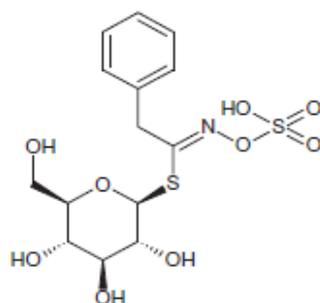
III. Glucohirsutin



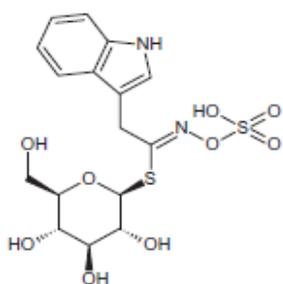
IV. Glucoiberin



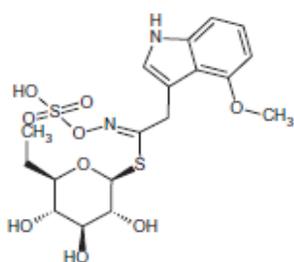
V. Glucosiberin



VI. Glucotropaeolin



VII. 4-Hydroxy-glucobrassicin



VIII. 4-Methoxy-glucobrassicin

Fig. 1. Estructuras químicas de los glucosinolatos característicos de *N. officinale*.⁷

Este grupo de metabolitos vegetales son recomendados en la prevención de enfermedades cardiacas, cáncer, diabetes y dermatológicas como la soriasis. Además, los glucosinolatos son agentes defensivos de plantas contra animales herbívoros, patógenos e insectos, por tanto, son pesticidas naturales.^{7,8}

3.5 Actividad terapéutica

Recientes investigaciones han demostrado que el berro tiene capacidad: antioxidante, anticancerígeno, antibacteriano, antiinflamatorio y protector cardíaco. Estos efectos son causados por los glucosinolatos, isotiocianatos, polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos), terpenos (incluidos carotenoides), vitaminas (B1, B2, B3, B6, E, C) y otros bioelementos.⁷

3.6 Hígado

El hígado es la glándula más voluminosa del cuerpo pesa alrededor de 1.4 kg en el adulto promedio, se encuentra por debajo del diafragma y ocupa la mayor parte del hipocondrio derecho y parte del epigastrio en la cavidad abdominal.

Esta cubierto casi por completo por el peritoneo visceral y revestido en su totalidad por una capa de tejido conectivo denso irregular que yace en la profundidad del peritoneo. El hígado se divide en dos lóbulos principales (el lóbulo derecho grande y el lóbulo izquierdo más pequeño).⁹

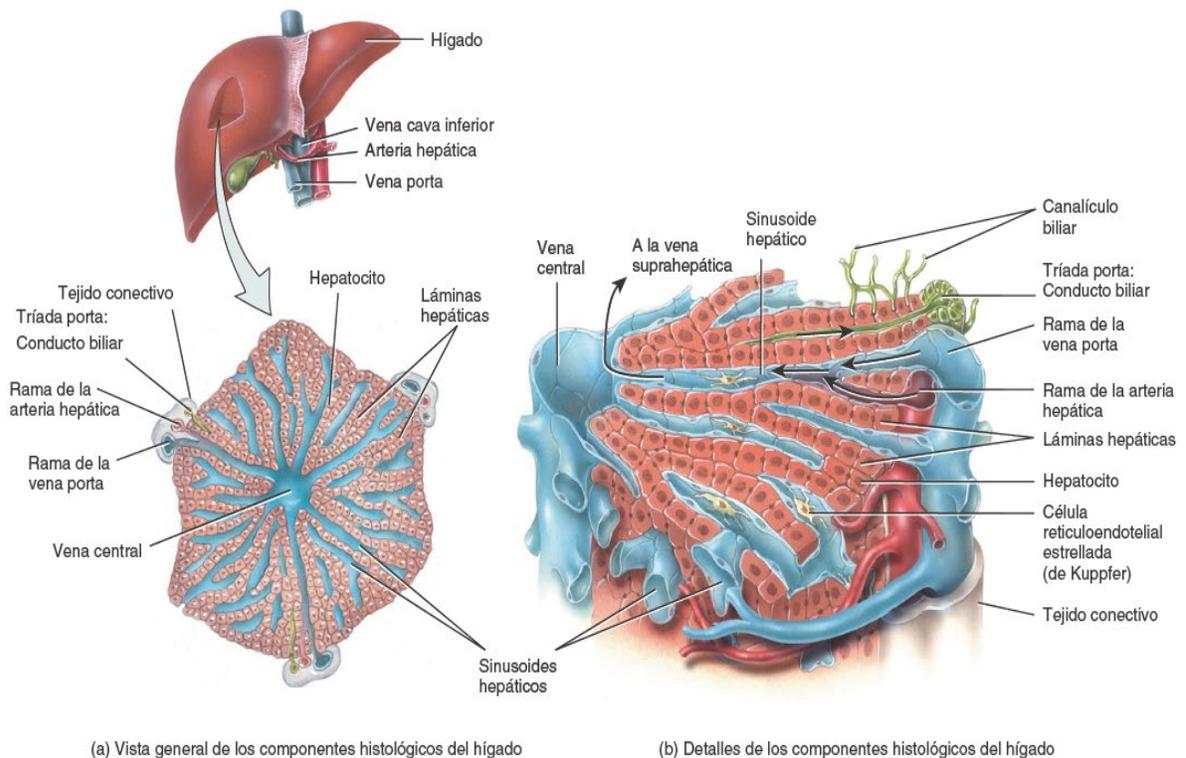


Fig. 2. Histología del hígado.⁹

3.7 Histología del hígado

Hepatocitos: son las principales células funcionales del hígado, cumplen una amplia variedad de funciones metabólicas, secretoras y endocrinas, son células epiteliales especializadas que presentan entre 5 y 12 lados, constituyen casi el 80% del volumen del hígado. Forman conjuntos tridimensionales complejos llamados láminas hepáticas, son placas unicelulares de hepatocitos, con borde engrosado recubiertos con endotelio. Se encargan de secretar bilis que es un líquido amarillento, amarronado o de color verde oliva que sirve tanto como un producto de una secreción digestiva.

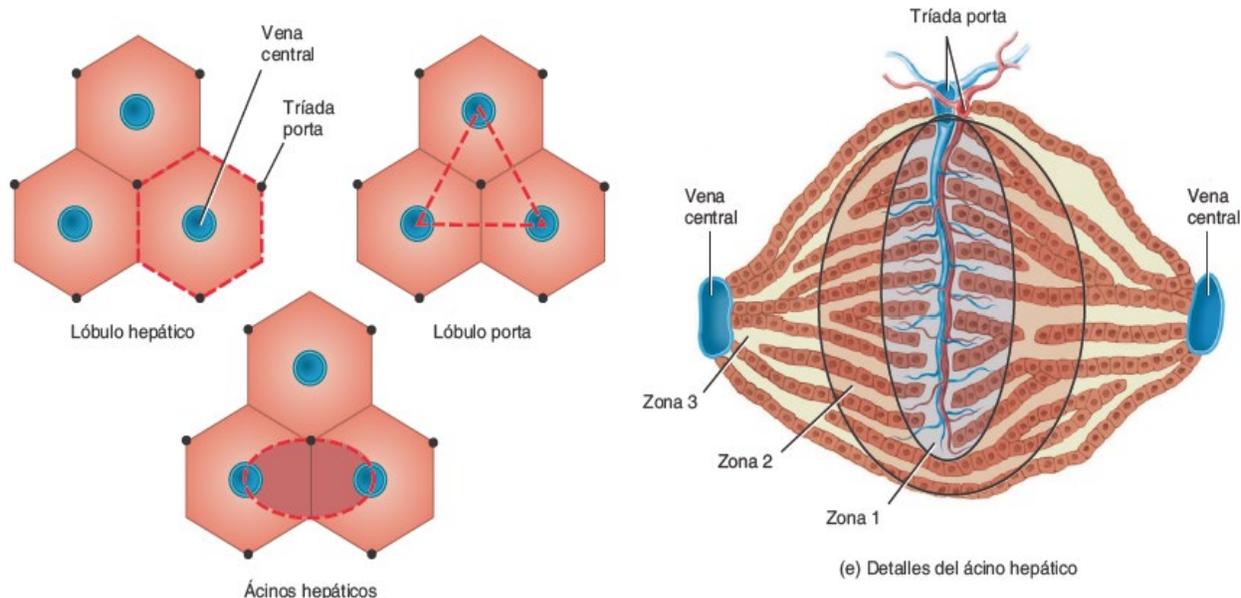
Canalículos biliares: son pequeños conductos entre los hepatocitos que recogen la bilis producida por éstos, desde los canalículos biliares, la bilis pasa hasta los conductillos biliares y luego hacia los conductos biliares, que emergen y eventualmente forman los conductos hepáticos derecho e izquierdo: ambos se unen y abandonan el hígado como un conducto hepático en común. El conducto hepático en común se une con el conducto cístico de la vesícula biliar para formar el conducto colédoco. De aquí la bilis ingresa al intestino delgado para participar en la digestión.

Sinusoides hepáticas: son capilares sanguíneos muy permeables, que se encuentran entre las filas de los hepatocitos que reciben sangre de las ramas abiertas de la arteria hepática y sangre desoxigenada rica en nutrientes de las ramas vena porta hepática. En las sinusoides hepáticas también hay células reticuloendoteliales estrelladas, que destruyen a los eritrocitos y leucocitos viejos, bacterias y cualquier otra materia extraña en el drenaje de sangre venosa desde el tracto gastrointestinal.

Juntos el conducto biliar, la arteria hepática y vena porta reciben el nombre de triada portal.⁹

Los hepatocitos, el sistema de conductos biliares y los sinusoides hepáticos pueden organizarse en unidades anatómicas funcionales de tres formas diferentes:

1. **Lóbulo hepático:** durante años los anatomistas describieron el lóbulo hepático como la unidad funcional del hígado, según este modelo tiene forma de hexágono (estructura de seis lados) en el centro está la vena central y desde allí salen en disposición irradiada filas de hepatocitos y sinusoides hepáticos, en tres ángulos del hexágono no hay triada portal. Este modelo se basa en la descripción del hígado de cerdos adultos, en el hígado humano resulta difícil encontrar lóbulos hepáticos tan definidos rodeados por capas espesas de tejido conectivo.
2. **Lóbulo portal:** este modelo hace hincapié en la función exocrina del hígado, es decir la secreción de bilis. En este sentido, el conducto biliar de la triada portal es considerado el centro del lóbulo portal, que presenta forma triangular y está definido por tres líneas imaginarias que conectan tres venas centrales cerca de la triada portal.
3. **Acino hepático:** en la actualidad, se le considera que es la unidad estructural y funcional del hígado conocida como el acino hepático, cada uno es una masa casi ovalada que incluye porciones de dos lóbulos hepáticos vecinos, es la unidad funcional y estructural más pequeña del hígado.⁹



(d) Comparación entre las tres unidades estructurales y funcionales del hígado

Fig. 3. Unidad estructural del hígado.⁸

3.8 Función del hígado

Todos los días los hepatocitos secretan entre 800 y 1,000 mL de bilis, un líquido amarillento, amarronado o color verde oliva. Presenta un pH de 7,6 a 8,6 y consiste, en su mayor parte, en agua, sales biliares, colesterol, un fosfolípido llamado lecitina, pigmentos biliares y varios iones.

El principal pigmento biliar es la bilirrubina, su función es la fagocitosis de los eritrocitos viejos, libera hierro, globina y bilirrubina (derivada del grupo hemo), el hierro y la globina se reciclan; la bilirrubina se secreta en bilis y eventualmente se degrada en el intestino. Uno de los productos de su degradación es la estercobilina, les otorga a las heces su característico color marrón.⁹

La bilis es en parte un producto excretorio y en parte una secreción digestiva, las sales biliares que son sales sódicas y sales de potasio de los ácidos biliares cumplen una función de emulsificación que participan en la absorción de lípidos, digestión y degradación de grandes glóbulos de lípidos en suspensión a glóbulos más pequeños que permite que la lipasa pancreática digiera los triglicéridos con mayor rapidez.⁹

Además de secretar bilis, necesaria para la adsorción de los alimentos grasos, el hígado cumple otras funciones vitales como el:

- **Metabolismo de los hidratos de carbono:** el hígado es especialmente importante para mantener los niveles normales de glucosa en sangre, cuando hay hipoglucemia el hígado puede desdoblar el glucógeno en glucosa y liberarla al torrente sanguíneo. Convierte el ácido láctico y los azúcares como la fructosa y la galactosa en glucosa. Cuando hay hiperglucemia como ocurre con la ingesta de alimentos, el hígado convierte la glucosa en glucógeno y triglicéridos para almacenarlos.
- **Metabolismo de lípidos:** Los hepatocitos almacenan algunos triglicéridos, degradan ácidos grasos para generar ATP, sintetizan lipoproteínas que transportan ácidos grasos, triglicéridos y colesterol al cual sintetizan y lo utilizan para formar sales biliares.
- **Metabolismo proteico:** los hepatocitos desaminan (eliminan a el grupo amino, NH_2) a los aminoácidos de manera que pueden utilizarse en la producción de ATP, ser convertidos en hidratos de carbono o grasas. El amonio (NH_3) es un compuesto tóxico resultante que se convierte luego en un compuesto menos tóxico conocido como urea que se excreta por la orina. Los hepatocitos también sintetizan la mayoría de las proteínas plasmáticas como la alfa, beta globulinas, la albumina, la protrombina y el fibrinógeno.

- **Procesamiento de fármacos y hormonas:** el hígado puede detoxificar sustancias como el alcohol y excretar fármacos como la penicilina, eritromicina y sulfonamidas en la bilis, puede también alterar químicamente o excretar hormonas tiroideas y hormonas esteroideas, como los estrógenos y la aldosterona.
- **Síntesis de sales biliares:** Las sales biliares sirven en el intestino delgado para emulsionar y adsorber lípidos.
- **Almacenamiento:** Además del glucógeno, el hígado es el sitio primario de almacenamiento de algunas vitaminas (A, B₁₂, D, E y minerales (hierro y cobre) que se liberan al hígado cuando se requiere en alguna parte del cuerpo.
- **Fagocitosis:** las células reticuloendoteliales estrelladas (Kupffer) del hígado fagocitan a los glóbulos blancos, los glóbulos rojos y algunas bacterias.
- **Activación de la vitamina D:** la piel, el hígado y los riñones participan en la síntesis de la forma activa de la vitamina D.⁹

3.9 Enfermedades del hígado

Hepatitis: se define como la inflamación del hígado que puede deberse a una variedad de causas, como el consumo excesivo de alcohol, enfermedades autoinmunes, drogas o toxinas. Sin embargo, la causa más frecuente de hepatitis se debe a una infección viral y se conoce como hepatitis viral. Los tipos más comunes de hepatitis viral son la hepatitis A, la hepatitis B y la hepatitis C.

Los otros tipos de hepatitis viral son la hepatitis D y E y se encuentran con menos frecuencia. Según la etiología de la hepatitis, la gravedad puede variar desde una enfermedad leve y autolimitada hasta una enfermedad grave que requiere un trasplante de hígado. La hepatitis se puede clasificar en aguda y crónica en función de la duración de la inflamación/agresión al hígado.

Si la inflamación del hígado dura menos de 6 meses, se denomina hepatitis aguda y si dura más de 6 meses, se denomina hepatitis crónica. La hepatitis aguda suele resolverse por sí sola, pero puede causar insuficiencia hepática fulminante según la etiología. Por el contrario, la hepatitis crónica puede causar daño hepático que incluye fibrosis hepática, cirrosis, carcinoma hepatocelular y características de hipertensión portal que conducen a una morbilidad y mortalidad significativas.¹⁰

Enfermedad Hepática Alcohólica: es la enfermedad hepática producida por el consumo de alcohol, se caracteriza por la insuficiencia hepática aguda sobre la crónica. Produce una importante reacción inflamatoria sistémica y fallo multiorgánico, que en la variante grave de la enfermedad eleva la mortalidad y es una condición frecuente en la población mexicana.

El alcohol se absorbe en el estómago, en el intestino delgado y el 90% es metabolizado en el hígado, mientras que el resto es eliminado por el riñón o a través de los pulmones. En el interior de la célula hepática el alcohol sufre dos procesos oxidativos mediante los cuales pasa de etanol a acetaldehído y posteriormente a acetato. El primer paso oxidativo se produce principalmente en el citoplasma del hepatocito y está catalizado por la enzima alcoholdehidrogenasa.¹¹

Cirrosis: es una condición médica en la que el hígado está cicatrizado y permanentemente dañado, el tejido cicatricial reemplaza el tejido sano y evita que el hígado funcione normalmente a medida que la cirrosis empeora, el hígado empieza a fallar. Muchas personas no saben que tienen cirrosis, debido a que es posible que no tengan signos o síntomas hasta que el hígado está muy dañado.¹¹

3.10 Marcadores enzimáticos (AST, ALT y LDH)

Son indicadores de daño hepático, la medición de enzimas hepáticas séricas en el laboratorio es usada para el diagnóstico de enfermedad hepática. La utilidad de cada enzima dependerá de la sensibilidad y especificidad de estas para determinar un daño hepático.

Las aminotransferasas incluyen AST y ALT que son marcadores de lesión hepatocelular, participan en la gluconeogénesis catalizando la transferencia de grupos amino del ácido aspártico o alanina al ácido alfa-cetoglutarico para producir ácido oxaloacético y ácido pirúvico, respectivamente.¹²

Alanina aminotransferasa (ALT) se solía llamar transaminasa glutámico-pirúvica (TGO) es una enzima citosólica que se encuentra predominantemente en hígado y en menores cantidades en riñones, corazón y músculo esquelético. Las lesiones o enfermedades que afectan el parénquima hepático provocan la liberación de esta enzima hepatocelular a la sangre, lo cual eleva las concentraciones séricas de ALT.¹²

La mayor parte de los aumentos de ALT es consecuencia de una disfunción hepática, por lo que esta enzima no solo es sensible, sino muy específica para la enfermedad hepatocelular. Es una de las enzimas que ayudan al hígado a transformar el alimento en energía, una concentración alta de esta enzima puede ser un signo de que el hígado está lesionado o irritado que estas enzimas se están escapando de los hepatocitos.

Aspartato Aminotransferasa (AST) se solía llamar transaminasa glutámico-oxalacética (TGP) es una enzima citosólica unida a las mitocondrias que cataliza la reacción responsable de la biosíntesis de aspartato a partir de los carbohidratos tiene una amplia distribución en los tejidos y se libera al plasma cuando las células están dañadas, incluyendo el hepático, músculo cardíaco, eritrocitos, células intestinales y riñones, por lo cual no es un indicador específico de enfermedad hepática.¹³

Lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima que cumple una función importante en la producción de energía por el cuerpo, se encuentra distribuida en casi todos los tejidos del citoplasma celular. Su contenido es especialmente alto en riñones, el cerebro, el hígado, el músculo cardíaco, los eritrocitos y los tejidos tumorales.¹³

La concentración de esta se eleva en diferentes procesos megaloblásticos, leucemia aguda, traumatismo, intervenciones quirúrgicas y procesos cancerosos, también aumenta en alteraciones hepáticas y renales e incluso en situaciones tan diversas como la malnutrición, la deshidratación, la intoxicación bacteriana, es un marcador inespecífico de inflamación.¹³

3.11 Toxicología

La toxicología se define según Gilbert¹⁴ como: La ciencia que se ocupa del estudio de los efectos adversos a la salud causados por agentes químicos, físicos o biológicos en los organismos vivos. Los efectos adversos pueden variar desde muerte, cáncer y enfermedades hasta daños sutiles en el sistema nervoso que pueden resultar en la disminución de la inteligencia.

La toxicología está directamente relacionada con la medicina en el diagnóstico clínico y el tratamiento del envenenamiento, así como los efectos tóxicos aumentados de los fármacos son de gran importancia; En la agricultura es primordial en el desarrollo de biocidas selectivos tales como insecticidas, herbicidas y fungicidas. La toxicología es considerada un área fundamental para las ciencias porque la adaptación del organismo al ambiente tóxico tiene implicaciones muy importantes para la ecología y la evolución.¹⁵

3.11.1 Toxicidad aguda y DL₅₀

Esta prueba tiene como objeto determinar efectos de una elevada dosis de un fármaco. La finalidad del estudio es la muerte del animal y la toxicidad aguda esta expresa como dosis letal 50 (DL₅₀), que viene a representar la dosis de una sustancia que produce la muerte en un 50% de los animales empleados y permite establecer la potencia de toxicidad de un fármaco.¹⁶

POTENCIA	DL ₅₀ mg/kg
Extremadamente tóxico	< 1
Altamente tóxico	1-50
Moderadamente tóxico	50-500
Ligeramente tóxico	500-5,000
Prácticamente no tóxico	5,000-15,000

Tabla 1. Potencia de la toxicidad de un fármaco en función de la dosis letal 50.¹⁷

3.11.2 Método de Lorke para determinar dosis letal 50 (DL₅₀)

Es un método para la investigación de la toxicidad aguda de un agente desconocido, se describe la sustancia química con una estimación de DL₅₀. Usando esto, es posible obtener con 13 animales experimentales información adecuada sobre la toxicidad aguda y la DL₅₀. Este método no tiene limitaciones y se aplica a drogas, productos químicos agrícolas e industriales, se puede usar para todas las vías de administración. Los animales son tratados por lo menos 5 días con la sustancia a analizar y estos son observados frecuentemente durante las horas normales de trabajo y todos los efectos secundarios son anotados, se anotarán las muertes y todas las observaciones se harán durante 14 días y el experimento se dará por terminado.¹⁸

3.7 Tetracloruro de carbono (CCl₄)

El tetracloruro de carbono (CCl₄) es usado frecuentemente como un inductor químico de daño hepático experimental debido a que cuando se metaboliza produce los radicales libres, el triclorometil ($\cdot\text{CCl}_3$) que a su vez reacciona con el O₂ para formar el radical triclorometil peroxil (CCl₃COO \cdot) que puede interaccionar con los fosfolípidos de la membrana.

La destrucción oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de la membrana es llamada peroxidación lipídica considerada un importante mecanismo de toxicidad de numerosos compuestos químicos. El efecto directo de la peroxidación lipídica es la destrucción de la membrana y el efecto secundario incluye la pérdida de las enzimas asociadas a la membrana, de los antioxidantes y la necrosis.

Los radicales libres se han implicado en numerosos procesos patológicos como la enfermedad hepática, la cardiovascular y el cáncer. El estrés oxidativo es uno de los mecanismos involucrados en la hepatotoxicidad aguda inducida por CCl₄. A pesar de los estudios acerca de la patogénesis molecular del daño hepático, las terapias efectivas para estas enfermedades son todavía limitadas, la terapia antioxidante inhibe los cambios oxidativos deletéreos y es una herramienta muy importante para los tratamientos de las enfermedades hepáticas.¹⁹

El hígado es especialmente sensible al CCl₄ porque se dilata y las células sufren daño o son destruidas. Los riñones también sufren daño causando acumulación de desperdicios en la sangre. Si la exposición es baja y breve, el hígado y los riñones pueden reparar las células dañadas y volver a funcionar normalmente.²⁰

3.8 Silimarina

La silimarina (*Silybum marianum*) también conocido como cardo mariano o cardo de Santa María. Es una planta originaria de la región mediterránea y pertenece a la familia *Asteraceae*, se caracteriza por tener ramas espinosas y una savia lechosa, con hojas ovaladas que alcanzan hasta 30 cm.

Las flores son de color rosa brillante y pueden llegar a medir 8 cm de diámetro. El cardo mariano crece de manera silvestre en el sur de Europa, el norte de África y el Medio Oriente. En México, el cardo mariano se consume como suplemento alimenticio.

La silimarina es un compuesto natural que está presente en especies derivadas del *Silybium marianum*. La planta contiene al menos siete flavolignanos y el flavonoide *Taxifolina*. Los flavolignanos son más importantes presentes incluyen la *Silibina*, *Silidianina*, *Silicristina*. La *Silibina* representa entre el 50% y el 70% del extracto de la silimarina. Se conocen las siguientes isoformas de flavolignano: *Silbyna A*, *Silbyna B*, *Isosilbyna A* e *Isosilbyna B*.²¹

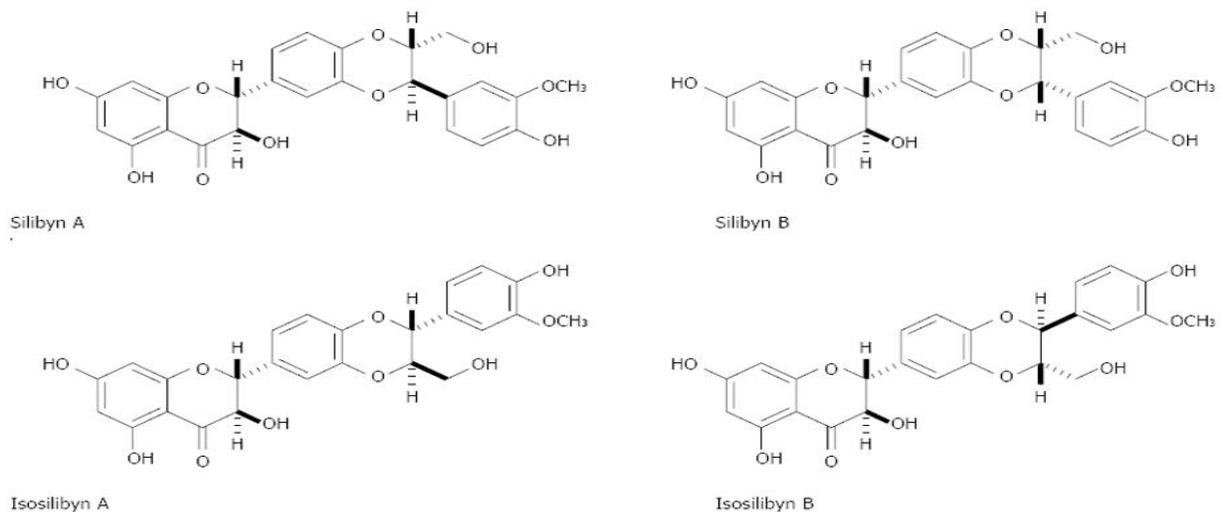


Figura 4. Estructura química de *Silbyna A*, *Silbyna B*, *Isosilbyna A*, *Isosilbyna B*, extracto de silimarina.²¹

Se ha informado que la silimarina tiene propiedades antioxidantes, antifibróticas, antiproliferativas y antivirales. También afecta la síntesis de ARN Y ADN. Además, la silimarina mantiene la integridad de la membrana del hepatocito e impide la entrada de sustancias tóxicas o xenobióticos. Debido a su naturaleza fenólica, es capaz de donar electrones para estabilizar las especies reactivas al oxígeno (ROS).

La silimarina también afecta el glutatión intracelular lo que previene la lipoperoxidación de las membranas. La actividad hepatoprotectora y antioxidante de la silimarina se debe a su capacidad de inhibir radicales libres que se producen a partir del metabolismo de sustancias toxicas tales como el etanol, el paracetamol y el tetracloruro de carbono (CCl₄).²¹

3.9 Ratones CD1

Los modelos animales han sido herramientas fundamentales desde los primeros días del descubrimiento científico, hoy en día son indispensables en la investigación biomédica contribuyendo a nuestro conocimiento de las funciones de los genes, la etiología y mecanismos de diferentes enfermedades, como la efectividad y toxicidad de medicamentos y productos químicos. Se han secuenciado los genomas de los principales organismos modelo, verificando un alto nivel de conservación genética entre los organismos modelo y los seres humanos.²²

Cepa	Características	Usos
CD1	<ul style="list-style-type: none">• Carácter dócil.• Promedio de crías: 11.5	Excelentes características reproductivas y Maternales, estudios de retinopatías, Oncología, Toxicología, Teratogénesis, Propósitos Generales.

Tabla 2.- Características y usos ratones CD1.²³



Imagen 1. Ratón CD1.²²

3.10 Antecedente para el diseño experimental del estudio del efecto hepatoprotector del berro con cirrosis aguda inducida con CCl₄

Para el diseño del modelo experimental del estudio del efecto hepatoprotector del berro con cirrosis aguda inducida con CCl₄ se tomó como antecedente el experimento realizado por Baligar²⁴ et al. su objetivo fue investigar el papel hepatoprotector de la azadiactina-A con la hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono (CCl₄) en ratas albinas Wistar y los grupos dividió de la siguiente manera:

Grupo control: vehículo + 1 mL/kg CCl₄

Grupo silimarina: 100 mg/kg+ 1 mL/kg CCl₄

Grupos azaridactina-A: 100 y 200 mg/ kg+ 1 mL/kg CCl₄

Se administraron durante nueve días por vía de administración intraperitoneal y el décimo día se sacrificaron, se midieron sus parámetros bioquímicos en sangre.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La herbolaria en México tiene antecedentes prehispánicos, el uso de plantas medicinales es algo que nuestros ancestros nos han heredado de generación en generación y se sigue llevando a cabo con regularidad para tratar o aliviar enfermedades. Muchos de estos remedios herbolarios solo tienen antecedentes empíricos y no tienen estudios que puedan asegurar o descartar la efectividad de estos, también pueden tener interacciones con medicamentos o resultar tóxicos para el organismo, en nuestro país las muertes asociadas a enfermedades de hígado ocupan el quinto lugar según el censo del INEGI y la Secretaria de Salud del 2022².

El berro (*Nasturtium officinale*) tiene capacidad antioxidante, antiinflamatoria, antitumoral, hipoglucemiante y como protector cardiaco esto debido a la gran cantidad de glucosinolatos, flavonoides e isotiocianatos que contiene⁷, en la actualidad el berro se sigue utilizando empíricamente como protector hepático, pero no tiene investigaciones que confirmen científicamente su efecto, con estos antecedentes y la necesidad de búsqueda de nuevas moléculas para el tratamiento de enfermedades hepáticas, se planteó la necesidad de realizar un modelo experimental *in vivo* con ratones macho CD1 para evaluar si un extracto acuoso de berro tiene o no, capacidad como protector hepático frente al daño agudo inducido con tetracloruro de carbono (CCl₄).

5. HIPÓTESIS

El berro se ha utilizado empíricamente como remedio herbolario para tratar dolores de estómago, de cabeza, limpiar el organismo de toxinas, como antiinflamatorio y protector hepático. En investigaciones recientes se ha encontrado que tiene capacidad antioxidante, antiinflamatoria, antitumoral, hipoglucemiante y como protector cardíaco⁷. Debido a estos antecedentes surge la pregunta: ¿qué efecto tendrá un extracto acuoso de berro a nivel hepático en un modelo *in vivo* de ratones CD1 machos con cirrosis aguda inducida con CCl₄?

6. OBJETIVOS

6.1 GENERAL

Determinar si existe o no efecto hepatoprotector de un extracto acuoso de berro (*Nasturtium officinale*) usando tetracloruro de carbono (CCl₄) como agente inductor de daño agudo hepático en un modelo de ratones macho CD1.

6.2 ESPECÍFICOS

- Determinar la DL₅₀ un modelo de ratones CD1 con tetracloruro de carbono (CCl₄) por el método de Lorke.
- Obtener un extracto acuoso de berro (*Nasturtium officinale*) por medio de un rotavapor a temperatura constante y presión reducida.
- Realizar el estudio del efecto como protector hepático del berro (*Nasturtium officinale*) en un modelo de ratones macho CD1 durante 10 días con tetracloruro de carbono (CCl₄) como agente inductor de daño hepático agudo y usando silimarina (*Silybum marianum*) como protector hepático de referencia.
- Determinar los valores de los marcadores enzimáticos de inflamación hepática AST, ALT y LDH en suero sanguíneo de los ratones CD1 por medio de una determinación diagnóstica cuantitativa *in vitro*, utilizando un analizador automatizado de Química Clínica Ilab 650.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Tipo de estudio: prospectivo, experimental, transversal.

Población de estudio: modelo de ratón CD1 macho.

Criterios de inclusión: ratones con un peso entre 29 y 35 gramos, ratones de 5 semanas de edad.

Criterios de exclusión: ratones hembra, ratones macho con un peso mayor a 35 gramos o menor a 29 gramos, que no presenten enfermedades durante el estudio.

Criterios de eliminación: ratones muertos.

Variable dependiente: peso de los ratones.

Variable independiente: dosis de tetracloruro de carbono (CCl₄) 1, 3, 9 y 12 mL/kg de peso corporal.

Dosis de berro: 8, 64, 512 mg/kg de peso corporal.

Dosis de silimarina: 100 mg/kg de peso corporal.

Análisis estadístico cuantitativo: los datos se analizarán por medio del programa estadístico IBM SPSS 23.

8. MATERIAL, REACTIVOS, INSTRUMENTOS Y EQUIPO

8.1 MATERIAL

Matraz Erlenmeyer (1,000 mL, 2,000 mL) KIMAX

Vaso de Precipitado (50 mL, 100 mL, 500 mL) KIMAX

Matraz Bola 1,000 mL KIMAX

Soporte para embudo de hierro

Malla de asbesto

Mechero Fisher

Embudo de vidrio tallo largo

Papel filtro poro 11 Whatman

Embudo Büchner

Gasas 10x10 cm

Caja Petri de vidrio

Jeringas 5 mL

Cánulas esofágicas

Tubos Ependeorff

8.3 EQUIPO

Rotavapor RE300

Horno de secado

Analizador automatizado ILAB650

8.4 INSTRUMENTOS

Balanza analítica ADAM

Balanza granataria

8.4 REACTIVOS BIOLÓGICOS

51 ratones macho CD1

8.5 REACTIVOS Y SUSTANCIAS

Tetracloruro de carbono (CCl₄) Merck

Aceite de oliva extra-virgen comestible EI OLIVO

Agua destilada

Agua potable

9. MÉTODOS

9.1 Determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀) del CCL₄ por el método de Lorke

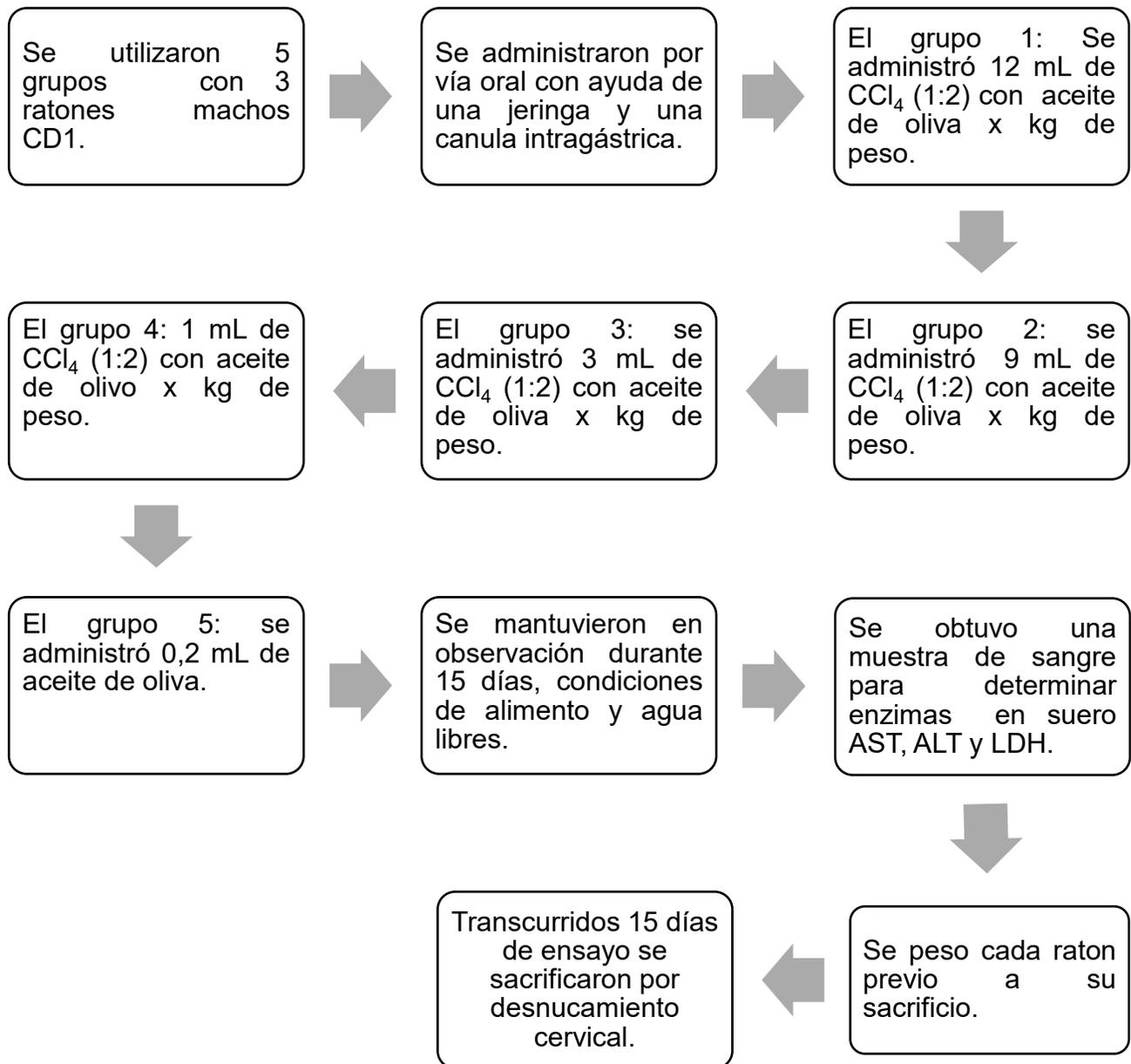


Diagrama de flujo 1. Metodología para prueba de dosis letal (DL₅₀) por el método de Lorke.

9.2 Recolección y secado del berro (*Nasturtium officinale*)

La planta del berro se compró en un mercado local, es de fácil acceso y se consume con regularidad dentro de la dieta mexicana, fueron un total 100 g incluidas raíces, tallo y hojas.

La planta se enjuagó con agua destilada, se escurrió y dejó secar envuelta en papel periódico en una prensa casera en condiciones de temperatura y humedad ambiente durante un mes, transcurrido este tiempo se observó que no hubiese formación de hongos o microorganismos que pudieran modificar sus propiedades, pasado este tiempo se dejó en un horno para secado a 36 °C durante 12 horas para eliminar todo residuo de humedad.

9.3 Extracto acuoso de berro

En una balanza granataria se pesaron 84.5 gramos del berro seco.

Se midieron 1,250 mL de agua destilada y se colocaron los 84.5 gramos de berro seco en un matraz Erlenmeyer de 2,000 mL a punto de ebullición, cuidando que no se proyectara para obtener la infusión. La solución se concentró hasta que llegar a 1,000 mL y se trasvasaron a un matraz Erlenmeyer de 1,000 mL.



IMAGEN 2,3,4. OBTENCIÓN DE INFUSIÓN DE BERRO EN AGUA.

Esta solución concentrada se filtró con ayuda de un embudo de vidrio y una gasa hasta obtener la mayor cantidad de filtrado y limpiar impurezas, se filtró al vacío y está se colocó en un matraz bola de 1,000 mL y con un kit de destilación para rotavapor a presión reducida a una temperatura 60 °C por 10 horas.



IMAGEN 5. FILTRACIÓN POR GRAVEDAD DE INFUSION BERRO.



IMAGEN 6. DESTILACIÓN A PRESIÓN REDUCIDA DEL BERRO.

Se raspó todo el matraz bola de 500 mL hasta obtener la mayor cantidad de extracto de berro. Se colocó en un vaso de precipitado de 100 mL dentro de una estufa a 37 °C para eliminar toda el agua que pudiese contener y se obtuvo una pasta semisólida color caramelo, este es el extracto que se utilizó para administrar vía oral a los ratones CD1 en la segunda parte del experimento. Se almacenó en refrigeración a 8 °C hasta el día del ensayo.

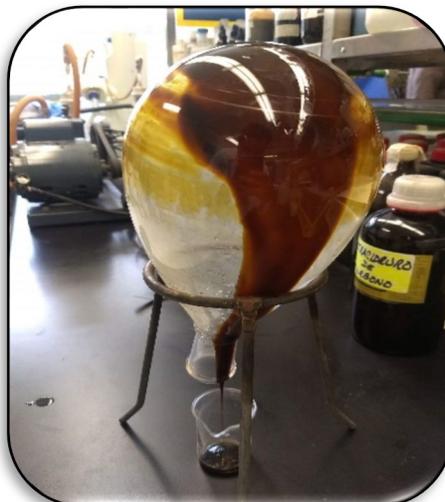


IMAGEN 7. EXTRACTO ACUOSO DE BERRO OBTENIDO.

9.4 Modelo experimental de daño hepático agudo inducido con CCl₄ en ratones macho CD1

Con el antecedente del método realizado por Baligar et. al.²³ y conociendo la DL₅₀ previamente estimada en ratones macho CD1 se planteó el siguiente modelo experimental. Las imágenes de la metodología se encuentran en el ANEXO IV y los fundamentos de las técnicas y reactivos utilizados en la determinación enzimática están en el ANEXO V.

El experimento se dividió en 6 grupos de 6 ratones CD1 cada uno y se formaron de la siguiente manera:

- 1er grupo: Control negativo: agua + alimentación.
- 2do grupo: Control positivo: agua + 9 mL/kg de CCl₄ (1:2) con aceite de oliva al noveno día.
- 3er grupo: Silimarina 100 mg/Kg + 9 mL/kg de CCl₄ (1:2) con aceite de oliva al noveno día.
- 4to grupo: Extracto acuoso de berro 8 mg/kg + 9 mL/kg de CCl₄ (1:2) con aceite de oliva al noveno día.
- 5to grupo: Extracto acuoso de berro 64 mg/ kg + 9 mL/kg de CCl₄ (1:2) con aceite de oliva al noveno día.
- 6to grupo: Extracto acuoso de berro: 512 mg/kg + 9 mL/kg de CCl₄ (1:2) con aceite de oliva al noveno día.

- Seguido de la administración del CCl₄ por vía oral al noveno día, se les quito el alimento y sólo se les dejo agua a libre demanda.
- Los ratones se sacrificaron 24 horas después de la administración de CCl₄ en el décimo día.
- Antes de su sacrificio se pesó cada ratón, se colocaron en un cámara de cloroformo durante unos segundos para su anestesia y mejor manejo.
- Anestesiados los ratones se les hizo una incisión en la arteria aorta y se recolectaron las muestras sanguíneas en tubos Eppendorf marcados individualmente del 1 al 36.
- Obtenida la muestras de sangre se procedió a dislocarlos cervicalmente para inducirles eutanasia.
- Se extrajeron el corazón, el bazo, el hígado y riñones, se pesaron individualmente y se colocaron en cajas Petri marcadas individualmente del 1 al 36.
- Se centrifugaron las muestras sanguíneas a 3,000 RPM x 15 min, se separó el suero del plasma, para la determinación de los marcadores enzimáticos AST, ALT y LDH.
- La determinación de los marcadores enzimáticos AST, ALT y LDH se realizó con un analizador automatizado para determinar muestras en Química Clínica I Lab650 de la marca Werfen.

10. RESULTADOS

10.1 Ensayo DL₅₀ con tetracloruro de carbono (CCl₄) en ratones CD1

Dosis de CCl ₄ [mL/kg]	Ratones muertos	Ratones totales
12 mL/kg	2	3
9 mL/kg	1	3
3 mL/kg	0	3
1 mL/kg	0	3
Control	0	3
DL ₅₀	10.393 mL/kg	

Tabla 3.- Resultados determinación DL₅₀ de tetracloruro de carbono por el método de Lorke.¹⁸

10.2 Marcadores enzimáticos analizados en suero de ratón CD1 en DL₅₀

Se analizaron las muestras de suero sanguíneo de los grupos de ratones por medio del equipo automatizado ILAB 650 Clinical Chemistry. Se determinaron las enzimas: AST, ALT y LDH. Se obtuvieron los siguientes valores en unidades / litro de cada ratón (U/L).

Grupo	Dosis	AST	ALT	LDH
1	Control	162	41	3248
1	Control	151	36	3666
1	Control	177	48	5440
2	1 mL/kg	127	36	2694
2	1 mL/kg	170	40	7150
2	1 mL/kg	256	53	7520
3	3 mL/kg	154	49	3362
3	3 mL/kg	158	45	5100
3	3 mL/kg	290	70	8080
4	9 mL/kg	1234	208	3940
4	9 mL/kg	946	158	6760
4	9 mL/kg	0	0	0
5	12 mL/kg	1300	374	6960
5	12 mL/kg	0	0	0
5	12 mL/kg	0	0	0

Tabla 4.- Marcadores enzimáticos en suero de ratones analizados en el equipo automatizado ILAB 650 Clinical Chemistry.

Gráficas de resultados estadísticos media ANOVA de DL₅₀ de CCl₄

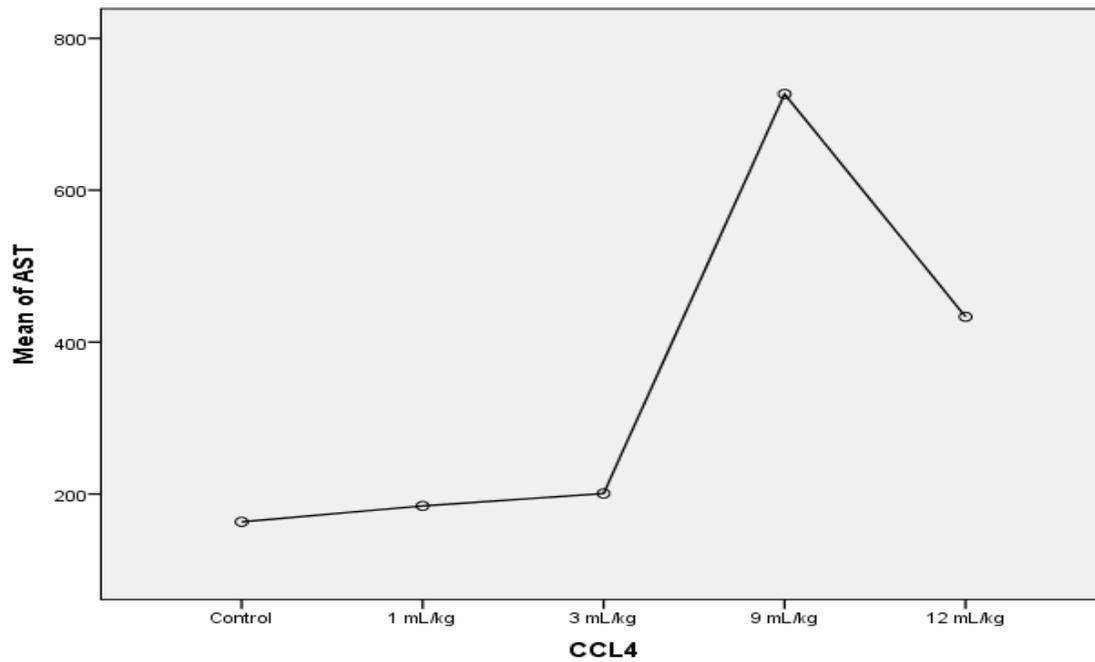


Gráfico 1. Media de dosis de tetracloruro de carbono (mL/kg) contra media enzimática de AST (aspartato transaminasa).

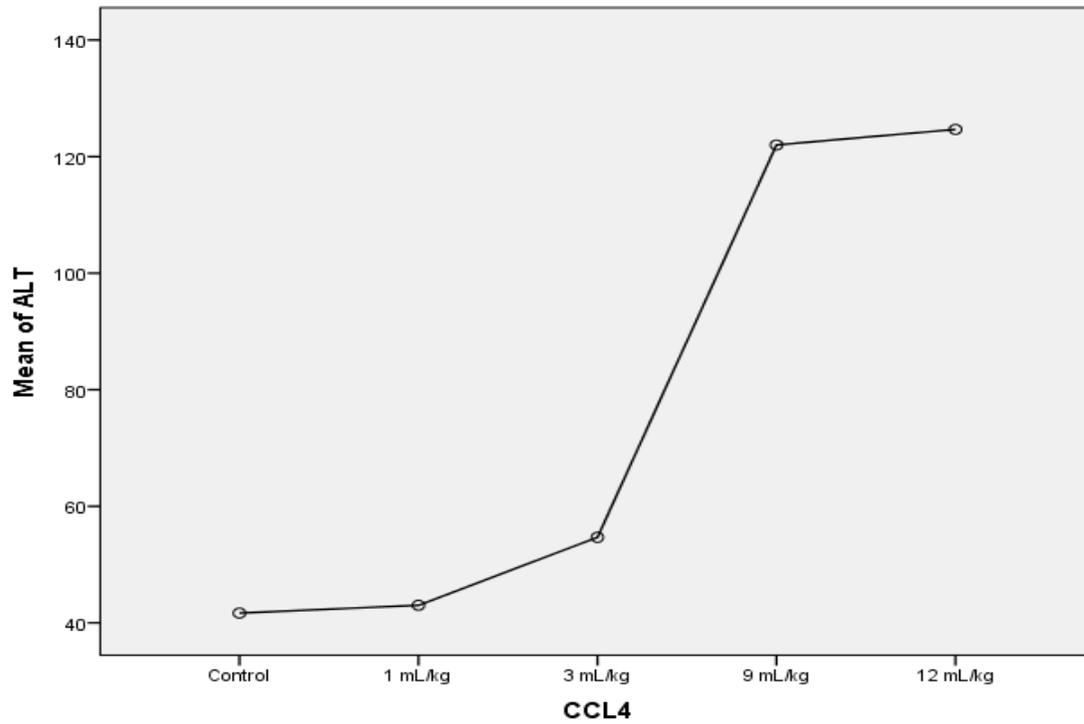


Gráfico 2. Media de dosis de tetracloruro de carbono (mL/kg) contra media enzimática de ALT.

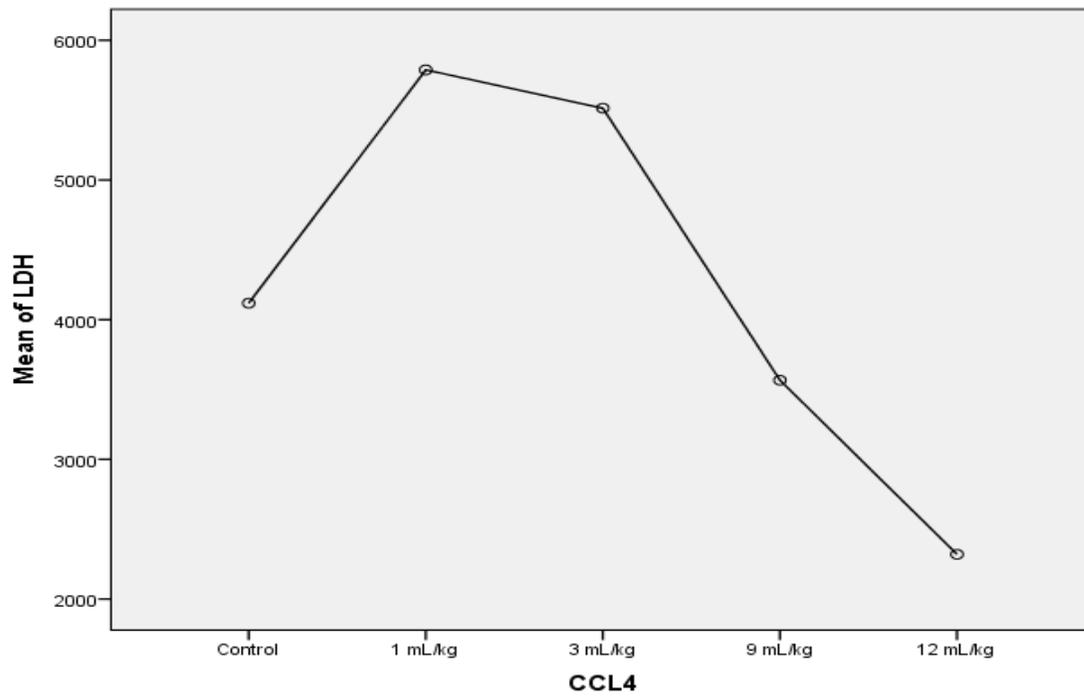


Gráfico 3. Media de dosis de tetracloruro de carbono (mL/kg) contra media enzimática de LDH.

10.3 Rendimiento obtenido del extracto acuoso de berro a presión reducida

Peso del vaso de precipitado de 100 mL: 35.8441 g

Peso del vaso de precipitado de 100 mL con el extracto de berro: 60.9480 g

Fórmula para el cálculo del peso total obtenido del extracto:

(Vaso de precipitado con extracto – vaso de precipitado sin extracto)

Peso total obtenido del extracto: $(60.9480 \text{ g} - 35.8441 \text{ g}) = 26.1039 \text{ g}$.

Peso total obtenido del extracto: 26.1039 g de extracto de berro.

Fórmula para el cálculo del rendimiento de la extracción:

$(\text{Peso total obtenido del extracto} / \text{Peso inicial seco}) * 100$

Rendimiento de la extracción: $(26.1039 \text{ g} / 84.5 \text{ g}) * 100$

Rendimiento total obtenido: 30.8921%.

10.4 Resultados de los marcadores enzimáticos analizados en suero de ratón CD1 en ensayo de toxicidad aguda inducida con CCl₄

GRUPO	AST	ALT	LDH
1	3490	5460	30570
1	190	200	4120
1	110	60	4080
1	80	20	2530
1	90	40	2590
1	90	20	2820
2	8100	690	30840
2	6860	6610	37810
2	14330	18080	35540
2	7090	12170	63100
2	8170	12810	44890
2	6830	7880	31350
3	6040	5670	46840
3	12740	10560	46830
3	3550	3520	20850
3	9920	8800	32360
3	11320	14340	57190
3	8714	8578	40814
4	9070	7660	27310
4	6920	8960	37600
4	6270	7660	26080
4	14390	17730	70070
4	8900	16160	56990
4	10340	12380	56900
5	6070	7540	33430
5	980	1300	10590
5	6070	5500	27650
5	9870	7700	34430
5	6050	4790	20800
5	8380	14630	53720
6	7680	12020	3980
6	10470	13480	55720
6	9480	8240	41720
6	3990	5480	20130
6	11560	14070	46530
6	8636	10658	33616

Tabla 5. Resultados de las muestras sanguíneas analizadas por medio del equipo automatizado ILAB 650 Clinical Chemistry. Se determinaron las enzimas: AST, ALT y LDH unidades / litro (U/L) de cada grupo.

10.5 Resultados del análisis estadístico del ensayo de toxicidad aguda con CCl₄ comparado con los diferentes grupos del ensayo

Con los valores obtenidos en la tabla 5 se obtuvieron las medias de cada grupo, en el programa IBM SPSS 23 para el análisis estadístico.

Hipótesis nula: No existen diferencias significativas $p > 0.05$ entre grupos

Hipótesis alterna: Existen diferencias significativas $p = < 0.05$ entre grupos

10.5.1 Tabla 6. Prueba de análisis de varianza ANOVA para los valores enzimáticos AST, ALT y LDH de los diferentes grupos estudiados

ANOVA						
		Suma de cuadrados	df	Mean Square	F	Sig.
AST	Inter grupos	324015385.333	5	64803077.067	8.373	.000
	Intra grupos	232178406.667	30	7739280.222		
	Total	556193792.000	35			
ALT	Inter grupos	450222539.222	5	90044507.844	5.145	.002
	Intra grupos	525044910.000	30	17501497.000		
	Total	975267449.222	35			
LDH	Inter grupos	5565594959.222	5	1113118991.844	5.020	.002
	Intra grupos	6652666756.667	30	221755558.556		
	Total	12218261715.88	35			
		9				

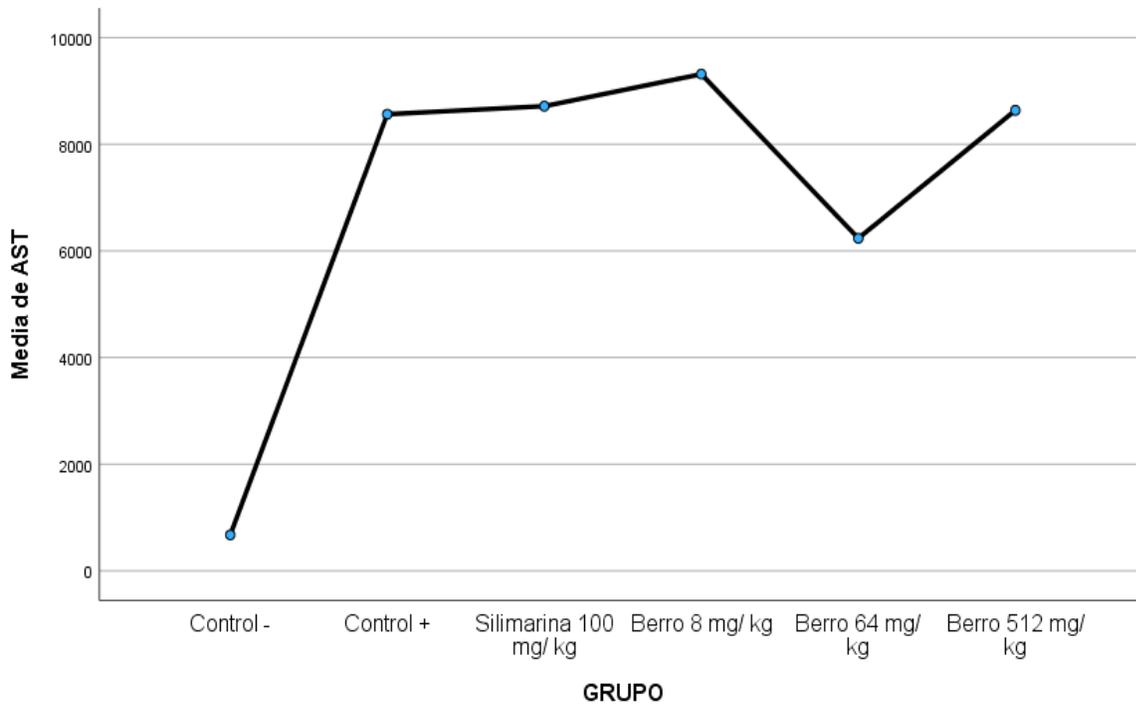
Se obtuvieron valores con un $P = < 0.05$ lo que quiere decir que existen diferencias significativas entre los grupos de enzimas AST, ALT y LDH. Se acepta la hipótesis alterna. Se realiza la prueba de Tukey para observar diferencias entre grupos.

10.5.2 Tabla 7. Prueba de Tukey para la comparación de medias de la enzima AST comparados con los diferentes grupos del ensayo

AST			
Tukey HSD ^a			
GRUPO	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Control -	6	675.00	
Berro 64 mg/ kg	6		6236.67
Control +	6		8563.33
Berro 512 mg/ kg	6		8636.00
Silimarina 100 mg/ kg	6		8714.00
Berro 8 mg/ kg	6		9315.00
Sig.		1.000	.412
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.			
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6.000.			

Para la enzima aspartato aminotransferasa (AST) del análisis se obtuvieron dos subconjuntos. En el subconjunto 1 se encuentran el grupo control negativo, este era el grupo que solo se mantuvo con alimento y agua hasta su sacrificio el día 10 del experimento. El subconjunto 2 se encuentran los demás grupos, con un $p=0.412$ no muestran diferencias significativas entre ellos.

10.5.3 Gráfico 4. Media enzimática de AST comparado con los diferentes grupos del ensayo



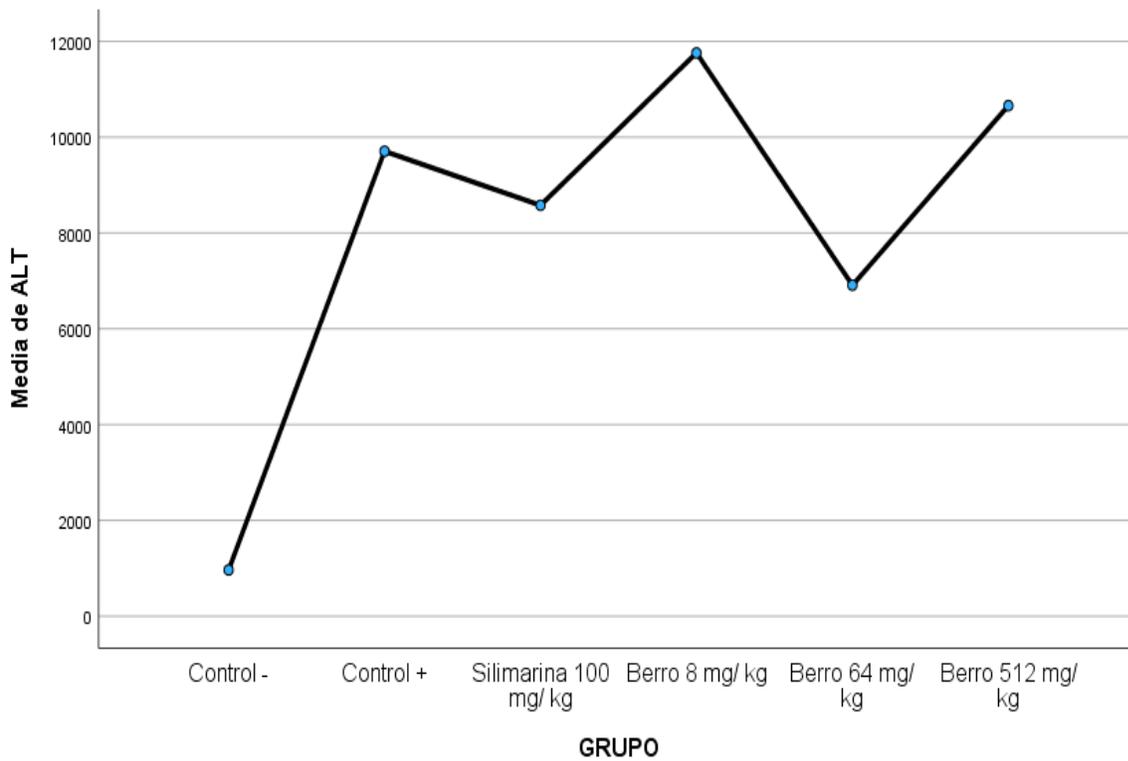
En el gráfico podemos de medias de la enzima AST comparado con los diferentes grupos podemos observar que la mayoría de los valores de los diferentes grupos se encuentran entre 8,000 y 10,000 U/L. El berro a una concentración de 64 mg/kg se encuentra en los 6,000 U/L.

10.5.4 Tabla 8. Prueba de Tukey para la comparación de medias de la enzima ALT comparados con los diferentes grupos del ensayo

ALT			
Tukey HSD ^a			
GRUPO	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Control -	6	966.67	
Berro 64 mg/ kg	6	6910.00	6910.00
Silimarina 100 mg/ kg	6		8578.00
Control +	6		9706.67
Berro 512 mg/ kg	6		10658.00
Berro 8 mg/ kg	6		11758.33
Sig.		.168	.362
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.			
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6.000.			

Para la ALT se tiene dos subconjuntos, en el primero se encuentra el control negativo y el extracto berro a 64 mg/kg, con un valor $p = 0.168$ lo cual indica que no existe una diferencia significativa entre estos. Para el subgrupo 2 podemos observar un valor $p = 0.362$ que tampoco arroja una diferencia significativa entre los demás grupos.

10.5.5 Gráfico 5. Media enzimática de ALT comparado con los diferentes grupos de ensayo



En el gráfico podemos observar que si existen diferencias entre las medias de los diferentes grupos tratados. El control positivo y la silimarina se encuentran entre 8,000 a 10,000 U/L. El berro a 8 y 512 mg/kg se encuentran en el rango 10,000 y 12,000 U/L. El berro a 64 mg/kg está en los 7,000 U/L.

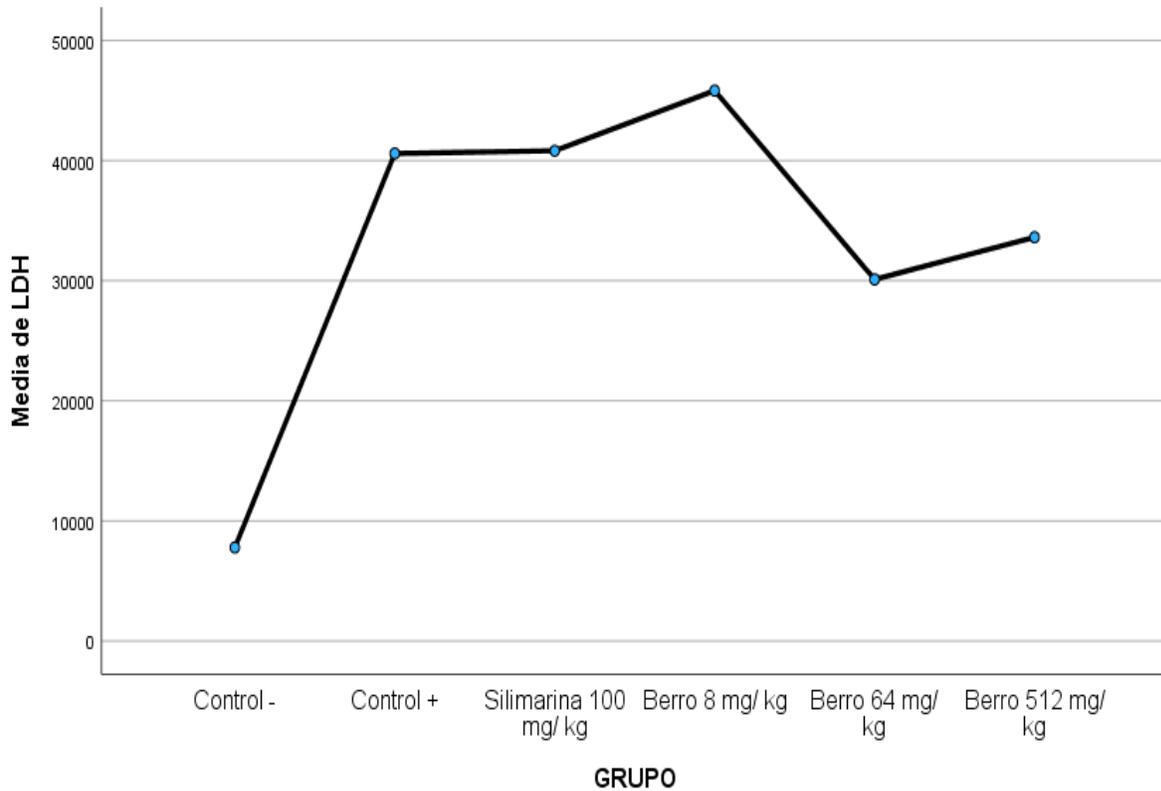
10.5.6 Tabla 9. Prueba de Tukey para la comparación de medias de la enzima LDH comparados con los diferentes grupos del ensayo

LDH			
Tukey HSD ^a			
GRUPO	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Control -	6	7785.00	
Berro 64 mg/ kg	6	30103.33	30103.33
Berro 512 mg/ kg	6	33616.00	33616.00
Control +	6		40588.33
Silimarina 100 mg/ kg	6		40814.00
Berro 8 mg/ kg	6		45825.00
Sig.		.054	.464
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.			
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6.000.			

Para la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) se obtuvieron dos subconjuntos. Para el primer subconjunto se encuentra el control negativo, el berro a 64 mg/kg y a 512 mg/kg con un valor $p=0.054$, y este es mayor a 0.05 confirmando que no existe diferencia significativa entre estos grupos.

Para el subgrupo 2 encontramos un valor $p=0.464$ que nos indica que no existe una diferencia significativa entre los demás grupos tratados.

10.5.7 Gráfico 6. Media enzimática de LDH comparado con los diferentes grupos de ensayo



En el gráfico 6. podemos observar que los grupos control positivo, silimarina 100 mg/kg y berro a 8 mg/kg tienen una media muy parecida entre 4,000 y 5,000 U/L. Para el berro a 64 y a 512 mg/kg se encuentra por debajo entre 3,000 y 3,500 U/L.

11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El berro (*Nasturtium Officinale*) es una planta que se encuentra dentro de la gastronomía mexicana en diversos platillos, también es utilizada como remedio herbolario desde tiempos prehispánicos por diferentes culturas, se utiliza empíricamente para aliviar dolores de cabeza, de riñones, para proteger el corazón, como antiinflamatorio, para limpiar las vías biliares y como hepatoprotector.

Para estudiar el efecto hepatoprotector del berro se planteó un modelo experimental de cirrosis hepática aguda inducida en ratones macho CD1 usando CCl₄ como agente inductor, el CCl₄ es muy utilizado experimentalmente para inducir cirrosis hepática ya que se metaboliza en el hígado produciendo una lipoperoxidación lipídica, su efecto directo es la destrucción de la membrana celular y el efecto secundario es la pérdida de las enzimas asociadas a la membrana como: AST, ALT y LDH¹⁹.

De acuerdo con los objetivos planteados en este proyecto esta discusión de resultados estará enfocada en tres aspectos: a) La determinación de la DL₅₀ del CCl₄ en ratones macho CD1 b) La obtención de un extracto acuoso de berro a presión reducida c) El estudio del efecto hepatoprotector del extracto de berro contra la cirrosis aguda inducida con el CCl₄ como agente inductor.

a) Con base a los resultados obtenidos se calculó la DL₅₀ del CCl₄ por el método de Lorke¹⁷ en una población de 15 ratones macho divididos en grupos de 3 como se muestra en la tabla 3, la DL₅₀ para el CCl₄ calculada es de 10.393 mL/kg. Según Scholtem³⁰: “en diversos estudios toxicológicos realizados en ratas han demostrado que la dosis letal después de la administración oral aguda para el CCl₄ está en el rango de 4,7 a 14,7 mL/kg de peso corporal, según las condiciones nutricionales y los suplementos administrados”, en nuestro ensayo la DL₅₀ que se encontró para los ratones macho CD1 se encuentra dentro del rango realizado en ratas reportado por Scholtem³⁰. La mayoría de los modelos toxicológicos de cirrosis aguda se realizan por vía intraperitoneal (IP) debido a que la mayoría de los investigadores prefieren esta vía por su excelente reproducibilidad, buenas tasas de supervivencia, facilidad de ejecución

y seguridad³¹. Debido a esto, hay muy poca información disponible en modelos experimentales de ratones macho CD1 por la vía oral debido a la dificultad al momento de administrar y su alta mortalidad asociada a fallos en la administración. La DL₅₀ del CCl₄ se ve afectada por el sexo, factores genéticos dependientes de la cepa, vía de administración y la duración e intervalos³⁰.

En complemento a la determinación de la DL₅₀ del CCl₄ en el grupo de 15 ratones macho se cuantificaron los marcadores enzimáticos asociados a la destrucción lipídica de la membrana de los hepatocitos (AST, ALT y LDH) causada por la administración del CCl₄ cuyos valores se muestran en la tabla 4, con estos valores se realizó un análisis de varianza ANOVA para comparar las medias de las dosis administradas de CCl₄ contra los diferentes marcadores enzimáticos.

Para la enzima AST podemos observar en el gráfico 1 que tiene un pico máximo en la dosis de 9 mL/kg de CCl₄ este aumento se justifica según Pagana¹² “el aumento de las concentraciones de AST su relación es directamente proporcional al daño generado, la AST se encuentra en concentraciones muy elevadas dentro de tejidos altamente metabólicos, como el músculo cardíaco, células hepáticas, células musculoesqueléticas en menor grado, riñones y páncreas”, por lo cual podemos asegurar que en la dosis de 9 mL/kg existe daño hepático agudo debido a la elevación de la enzima AST.

Para la enzima ALT en el gráfico 2 se observa un pico máximo en la dosis de 9 mL/kg de CCl₄ este aumento según Fuentes¹²: “el aumento de ALT está relacionado con lesiones o enfermedades que afectan el parénquima hepático ya que esta enzima se encuentra predominantemente en hígado, en menores cantidades en riñones, corazón y músculo esquelético, los aumentos en sangre de la ALT es consecuencia de disfunción hepática o cirrosis” por lo tanto la medición de esta enzima es muy específica de daño a nivel hepático causado por la administración del CCl₄.

Para la enzima LDH en el gráfico 3 se observa que tiene un pico máximo en la dosis de 1 mL/kg de CCl₄, la LDH tuvo un aumento a una dosis menor de CCl₄ en comparación con las enzimas AST y ALT esto debido a que según Pagana¹²: “la LDH se encuentra en órganos como los riñones, cerebro, hígado, musculo esquelético, no es marcador específico de alguna enfermedad o daño de un órgano y por esto se le considera un marcador inespecífico de inflamación a en diferentes tejidos”, por lo tanto su elevación es indicativo de inflamación provocada por la administración de CCl₄ no solo en células hepáticas, si no en diferentes órganos y tejidos; por esta razón se cuantifico una mayor concentración de LDH a una concentración de 1 mL/kg de CCl₄ esto comparado con la ALT y LDH.

Con la determinación de la DL₅₀ y la cuantificación de los marcadores enzimáticos AST, ALT, y LDH se encontró que la dosis de 9 mL/kg de CCl₄ es en la cual existe una mayor inflamación aguda en hígado sin matar a la población de ratones, esto causado porque el 80% del tetracloruro de carbono se metaboliza en hígado y daña las células hepáticas por medio de la lipoperoxidación de las membranas celulares liberando enzimas citosólicas que son directamente proporcional al daño producido, estimula los procesos degradativos de proteínas y fosfolípidos de las membranas celulares, que llevan a la muerte celular y luego a la necrosis³³. Con base a estos resultados y su análisis, la dosis de 9 mL/kg de CCl₄ proporción (1:2) con aceite de oliva es la que se utilizó experimentalmente para inducir daño hepático agudo en ratones CD1.

B) En la obtención del extracto del berro se obtuvo un rendimiento experimental del 30.89%, se mantuvo a una temperatura de 60 °C y presión constante, para evitar que se desnaturalizaran o volatilizaran la mayoría de los compuestos con efectos fitoquímicos reportados por klimek et al.⁷ “el berro contiene glucosinolatos, isotiocianatos, polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos), terpenos (incluidos carotenoides), vitaminas (B1, B2, B3, B6, E, C) y otros bioelementos; estos compuestos han demostrado en recientes investigaciones que el berro tiene capacidad como: antioxidante, anticancerígeno, antibacteriano, antiinflamatorio, hipoglucemiante y protector cardíaco”.

A la temperatura de 60 °C a presión constante se mantienen los diversos compuestos encontrados por Mostafazadeh³⁴ que tienen efecto antiinflamatorio, con la referencia de estas evidencias se utilizaron las mismas condiciones para obtener el extracto acuoso de berro en este experimento.

C) Con la dosis conocida de 9 mL/kg del CCl₄ y el extracto acuoso del berro obtenido se realizó el modelo experimental para estudiar si el berro tiene efecto hepatoprotector, para ello se cuantificaron los marcadores enzimáticos AST, ALT y LDH mostrados en la tabla 6 con estos resultados se realizó un análisis de varianza ANOVA al 95% de confianza entre los diferentes grupos con un $P < 0.05$ y se realizó la prueba de Tukey para observar si existían diferencias significativas entre los grupos y las enzimas AST, ALT y LDH a continuación se describen y analizan los resultados obtenidos de cada una.

Para la enzima aspartato aminotransferasa (AST) en la tabla 7 se muestran los valores de la prueba de Tukey con la comparación de los diferentes grupos tratados y se muestran dos subconjuntos. En el subconjunto 1 se encuentran el grupo de control negativo, este grupo se mantuvo con agua y alimento a libre demanda hasta décimo día del experimento y su posterior sacrificio. El subconjunto 2 se encuentran los demás grupos con un $p = 0.412$ este valor nos indica que no existen diferencias significativas entre los otros grupos de estudio. En el gráfico 4 se observa una disminución de los valores promedio en la dosis de 64 mg/kg en comparación con los diferentes grupos tratados, pero a ninguna de las concentraciones tratadas de berro a 12, 64 y 512 mg/kg logró ser estadísticamente significativa $p < 0.05$ para ser considerada como protector hepático ya que la AST es una enzima indicadora que se utiliza en el diagnóstico de enfermedades hepáticas, cardíacas e inflamaciones de diversos órganos y participa en muchos procesos metabólicos, y el berro no logró inhibir el daño provocado por la administración aguda del CCl₄.

Para la enzima alanina aminotransferasa (ALT) en la tabla 8 se muestran los valores de la comparación de medias con los diferentes grupos de estudio, se obtuvieron dos subconjuntos. En el subconjunto 1 se encuentra el control negativo y el extracto berro a 64 mg/kg con un valor $p= 0.168$ esto nos indica que no existe una diferencia significativa entre el grupo control negativo y el extracto de berro a 64 mg/kg. Para el subconjunto 2 donde se encuentran todos los demás grupos con un valor $p= 0.362$ nos indica que no existe una diferencia significativa estos. En el gráfico 5 se observa que el berro a 64 mg/kg obtuvo una disminución en los valores promedios enzimáticos de ALT en comparación con los otros grupos, esto puede deberse a los metabolitos secundarios que contiene el berro como los glucosinolatos, isotiocianatos y compuestos fenólicos^{7,8} que se sabe que tienen efecto antiinflamatorio³⁰, los valores promedio del berro a una concentración de 64 mg/kg no tuvieron $p\leq 0.05$ para ser considerados que él tiene actividad protectora hepática, ya que el aumento de la ALT es un marcador muy específico inflamación hepática, también indica que el hígado se encuentra lesionado o irritado y estas enzimas escapan de los hepatocitos hacia el torrente sanguíneo¹³ donde son cuantificadas.

Para la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en la tabla 9 se obtuvieron dos subconjuntos, en el primero se encuentran los grupos control negativo, el berro a 64 mg/kg y el berro a 512 mg/kg con un valor $p=0.054$ lo cual es mayor a 0.05, aunque está muy cercano al 0.05 se considera que no es estadísticamente significativa $p\leq 0.05$ para decir que obtuvo una protección a nivel hepático, se observa que disminuyó los valores enzimáticos promedio como podemos observar en el gráfico 6 a las concentraciones 64 y 512 mg/kg y estas se encuentran por debajo del estándar de silimarina a 100 mg/kg, esta disminución se puede comparar con los datos obtenidos por Heibatollah³⁰ encontró que el berro tiene capacidad potencial como antiinflamatorio a las concentraciones de 250, 500 y 750 mg/kg lo que justificaría esta disminución en la LDH ya que es un marcador inespecífico de inflamación en diferentes órganos causada por la administración aguda del CCl_4 .

Para el subconjunto 2 como se muestra en la tabla 9 encontramos que los demás grupos tratados tienen un valor $p=0.464$ esto nos indica que no existe una diferencia significativa entre los demás grupos tratados, por lo tanto, no se obtuvo una protección a nivel hepático.

La silimarina a 100 mg/kg no tuvo un efecto en la protección del hígado frente a la dosis de 9 mL/kg de CCl_4 administrada, en diferentes investigaciones se ha informado que la silimarina promueve el glutatión intracelular lo que previene la lipoperoxidación de las membranas su actividad hepatoprotectora y antioxidante se debe a su capacidad de inhibir radicales libres que se producen a partir del metabolismo de sustancias tóxicas como el tetracloruro de carbono²¹. Clichici et al.³⁴ encontró que: “la silimarina en dosis de 200 mg/peso corporal tenía un efecto hepatoprotector en ratas Wistar contra una dosis de 1.2 mL/kg CCl_4 administrado durante 8 semanas”, en nuestro experimento que la silimarina no tuviera el efecto hepatoprotector deseado pudo deberse a que la dosis de 100 mg/kg no pudo proteger al hígado contra la administración agua de CCl_4 a una dosis de 9 mL/kg de CCl_4 que provocó una inflamación y fibrosis en el hígado de la cual no se pudo recuperar²⁰.

12. CONCLUSIONES

1. La DL_{50} del CCl_4 es de 10.393 mL/kg de peso corporal por el método de Lorke en ratones macho CD1 proporción (1:2) con aceite de oliva por vía oral.
2. El tetracloruro de carbono demostró ser un agente muy eficaz para inducir cirrosis hepática aguda a una concentración de 9 mL/kg de peso corporal en ratones macho CD1 proporción (1:2) con aceite de oliva por vía oral.
3. Se realizó el extracto acuoso de berro a presión reducida y temperatura constante.
4. El extracto acuoso de berro no tuvo efecto hepatoprotector en las concentraciones de 8, 64 y 512 mg/kg contra la administración aguda de CCl_4 a una concentración de 9 mL/kg en ratones macho CD1 proporción (1:2) con aceite de oliva por vía oral.
5. La silimarina a 100 mg/kg no mostró un efecto hepatoprotector en ratones macho CD1 contra la dosis administrada de 9 mL/kg de CCl_4 en ratones macho CD1 (1:2) con aceite de oliva proporción por vía oral.

13. PERSPECTIVAS

Se sugiere para el siguiente estudio una dosis de extracto acuoso de berro entre 64 y 512 mg/kg comparado con una dosis de silimarina de 200 mg/kg como estándar de referencia y una dosis de CCl₄ menor a 9 mL/kg como agente para inducir daño hepático.

14. REFERENCIAS

1. NORMA Oficial Mexicana NOM-248-SSA1-2011 [Internet]. Buenas prácticas de fabricación para establecimientos dedicados a la fabricación de remedios herbolarios. Diario Oficial de la Federación. 28 abril 2009 [citado 2022 Mar 16]. Disponible en: <http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4676/salud/salud.htm#:~:text=NORMA%20Oficial%20Mexicana%20NOM%2D248,la%20fabricaci%C3%B3n%20de%20remedios%20herbolarios>
2. ESTADÍSTICA DE DEFUNCIONES REGISTRADAS DE ENERO A JUNIO DE 2022 (PRELIMINAR). [Internet]. 2022; [citado 2022 Mar 16]. Disponible en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2022/EDR/EDR2022_08.pdf
3. UNAM. *Rorippa nasturtium aquaticum* ficha informativa [Internet]. Heike Vibrans; 2009. [citado 2022 Mar 16]. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/brassicaceae/rorippa-nasturtium-aquaticum/fichas/ficha.htm>
4. UNAM. Términos Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana: Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana [Internet]. 2009 [citado 2022 Mar 16]. Available from: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=berro>
5. Br. R. Lista de Especies de Galapagos [Internet]. Fundación Charles Darwin; 2009. [citado el 4 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.darwinfoundation.org/es/datazone/checklist?species=1991>
6. Wilhem T. Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. Gera, Germany: Verter band; 1885. 25 p.
7. Klimek SM, Szopa A, Ekiert H. Chemical composition, traditional and professional use in medicine, application in environmental protection, position in food and cosmetics industries, and biotechnological studies of *Nasturtium officinale* (watercress) - a review. *Fitoterapia* [Internet]. 2018 [citado el 31 de mayo de 2022]; 129:283–92. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29852261/>.
8. Halkier BA, Gershenzon J. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu Rev Plant Biol.* [Internet]. 2018 [citado el 31 de mayo de 2022]; 2006; 57:303-33. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16669764/>
9. Tortora GJ, Derrickson B. Principios de anatomía y fisiología. 15ª. ed. México: Editorial panamericana médica; 2013. 990-994 p.

10. Mehta P, Reddivari AKR. Hepatitis. [actualizado 2022 Oct 24]. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; [citado el 4 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554549/>
11. Velarde JA, Higuera MF, Castro GE, Zamarripa F, Abdo JM, Aiza I, et al. Consenso Mexicano de hepatitis alcohólica. Rev Gastroenterol Méx (Engl Ed) [Internet]. 2020 [citado el 4 de enero de 2023];85(3):332–53 p. Disponible en: <http://www.revistagastroenterologiamexico.org/es-consenso-mexicano-hepatitis-alcoholica-articulo-S0375090620300483>
12. Pagana K. Laboratorio Clínico indicaciones e interpretación de resultados. 5ª. ed. México: Manual moderno; 2015. 226-237 p.
13. Fuentes AX, Castiñeiras MJ, Queralto JM, Bioquímica clínica y patología molecular. 2ª. ed. México: Reverté;1998. 867,868 p.
14. Gilbert SG. A Small Dose of Toxicology. 2ª.ed. Seattle, WA: HealthyWorldPress; 2012. 11-14 p.
15. Bello GJ, Cerain SAL. Fundamentos de toxicología. Madrid: Diaz de Santos; 2001. 25-45 p.
16. Mendoza PN. Farmacología Médica. México: Médica panamericana;2008. 212-218 p.
17. Navarro GE, Ávila IJA, Mollinedo PP, Vila CJL, Ruiz PG. VALORACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA IN VIVO DEL ÁCIDO ÚSNICO. Rev. Bol. Quim [Internet]. 2010 Dic [citado 2023 Mar 16]; 27(2): 89-93. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602010000200003
18. Lorke D. A new approach to practical acute toxicity testing. Arch Toxicol. 1983 Dec;54(4):275-87.
19. Favari L, Díaz A, Ortiz C, Pablo PJ, Saudy. Efectos hepatoprotector y antioxidante de *Taraxacum officinale* en el daño hepático agudo inducido por el tetracloruro de carbono en la rata. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*. 2013; 44(4): 53-61.
20. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR); 2005. Reseña Toxicológica del Tetracloruro de carbono (versión actualizada) (en inglés). [citado el 4 de enero de 2023]. Disponible en: https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts30.html#bookmark10
21. Vargas N, Madrigal E, Morales A, Esquivel J, Esquivel C, García M, et al. Hepatoprotective effect of silymarin. World J Hepatol [Internet]. 2014 [citado el 13 de septiembre de 2022];6(3):144–9 p. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4254/wjh.v6.i3.144>

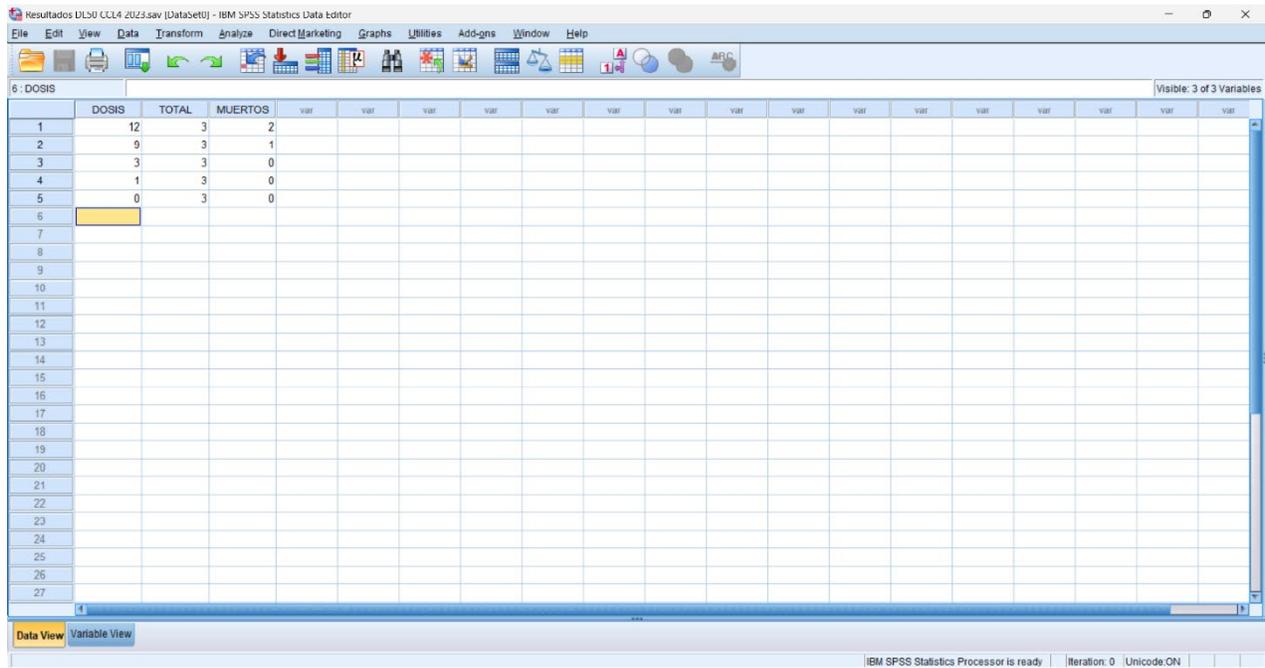
22. Johnson M. Ratones y ratas de laboratorio [Internet]. Princeton, Nueva Jersey, Estados Unidos: SynatomResearch [Consultado 19 agosto 2020]. Disponible en: <https://www.labome.com/method/Laboratory-Mice-and-Rats.html>
23. Ramírez D. Animales de experimentación [Internet] México: UAEH [Consultado 18 de marzo de 2020]. Disponible en: https://www.uaeh.edu.mx/bioterio/animales_expe.html
24. Baligar NS, Aladakatti RH, Ahmed M, Hiremath MB. Hepatoprotective activity of the neem-based constituent azadirachtin-A in carbon tetrachloride intoxicated Wistar rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2014 Apr;92(4):267-77 p. doi: 10.1139/cjpp-2013-0449.
25. Porras N, Zeidán Q, Strauss M, Anselmi G. Valores Séricos de Marcadores Hepáticos en Ratas: Aporte de un Patrón de Referencia. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. 2002; 21(2): 201-204 p.
27. Berlanga J, Caballero ME, Ramirez D, Torres A, Valenzuela C, Lodos J, Playford R. Epidermal growth factor protects against carbon tetrachloride induced hepatic injury. *Clinical Science*. 1998; 94: 219-223 p.
28. IBM Corp. Lanzado en 2017. IBM SPSS Statistics para Windows, Versión 21.0. Armonk, Nueva York: IBM Corp.
29. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1991 [Internet]. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación. 6 de diciembre de 1999. [citado 2022 Mar 16]. Disponible en: <https://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>
30. Heibatollah S, Mostafa M, Hossein S, Moslem N, Mehrzad Jafari Barmak. (2014) *In vivo* anti-inflammatory properties of aerial parts of *Nasturtium officinale*, *Pharmaceutical Biology*, 52:2, 169-174 p. DOI: [10.3109/13880209.2013.821138](https://doi.org/10.3109/13880209.2013.821138)
31. Scholten D, Trebicka J, Liedtke C, Weiskirchen R. The carbon tetrachloride model in mice. *Lab Anim*. 2015 Apr;49(1 Suppl):4-11. doi: 10.1177/0023677215571192. PMID: 25835733.
32. McLean EK, McLean AE, Sutton PM. Cirrosis instantánea. Un método mejorado para producir cirrosis hepática en ratas mediante la administración simultánea de tetracloruro de carbono y fenobarbital. *Br. J. Exp. Pathol* 1969; 50: 502–506 p.

34.- Mostafazadeh M, Sadeghi H, Sadeghi H, Zarezade V, Hadinia A, Panahi Kokhdan E. Further evidence to support acute and chronic anti-inflammatory effects of *Nasturtium officinale*. Res Pharm Sci. 2022 Apr 18;17(3):305-314. doi: 10.4103/1735-5362.343084. PMID: 35531133; PMCID: PMC9075025.

35.- Otto-Ślusarczyk D, Graboń W, Mielczarek-Puta M. Aminotransferaza asparaginianowa--kluczowy enzym w metabolizmie ogólnoustrojowym człowieka [Aspartate aminotransferase--key enzyme in the human systemic metabolism]. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2016 Mar 16; 70:219-30. Polish. doi: 10.5604/17322693.1197373. PMID: 27117097.

36.- Clichici S, Olteanu D, Filip A, Nagy AL, Oros A, Mircea PA. Beneficial Effects of Silymarin After the Discontinuation of CCl4-Induced Liver Fibrosis. J Med Food. 2016 Aug;19(8):789-97. doi: 10.1089/jmf.2015.0104. Epub 2016 Jul 21. PMID: 27441792.

ANEXO I. BASE DE DATOS DL₅₀ CCl₄ CON EL PROGRAMA IBM SPSS 23



Resultados DL50 CCl4 2023.sav [DataSet0] - IBM SPSS Statistics Data Editor

File Edit View Data Transform Analyze Direct Marketing Graphs Utilities Add-ons Window Help

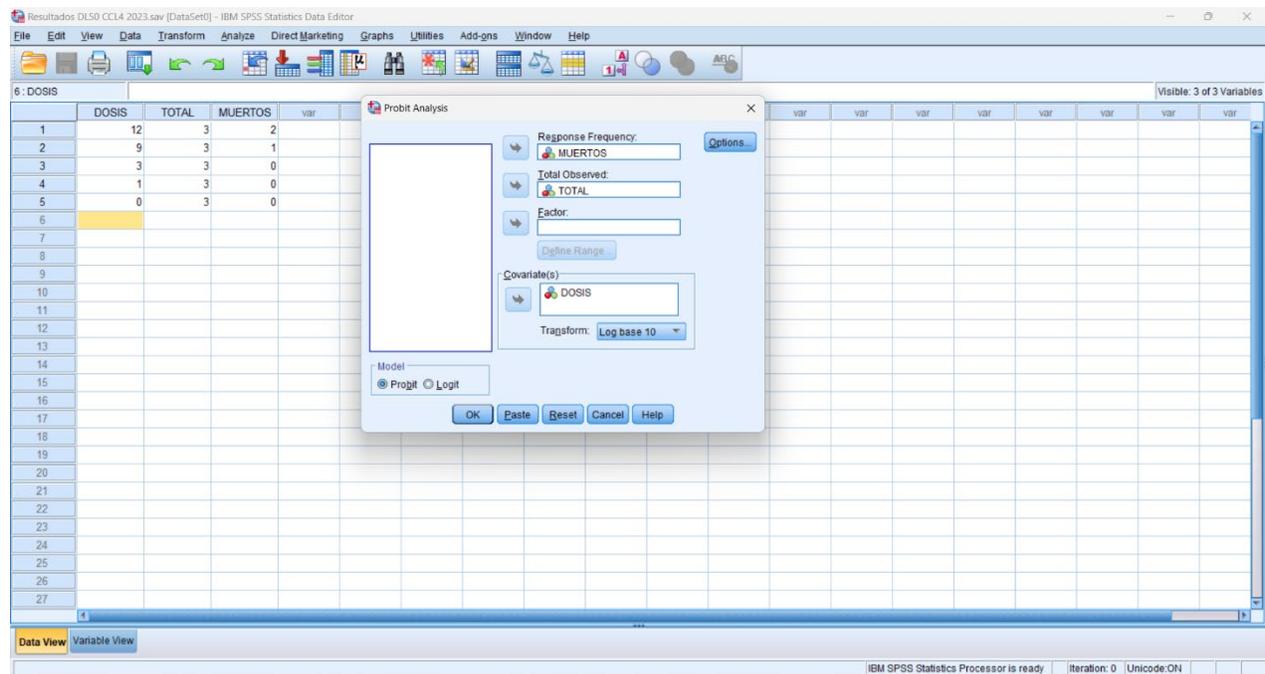
6: DOSIS Visible: 3 of 3 Variables

	DOSIS	TOTAL	MUERTOS	var															
1	12	3	2																
2	9	3	1																
3	3	3	0																
4	1	3	0																
5	0	3	0																
6																			
7																			
8																			
9																			
10																			
11																			
12																			
13																			
14																			
15																			
16																			
17																			
18																			
19																			
20																			
21																			
22																			
23																			
24																			
25																			
26																			
27																			

Data View Variable View

IBM SPSS Statistics Processor is ready | Iteration: 0 | Unicode: ON

IMAGEN 8. BASE DE DATOS PROGRAMA IBM SPSS.



Resultados DL50 CCl4 2023.sav [DataSet0] - IBM SPSS Statistics Data Editor

File Edit View Data Transform Analyze Direct Marketing Graphs Utilities Add-ons Window Help

6: DOSIS Visible: 3 of 3 Variables

	DOSIS	TOTAL	MUERTOS	var															
1	12	3	2																
2	9	3	1																
3	3	3	0																
4	1	3	0																
5	0	3	0																
6																			
7																			
8																			
9																			
10																			
11																			
12																			
13																			
14																			
15																			
16																			
17																			
18																			
19																			
20																			
21																			
22																			
23																			
24																			
25																			
26																			
27																			

Data View Variable View

IBM SPSS Statistics Processor is ready | Iteration: 0 | Unicode: ON

Probit Analysis

Response Frequency: MUERTOS

Total Observed: TOTAL

Factor:

Covariate(s): DOSIS

Transform: Log base 10

Model: Probit Logit

OK Paste Reset Cancel Help

IMAGEN 9. DEFINICIÓN VARIABLES PROGRAMA IBM SPSS.

ANEXO II. TABLA DE DL₅₀ DE CCl₄ CALCULADA POR MODELO PROBIT

Límites de confianza							
Probabilidad		95% límites de confianza para DOSIS			95% límites de confianza para log(DOSIS) ^a		
		Estimado	Límite inferior	Límite superior	Estimado	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	.010	4.802			.681		
	.020	5.257			.721		
	.030	5.567			.746		
	.040	5.813			.764		
	.050	6.021			.780		
	.060	6.203			.793		
	.070	6.368			.804		
	.080	6.519			.814		
	.090	6.660			.823		
	.100	6.792			.832		
	.150	7.368			.867		
	.200	7.860			.895		
	.250	8.309			.920		
	.300	8.733			.941		
	.350	9.146			.961		
	.400	9.555			.980		
	.450	9.969			.999		
		.500	10.393			1.017	
		.550	10.836			1.035	
		.600	11.305			1.053	
		.650	11.811			1.072	
		.700	12.369			1.092	
		.750	13.001			1.114	
		.800	13.743			1.138	
		.850	14.661			1.166	
		.900	15.904			1.201	
		.910	16.219			1.210	
	.920	16.569			1.219		
	.930	16.963			1.229		
	.940	17.413			1.241		
	.950	17.942			1.254		
	.960	18.583			1.269		
	.970	19.403			1.288		
	.980	20.550			1.313		
	.990	22.496			1.352		

a. Logaritmo base = 10.

ANEXO III. BASE DE DATOS DEL METODO EXPERIMENTAL EN EL PROGRAMA IBM SPSS 23

base de datos enzimas tesis.sav [DataSet1] - IBM SPSS Statistics Data Editor

	GRUPO	AST	ALT	LDH	VAR													
1	1	3490	5460	30570														
2	1	190	200	4120														
3	1	110	60	4080														
4	1	80	20	2530														
5	1	90	40	2590														
6	1	90	20	2820														
7	2	8100	690	30840														
8	2	6860	6610	37810														
9	2	14330	18080	35540														
10	2	7090	12170	63100														
11	2	8170	12810	44890														
12	2	6830	7880	31350														
13	3	6040	5670	46840														
14	3	12740	10560	46830														
15	3	3550	3520	20850														
16	3	9920	8800	32360														
17	3	11320	14340	57190														
18	3	8714	8578	40814														
19	4	9070	7660	27310														
20	4	6920	8960	37600														
21	4	6270	7660	26080														
22	4	14390	17730	70070														
23	4	8900	16160	56990														
24	4	10340	12380	56900														
25	5	6070	7540	33430														
26	5	980	1300	10590														
27	5	6070	5500	27650														

IMAGEN 10. BASE DE DATOS MÉTODO EXPERIMENTAL PROGRAMA IBM SPSS.

base de datos enzimas tesis.sav [DataSet1] - IBM SPSS Statistics Data Editor

	GRUPO	AST	ALT	LDH	VAR													
1	1	3490	5460	30570														
2	1	190	200	4120														
3	1	110	60	4080														
4	1	80	20	2530														
5	1	90	40	2590														
6	1	90	20	2820														
7	2	8100	690	30840														
8	2	6860	6610	37810														
9	2	14330	18080	35540														
10	2	7090	12170	63100														
11	2	8170	12810	44890														
12	2	6830	7880	31350														
13	3	6040	5670	46840														
14	3	12740	10560	46830														
15	3	3550	3520	20850														
16	3	9920	8800	32360														
17	3	11320	14340	57190														
18	3	8714	8578	40814														
19	4	9070	7660	27310														
20	4	6920	8960	37600														
21	4	6270	7660	26080														
22	4	14390	17730	70070														
23	4	8900	16160	56990														
24	4	10340	12380	56900														
25	5	6070	7540	33430														
26	5	980	1300	10590														
27	5	6070	5500	27650														

IMAGEN 11. DEFINICIÓN DE VARIABLES BASE DE DATOS MÉTODO EXPERIMENTAL PROGRAMA IBM SPSS.

ANEXO IV. DOSIS ADMINISTRADAS DE CCl₄

GRUPO	NÚMERO DE RATON	PESO (g)	DOSIS CCL ₄ ADM mL/kg
CONTROL -	1	32	0.21
CONTROL -	2	35	0.23
CONTROL -	3	35	0.23
CONTROL -	4	36	0.24
CONTROL -	5	30	0.2
CONTROL -	6	32	0.21
CONTROL +	1	37	0.24
CONTROL +	2	32	0.21
CONTROL +	3	31	0.2
CONTROL +	4	30	0.2
CONTROL +	5	32	0.21
CONTROL +	6	34	0.22
SILIMARINA 100 mg/kg	1	34	0.22
SILIMARINA 100 mg/kg	2	31	0.2
SILIMARINA 100 mg/kg	3	33	0.22
SILIMARINA 100 mg/kg	4	35	0.23
SILIMARINA 100 mg/kg	5	34	0.22
SILIMARINA 100 mg/kg	6	35	0.23
BERRO 8 mg/kg	1	34	0.22
BERRO 8 mg/kg	2	36	0.24
BERRO 8 mg/kg	3	30	0.2
BERRO 8 mg/kg	4	35	0.23
BERRO 8 mg/kg	5	37	0.24
BERRO 8 mg/kg	6	30	0.2
BERRO 64 mg/kg	1	37	0.24
BERRO 64 mg/kg	2	33	0.22
BERRO 64 mg/kg	3	34	0.2
BERRO 64 mg/kg	4	35	0.23
BERRO 64 mg/kg	5	32	0.21
BERRO 64 mg/kg	6	37	0.24
BERRO 512 mg/kg	1	33	0.22
BERRO 512 mg/kg	2	30	0.2
BERRO 512 mg/kg	3	35	0.23
BERRO 512 mg/kg	4	36	0.24
BERRO 512 mg/kg	5	35	0.23
BERRO 512 mg/kg	6	39	0.26

ANEXO V. IMÁGENES DEL MÉTODO EXPERIMENTAL



IMAGEN 12. RATONES CD1 EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO.



IMAGEN 13. RATONES CD1 GRUPOS DEL 1 AL 3.



IMAGEN 14. RATONES CD1 GRUPOS DEL 4 AL 5.

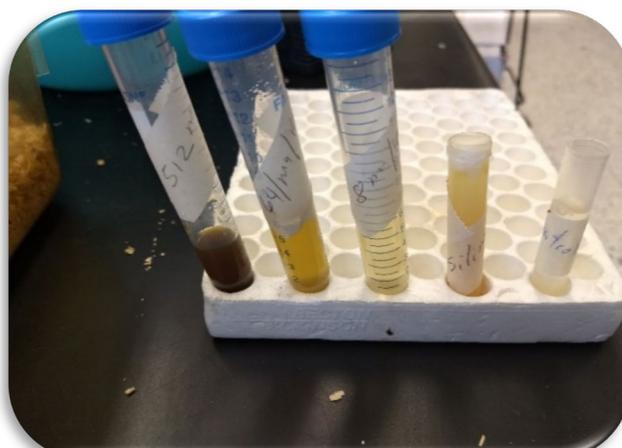


IMAGEN 15. TUBOS FALCON CON LAS DIFERENTES DOSIS A ADMINISTRAR.



IMAGEN 16. RATÓN CD1 EN CÁMARA DE CLOROFORMO.



IMAGEN 17. ADMINISTRACIÓN DOSIS VIA ORAL A RATÓN CD1.



IMAGEN 18. OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUINEAS DE LOS RATONES CD1.

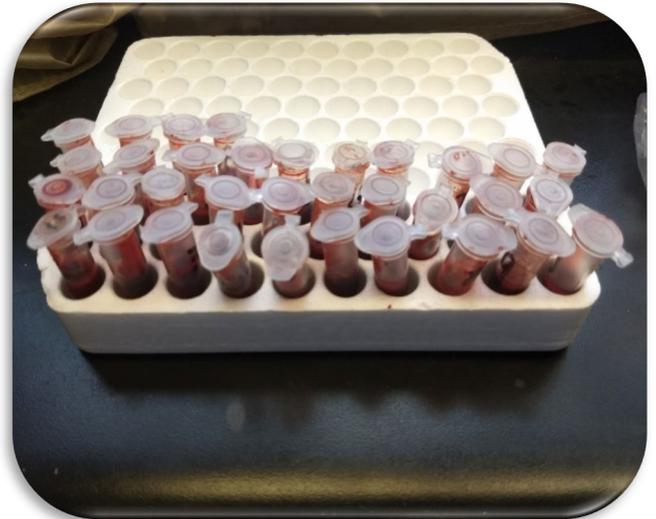


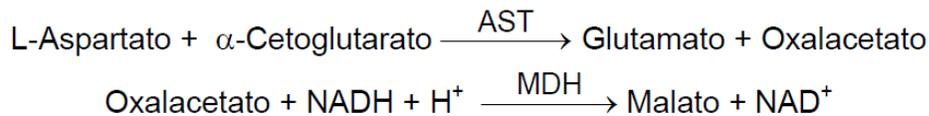
IMAGEN 19. MUESTRAS SANGUINEAS OBTENIDAS.



IMAGEN 20. ANALIZADOR AUTOMATIZADO ILAB 650.

ANEXO VI. FUNDAMENTO DE LAS DETERMINACIONES ENZIMATICAS: AST, ALT y LDH CON EL ANALIZADOR AUTOMATIZADO PARA QUIMICA CLINICA ILAB 650

Fundamento de la determinación cuantitativa de AST: La aspartato aminotransferasa (AST) inicialmente transaminasa glutamato oxaloacética (GOT) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino al α -cetoglutarato con formación de glutamato y oxalacetato. El oxalacetato producido es reducido a malato en presencia de malato deshidrogenasa (MDH) y NADH:



La velocidad de disminución de la absorbancia debido a las oxidación de NADH a NAD⁺ en el medio es proporcional a la concentración catalítica de AST en la muestra ensayada.

REACTIVOS

R 1 Tampón	TRIS pH 7,8	80 mmol/L
	Lactato deshidrogenasa (LDH)	800 U/L
	Malato deshidrogenasa (MDH)	600 U/L
R 2 Substrato	L-Aspartato	200 mmol/L
	NADH	0,18 mmol/L
	α -Cetoglutarato	12 mmol/L

PREPARACIÓN

Reactivo de trabajo (RT):

Mezclar: 1 vol. de (R2) Substrato + 4 vol. (R1) Tampón.

Estabilidad: 21 días a 2-8°C o 72 horas a temperatura ambiente.

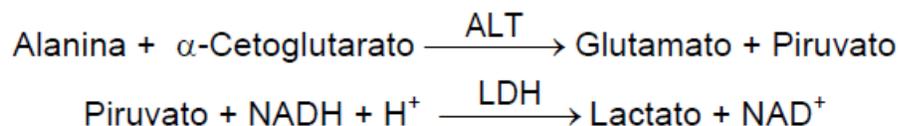
PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
 - Longitud de onda:340 nm
 - Cubeta:..... 1 cm paso de luz
 - Temperatura constante25°C / 30°C / 37°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada o aire.
- Pipetear en una cubeta:

RT (mL)	1,0
Muestra (μ L)	100

- Mezclar, incubar 1 minuto.
- Leer la absorbancia (A) inicial de la muestra, poner en marcha el cronometro y leer la absorbancia cada minuto durante 3 minutos.

Fundamento de la determinación cuantitativa de ALT: La alanina aminotransferasa (ALT) inicialmente llamada transaminasa glutámico-pirúvica (GPT) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al α -cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato. El piruvato producido es reducido a lactato en presencia de lactato deshidrogenasa (LDH) y NADH:



La velocidad de disminución de la absorbancia debido a las oxidación de NADH a NAD⁺ en el medio es proporcional a la concentración catalítica de ALT en la muestra ensayada.

REACTIVOS			PREPARACION
R 1 Tampón	TRIS pH 7,8	100 mmol/L	Reactivo de trabajo (RT): Ref: 1001170 Disolver (→) una tableta de R2 Substrato en un vial de R1.
	L-Alanina	500 mmol/L	
R 2 Substrato	NADH	0,18 mmol/L	Ref: 1001171 Disolver (→) una tableta de R2 Substrato en 15 mL de R1. Tapar y mezclar suavemente hasta disolver su contenido. Estabilidad: 21 días a 2-8°C o 72 horas a temperatura ambiente.
	Lactato deshidrogenasa (LDH)	1200 U/L	
	α -Cetoglutarato	15 mmol/L	

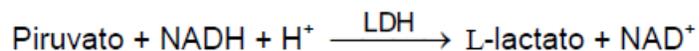
PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
 - Longitud de onda: 340 nm
 - Cubeta: 1 cm paso de luz
 - Temperatura constante 25°C / 30°C / 37°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada o aire.
- Pipetear en una cubeta:

RT (mL)	1,0
Muestra (μ L)	100

- Mezclar, incubar 1 minuto.
- Leer la absorbancia (A) inicial de la muestra, poner en marcha el cronometro y leer la absorbancia cada minuto durante 3 minutos.

Fundamento de la determinación cuantitativa de LDH: La lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la reducción del piruvato por el NADH, según la siguiente reacción:



La velocidad de disminución de la absorbancia debido a la oxidación de NADH a NAD⁺ en el medio es proporcional a la concentración catalítica de ALT en la muestra ensayada.

REACTIVOS

R 1	Imidazol	65 mmol/L
Tampón	Piruvato	0,6mmol/L
R 2	NADH	0,18 mmol/L
Substrato		

PREPARACIÓN

Reactivo de trabajo (RT):

Mezclar: 4 vol. (R1) Tampón + 1 vol. de (R2) Sustrato.

Estabilidad: 15 días a 2-8°C o 5 días a 15-25°C.

PROCEDIMIENTO

1. Condiciones del ensayo:

Longitud de onda: 340 nm

Cubeta: 1 cm paso de luz

Temperatura constante: 25°C / 30°C / 37°C

2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada o aire.

3. Pipetear en una cubeta:

	25° - 30°C	37°C
RT (mL)	3,0	3,0
Muestra (μL)	100	50

4. Mezclar, incubar 1 minuto.

5. Leer la absorbancia (A) inicial de la muestra, poner en marcha el cronometro y leer la absorbancia cada minuto durante 3 minutos.

6. Calcular el promedio de la diferencia de absorbancia por minuto (ΔA/min).