



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

EVALUACIÓN DEL EFECTO HEPATO Y NEFROPROTECTOR DE LOS ÁCIDOS URSÓLICO Y OLEANÓLICO EN RATONES BALB/C CON DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO CON FÁRMACOS ANTITUBERCULOSO

**TESIS**  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS DE PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:  
**MARGARITA LUCERO FRANCO GARCÍA**

TUTORA PRINCIPAL:  
MARÍA ADELINA JIMÉNEZ ARELLANES  
IMSS

COMITÉ TUTOR:  
EDGAR ALFONSECA SILVA  
FMVZ

ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO  
INCMNSZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., ABRIL 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## AGRADECIMIENTOS

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar la maestría, con número de becario 968736.
- A la Dra. Adelina Jiménez Arellanes por ser la directora de esta tesis, que sin ella, ésta no sería posible.
- A la Dra. G. S. Reyes del área de Patología del Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI.
- Al Dr. Rogelio Hernández Pando del área de Patología Experimental del Instituto de Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) por el apoyo en el análisis histológico, por sus observaciones al presente escrito y por ser parte del Comité Tutor.
- Al Dr. Edgar Alfonseca Silva por ser parte del Comité Tutor, por sus comentarios al trabajo, mismos que permitieron enriquecer esta tesis
- Al Dr. Jorge Barrios del INCMNSZ, por su ayuda en el procesamiento de los cortes histológicos de los últimos dos ensayos.
- A mis compañeros de la Unidad de Investigación Médica en Farmacología.

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	II
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VII
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Tuberculosis.....	1
1.2 Tratamiento contra TB.....	4
1.2.1 INH.....	5
1.2.2 RIF.....	6
1.2.3 PZA.....	6
1.2.4 Hepatotoxicidad causada por el tratamiento antiTB.....	7
1.2.5 Nefrotoxicidad causada por el tratamiento antiTB.....	8
1.3 Sustancias y extractor naturales con efecto hepatoprotector ante el daño inducido con fármacos antiTB.....	9
1.4 Efecto hepatoprotector de la silimarina (SM).....	12
1.5 AU/AO.....	14
<b>2. Hipótesis.....</b>	<b>18</b>
<b>3. Objetivo general.....</b>	<b>18</b>
3.1 Objetivos particulares.....	18
<b>4. Metodología.....</b>	<b>19</b>
4.1 Obtención de los triterpenos (AU/AO) a partir de una fuente natural.....	19
4.2 Ensayo <i>in vivo</i> para la determinación de la dosis de antiTB.....	20
4.3 Ensayo <i>in vivo</i> para la determinación de dosis de SM.....	21
4.4 Ensayo <i>in vivo</i> con AU/AO (Parte 1).....	22
4.5 Ensayo <i>in vivo</i> con AU/AO (Parte 2).....	22
4.6 Ensayo <i>in vivo</i> con AU/AO (Parte 3).....	23
4.7 Análisis estadísticos.....	23
<b>5. Resultados.....</b>	<b>24</b>
5.1 Obtención de triterpenos AU/AO a partir de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	24
5.2 Ensayo <i>in vivo</i> para evaluar la dosis alta de antiTB.....	25
5.3 Ensayo <i>in vivo</i> para evaluar la dosis alta de antiTB y SM.....	28
5.4 Ensayo <i>in vivo</i> con AU/AO (Parte 1).....	32
5.5 Ensayo <i>in vivo</i> con AU/AO (Parte 2).....	36
5.6 Ensayo <i>in vivo</i> con AU/AO (Parte 3).....	41
<b>6. Discusión.....</b>	<b>46</b>
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>50</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>52</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Fracciones obtenidas de la CC del residuo de los lavados del extracto EtOH de <i>Rosmarinus officinalis</i> ...	24
.....	
<b>Tabla 2.</b> Fracciones obtenidas de la CC-FN de los lavados realizados con CH <sub>3</sub> CN, CHCl <sub>3</sub> y MeOH del extracto EtOH de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	25
.....	
<b>Tabla 3.</b> Efectos de la mezcla de antiTB administrada vía i.g. durante 37 días sobre el peso de órganos en ratones macho BALB/c.....	27
<b>Tabla 4.</b> Efectos de la mezcla de antiTB administrada vía i.g. durante 37 días sobre parámetros bioquímicos en ratones machos BALB/c.....	27
<b>Tabla 5.</b> Efectos de la mezcla de antiTB administrado vía i.g. durante 93 días el sobre el peso de órganos en ratones macho BALB/c.....	30
<b>Tabla 6.</b> Efectos de la mezcla de antiTB administrada via i.g. durante 50 días sobre sobre el peso de órganos en ratones macho BALB/c....	34
<b>Tabla 7.</b> Efectos de la mezcla de antiTB administrada vía i.g. durante 91 días sobre sobre el peso de órganos en ratones macho BALB/c....	38
<b>Tabla 8.</b> Efectos de la mezcla de antiTB administrada vía i.g. durante 91 días sobre parámetros bioquímicos en ratones machos BALB/c.....	39
<b>Tabla 9.</b> Efectos de la mezcla de antiTB administrada vía i.g. durante 91 días sobre sobre el peso de órganos en ratones macho BALB/c.....	42
<b>Tabla 10.</b> Efectos de la mezcla de antiTB administrada vía i.g. durante 91 días sobre parámetros bioquímicos en ratones machos BALB/c.....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Metabolismo de la INH.....	5
<b>Figura 2.</b> Estructura del AO.....	15
<b>Figura 3.</b> Estructura del AU.....	15
<b>Figura 4.</b> Efecto de la mezcla de antiTB administrada vía i.g. durante 37 días sobre la ganancia de peso corporal en ratones macho BALB/c.....	26
<b>Figura 5.</b> Cortes histológicos de hígado de ratones macho BALB/C con daño hepático inducido con la mezcla de antiTB, administrada via i.g. durante 37 días.....	28
<b>Figura 6.</b> Cortes histológicos de riñón de ratones macho BALB/C con daño hepático inducido con la mezcla de antiTB administrada via i.g. durante 37 días.....	28
<b>Figura 7.</b> Efectos de la mezcla de antiTB sobre la GPC en ratones macho BALB/C al ser administrada vía i.g. durante 93 días.....	29
<b>Figura 8.</b> Cortes histológicos de hígado de ratones macho BALB/C con daño hepático inducido con la mezcla de antiTB administrada vía i.g. durante 93 días.....	31
<b>Figura 9.</b> Cortes histológicos de riñón de ratones macho BALB/C con daño hepático inducido con la mezcla de antiTB administrada via i.g. durante 93 días.....	31
<b>Figura 10.</b> Efectos de la mezcla de antiTB sobre la GPC en ratones macho BALB/C al ser administrada vía i.g. durante 50 días.....	33
<b>Figura 11.</b> Cortes histológicos de hígado para la evaluación de la mezcla de antiTB administrada via i.g. durante 50 días en ratones macho BALB/c.....	34
<b>Figura 12.</b> Cortes histológicos de riñón para la evaluación de la mezcla de antiTB administrada via i.g. durante 50 días en ratones macho BALB/c.....	36
<b>Figura 13.</b> Efectos de la mezcla de antiTB sobre la GPC en ratones macho BALB/C al ser administrada vía i.g. durante 91 días.....	37

<b>Figura 14.</b> Cortes histológicos de hígado para la evaluación de la mezcla de antiTB administrada via i.g. durante 91 días en ratones macho BALB/c.....	40
<b>Figura 15.</b> Cortes histológicos de riñón para la evaluación de la mezcla de antiTB administrada via i.g. durante 91 días en ratones macho BALB/c.....	41
<b>Figura 16.</b> Efectos de la mezcla de antiTB sobre la GPC en ratones macho BALB/C al ser administrada vía i.g. durante 91 días.....	42
<b>Figura 17.</b> Cortes histológicos de hígado para la evaluación de la mezcla de antiTB administrada via i.g. durante 91 días en ratones macho BALB/c.....	44
<b>Figura 18.</b> Cortes histológicos de riñón para la evaluación de la mezcla de antiTB administrada via i.g. durante 91 días en ratones macho BALB/c.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ALT</b>	Alanina aminotransferasa	<b>MA</b> s	Macrófagos alveolares
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza	<b>MDMH</b>	Macrófagos derivados de monocitos humanos
<b>antiTB</b>	Antituberculosos		
<b>AO</b>	Ácido oleanólico	<b>MeOH</b>	Metanol
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferasa	<b>mg</b>	Miligramo
<b>AU</b>	Ácido ursólico	<b>µg</b>	Microgramo
<b>CAT</b>	Catalasa	<b>mL</b>	Mililitro
<b>CC</b>	Cromatografía en columna	<b>µm</b>	Micromolar
<b>CCF</b>	Cromatografía en capa fina	<b>mmol</b>	Milimol
<b>CCl<sub>4</sub></b>	Tetracloruro de carbono	<b>NAT2</b>	N-acetiltransferasa 2
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Cloroformo	<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>CH<sub>3</sub>CN</b>	Acetonitrilo		
<b>CMC</b>	Carboximetilcelulosa	<b>PA</b>	Ácido pirazinoico
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria	<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares Asociados a patógenos
		<b>PDIM</b>	Dimicocerosato de Ptiocerosol
<b>CMN</b>	Centro Médico Nacional		
<b>dL</b>	Decilitro	<b>PU</b>	Ácido pirazinúrico
<b>Est</b>	Estreptomina	<b>PZA</b>	Pirazinamida
<b>Etb</b>	Etambutol	<b>Rf</b>	Punto de fusión
<b>EtOH</b>	Etanol	<b>RIF</b>	Rifampicina
<b>EU</b>	Estados Unidos	<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>FA</b>	Fosfatasa alcalina	<b>SIDA</b>	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
<b>FR</b>	Fármaco-resistente		
<b>g</b>	Gramo	<b>SM</b>	Silimarina
<b>GGT</b>	Gamma-glutamil transferasa	<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>GPC</b>	Ganancia de peso corporal	<b>TB</b>	Tuberculosis
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad	<b>TB-FR</b>	Tuberculosis fármaco-resistente
		<b>TB-</b>	Tuberculosis
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina – eosina	<b>MFR</b>	multi fármaco-resistente
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico	<b>TB-RR</b>	Tuberculosis resistente a rifampicina
<b>i.g.</b>	Intragástrica	<b>TB-XFR</b>	Tuberculosis con fármacorresistencia extendida
<b>INH</b>	Isoniazida		
<b>INCMNSZ</b>	Instituto de Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán	<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
		<b>UI</b>	Unidades Internacionales
<b>kg</b>	Kilogramo	<b>VIH</b>	Virus de Inmunodeficiencia Humana
<b>L</b>	Litro		
		<b>XO</b>	Xantina oxidasa
<b>LAM</b>	Lipoarabinomanano		



## RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa causada por bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, es una de las 10 principales causas de muerte alrededor del mundo, siendo la principal causa de muerte por un solo agente infeccioso. El daño hepático inducido por fármacos antituberculosos es uno de los mayores problemas en la práctica médica, pues los fármacos básicos y de primera línea para el tratamiento la TB causan hepatotoxicidad, lo que provoca el abandono del tratamiento, favoreciendo la formación de cepas resistentes. Actualmente se están investigando compuestos naturales con efecto hepatoprotector entre los que se encuentran triterpenos como el ácido oleanólico (AO) y el ácido ursólico (AU), que se les atribuye, además de los efectos hepatoprotectores, propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas. Se evaluó el efecto hepato y nefroprotector de la mezcla de dichos triterpenos obtenidos a partir del extracto metanólico de *Rosmarinus officinalis*, que se administró vía i.g. a dosis de 50 mg/kg en ratones BALB/c machos con daño inducido con la mezcla de fármacos anti-TB (RIF:INH:PZA) a dosis elevadas (150:75:150 mg/kg), durante 50 y 91 días, además de la evaluación de la dosis alta de silimarina (SM) a 200 mg/kg vía i.g. Se observó que la administración de antiTB tres veces a la semana, provocaba cambios degenerativos en el tejido hepático, siendo en menor intensidad en los animales tratados con antiTB + AU/AO y con antiTB + SM. La dosis alta de SM demostró no ser tóxica. No se observó efecto nefrotóxico en los animales tratados con antiTB. Se sugiere la realización del ensayo con la administración diaria de los fármacos para observar mejores resultados.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious-contagious disease caused by bacteria from the *Mycobacterium tuberculosis* complex, it is one of the 10 main causes of death around the world, being the main cause of death due to a single infectious agent. Liver damage induced by antituberculous drugs is one of the biggest problems in medical practice, since the basic and first-line drugs for the treatment of TB cause hepatotoxicity, which causes the abandonment of the treatment, favoring the formation of resistant strains. Natural compounds with a hepatoprotective effect are currently being investigated, including triterpenes such as oleanolic acid (OA) and ursolic acid (UA), which are attributed, in addition to their hepatoprotective effects, anti-inflammatory, antioxidant and anti-cancer properties. The hepato and nephroprotective effect of the mixture of said triterpenes obtained from the methanolic extract of *Rosmarinus officinalis*, which was administered via i.g. at doses of 50 mg / kg in male BALB / c mice with damage induced with the anti-TB drug mixture (RIF:INH:PZA) at high doses (150:75:150 mg/kg), for 50 and 91 days, in addition to the evaluation of the high dose of silymarin (SM) at 200 mg/kg ig. It was observed that the administration of anti-TB three times a week, caused degenerative changes in liver tissue, being less intense in animals treated with anti-TB + UA / OA and anti-TB + SM. The high dose of SM was shown to be non-toxic. No nephrotoxic effect was observed in animals treated with anti-TB. It is suggested to carry out the trial with the daily administration of the drugs to observe better results.

## 1. Introducción

### 1.1 Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa causada por bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Se caracteriza patológicamente por la inflamación y formación de granulomas en el tejido pulmonar en casi el 85% de los casos; además, de presentarse en otros sitios como la TB extrapulmonar (Dheda et al., 2016). La TB extrapulmonar se puede presentar en pleura, linfonodos, cavidad abdominal, tracto genitourinario, piel, articulaciones, huesos y en meninges. Este tipo de TB es más común de lo que se cree, pues aproximadamente el 25% de los casos son extrapulmonar (Singh et al., 2018).

La TB es una de las 10 principales causas de muerte alrededor del mundo, siendo la principal a causa de muerte por un solo agente infeccioso, incluso por arriba del Virus de Inmunodeficiencia Humana/Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (VIH/SIDA). A nivel mundial cerca de 10 millones de personas enferman cada año, de los cuales el 90% son adultos en edad productiva, afectando principalmente a hombres en una proporción 2:1 frente a las mujeres. Además, se estima que existen 1.7 billones de personas infectadas y están en riesgo de desarrollar la enfermedad (WHO, 2019).

Este proceso infeccioso se puede presentar en ambos sexos y a cualquier edad, aunque la mayor carga se observa en hombres adultos, con el 57% de los casos reportados, respecto al 32% en mujeres adultas, y el 11% en niños. A nivel mundial, el 44% de los casos se reportan en el Sureste de Asia, el 18% en la región oriental del Pacífico y para América se reporta el 3%. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que el mayor número de casos se concentran en 30 países, de los cuales la mayoría se encuentra en África y Asia, siendo Brasil el único país de América en esta lista (WHO, 2019).

La TB resistente a fármacos (TB-FR) es un grave problema de salud en muchos países, y suele clasificarse en tres categorías: la TB multifármaco resistente (TB-MFR), con resistencia a isoniazida (INH) y a rifampicina (RIF), dos de los

principales fármacos requeridos para el tratamiento de la TB; también se encuentra la TB resistente a RIF (TB-RR), y la TB con farmacorresistencia extendida (TB-XFR). Este último, se caracteriza por la resistencia al menos a una fluoroquinolona y a un fármaco inyectable de los empleados en el tratamiento de la TB-MFR. Mundialmente, se ha reportado que al menos medio millón de casos nuevos de TB son RR; de los cuales, el 78% de ellos se trató como TB-MFR. Entre los países con mayor número de casos TB-MFR se encuentran India (27%), China (14%) y Rusia (9%) (WHO, 2019).

La aparición de cepas resistentes ha dado pauta a la existencia de TB prácticamente incurable, mejor conocida como TB totalmente farmaco-resistente (TB-TFR), y se refiere a cepas de *M. tuberculosis* provenientes de aislados clínicos que muestran resistencia a todos los fármacos disponibles en las pruebas de farmacosenibilidad *in vitro*. Sin embargo, se ha sugerido el uso del término TB-XFR para definir a estas cepas, ya que no han sido probadas contra los fármacos de nueva generación (Ahmed et al., 2016; Dheda et al., 2017; Parida et al., 2015; Velayati et al., 2018). Los primeros dos casos fueron observados en dos pacientes en Italia en el 2003; y actualmente se han reportado alrededor de 30 casos en Irán, India y Sudáfrica (Khajotia, 2018; Parida et al., 2015).

En México, durante el 2020, se reportaron 31,724 casos de TB, de los cuales, 17,197 fueron hombres y 14,527 mujeres. Entre los estados con mayor número de casos reportados se encuentran Guerrero, Estado de México y Veracruz (Secretaría de Salud, 2020). En lo que va del 2021, hasta la semana 5, se han reportado 916 casos, donde 592 se tratan de hombres y 324 mujeres; siendo Veracruz, Chiapas y Nuevo León, los estados con mayor incidencia (Secretaría de Salud, 2021).

La TB pulmonar frecuentemente se desarrolla de manera lenta. Los pacientes con TB sensible suelen ser asintomáticas o presentar escasos síntomas, entre ellos, tos y fiebre. En caso de la TB ocasionada por la reactivación de la infección; además de los síntomas anteriores, también se observa pérdida de peso. En ambos casos, sí la enfermedad avanza, se presenta hemoptisis asociada a la necrosis caseosa de los pulmones (Lyon y Rossman, 2017).

*M. tuberculosis* es un bacilo aerobio quimiorganotrofo, de lento crecimiento, no presenta motilidad, no forma esporas. Se puede visualizar con la tinción para bacterias ácido-alcohol resistentes (conocida como Ziehl-Neelsen). Esta bacteria pertenece al grupo de micobacterias patógenas que causan TB en mamíferos, entre las cuales también se encuentra *M. bovis*. Un pequeño porcentaje de personas que se exponen al microorganismo desarrolla la enfermedad, en la mayoría de estos casos queda como infección latente; donde la bacteria puede persistir durante décadas en estado metabólicamente inactivo. Una de las características principales de las micobacterias es su pared celular, que presenta una estructura compleja. En la pared se encuentran glucolípidos como manósido de fosfatidil inositol y lipoarabinomanano (LAM); también presenta una capa de peptidoglucano, al cual están unidos arabinogalactanos y es rica en ácidos micólicos. Estas características de la pared celular confiere importantes características a la bacteria, como una relativa impermeabilidad a antibióticos y la presencia de moléculas inmunomoduladoras (Gordon y Parish, 2018).

La TB se transmite por gotas de saliva dispersada mediante la tos. A grandes rasgos, después de la inhalación de las micobacterias, éstas llegan a infectar a los epitelios alveolares, y después infectan células fagocíticas, siendo los macrófagos alveolares (MAs) los más afectados. Sin embargo, los MAs siguen siendo uno de los principales mecanismos de defensa de la respuesta inmune innata. La interacción de los MAs y las micobacterias genera el desarrollo de complejas reacciones en las que se reclutan más macrófagos en el sitio de la infección; además, de otras células inmunes, como linfocitos T y B, y esta acumulación celular induce la formación de granulomas (Dheda et al., 2016; Mayer-Barber y Barber, 2015; Scordo et al., 2016). Un granuloma contiene macrófagos centrales infectados que están rodeados de macrófagos epitelioides, células espumosas y células gigantes multinucleadas, con linfocitos periféricos y una cápsula de tejido fibroso; estos granulomas permiten la contención de la infección (Sakamoto, 2012). Sin embargo, se ha observado que los MAs juegan dos papeles importantes en la infección con *M. tuberculosis*. Son quienes ayudan a controlar el desarrollo de la infección, pero también son el primer sitio de establecimiento de la bacteria (Mayer-Barber y Barber, 2015). Para el reconocimiento de la micobacteria por parte de las células inmunes, son

necesarios los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs); sin embargo, éstos son comúnmente recubiertos por dimicocerosato de ptiocerol (phthiocerol dimycocerosate, -PDIM-), glucolípidos fenólicos, uno de los principales lípidos y factores de virulencia presentes en la pared de *M. tuberculosis*, lo que hace más difícil su procesamiento para las células presentadoras de antígeno; además, de promover la entrada de las micobacterias al interior de los MAs a través de la fagocitosis, favoreciendo la infección de estas células (Augenstreich et al., 2019; Bailo et al., 2015; Pinto et al., 2016; Tang et al., 2016).

## 1.2 Tratamiento contra TB

La OMS recomienda el tratamiento de elección para la TB susceptible que consiste en un régimen de dos fases; la primera es un tratamiento de dos meses con la mezcla de INH, RIF, pirazinamida (PZA) y etambutol (Etb) o estreptomicina (Est), administrado diariamente en tabletas orales con dosis fijas de acuerdo con el peso corporal del individuo. La segunda fase consiste en administrar INH y RIF durante 4 meses. En casos de TB susceptible, no se recomienda el uso de fluoroquinolonas, ya que se puede inducir resistencia, esto afecta el tratamiento de la TB-MFR (WHO, 2017).

En caso de la TB susceptible a RIF pero resistente a INH, el tratamiento consiste en la mezcla de RIF, Etb, PZA y levofloxacina durante 6 meses; sin embargo, no se recomienda la administración de estreptomicina (Est) u otros agentes inyectables.

Para el tratamiento de pacientes con TB-RR y TB-MFR, se cuentan con tres grupos de fármacos antiTB:

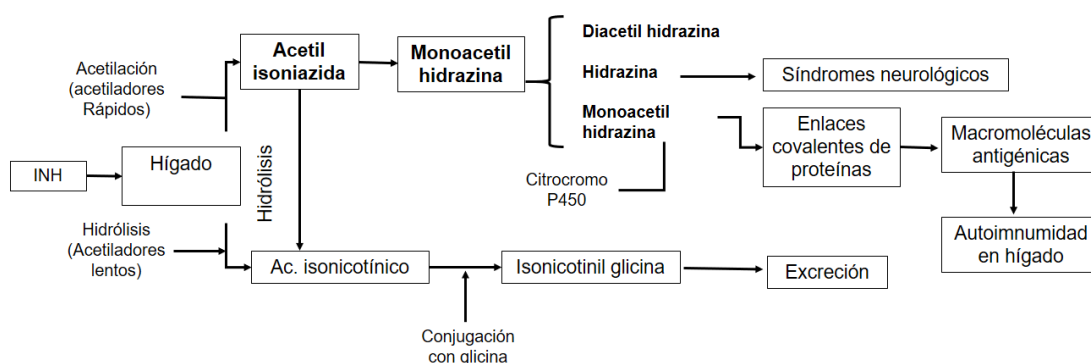
- Grupo A: Fluoroquinolonas (levofloxacina, moxifloxacina), bedaquilina y linezolid.
- Grupo B: Clofazimina, cicloserina, terizidona.
- Grupo C: Etb, delamanida, PZA, imipenem, cilastatina, meropenem, amikacina, etionamida, protionamida y ácido *p*-aminosalicólico.

El tratamiento se base en la administración de tres fármacos del grupo A, empleando al menos una fluoroquinolona, y al menos un fármaco del grupo B, para tener un esquema de cuatro agentes antiTB al inicio del tratamiento. La duración sugerida del régimen es de 18 a 20 meses.

En el caso del tratamiento para la TB-XFR, el régimen a seguir se establece de manera similar al de TB-MFR con duración de 18 a 24 meses, realizando pruebas de susceptibilidad a los fármacos de primera línea (INH, PZA, RIF y Etb) para agregar al menos uno de ellos. La linezolid es crítico, y más cuando se tratan de cepas resistentes a las fluoroquinolonas. La clofazimina y los fármacos carbapenemas o carbapenémicos (meropenem, imipenem, ertapenem, y faropenem) también han demostrado efectividad en cepas de TB-XFR (Seaworth y Griffith, 2017).

### 1.2.1 INH

Este fármaco inhibe la síntesis del ácido micólico (componente principal de la pared celular micobacteriana), crucial en la sobrevivencia de las micobacterias. La concentración plasmática máxima se alcanza de 1 a 3 horas post-administración (Erwin et al., 2019; Metushi et al., 2016; Sarkar y Ganguly, 2016; Wang et al., 2016). El metabolismo de la INH se describe en la **Figura 1**.



**Figura 1.** Metabolismo de la INH.

Un punto a considerar en el metabolismo y eliminación de la INH, es la influencia del genotipo acetilador de NAT2 de cada individuo, el cual puede ser de dos

tipos, lento y rápido; algunos autores mencionan a los acetiladores intermedios, sin embargo, son considerados funcionalmente similares a los acetiladores rápidos. A su vez, los acetiladores lentos, pueden subcategorizarse en lentos y muy lentos. Se ha observado que los acetiladores lentos están asociados con el daño hepático inducido por fármacos antiTB, siendo los acetiladores muy lentos los que presentan el mayor riesgo. NAT2 está presente en menor cantidad en los acetiladores lentos, haciendo que la eliminación de INH sea más prolongada, provocando una concentración serológica más elevada de INH en este tipo de acetiladores (Collins et al., 2020; Mukherjee et al., 2019; Perwitasari et al., 2016; Suvichapanich et al., 2018).

### **1.2.2 RIF**

Este fármaco inhibe la síntesis de proteínas en bacterias Gram positivas, interfiriendo en la transcripción de RNA. Se absorbe bien por vía oral y es metabolizada en el hígado por enzimas microsomales, principalmente. La hepatotoxicidad asociada a RIF ocurre mayormente durante la administración simultánea con INH, pues la RIF induce la hidrólisis de INH, formando la hidracina hepatotóxica. Además, estimula enzimas en el citocromo P450, que son las encargadas del metabolismo de gran cantidad de fármacos (Evan Prince et al., 2016; Sarkar y Ganguly, 2016).

### **1.2.3 PZA**

La PZA inhibe la síntesis de ácidos grasos de los bacilos; se absorbe bien al administrarse vía oral y es principalmente metabolizado en hígado. La PZA se convierte en ácido pirazinoico (PA) por acción de deaminasa microsomal y xantina oxidasa (XO); el PA es transformado en 5-ácido hidroxipirazinoico (5-OH-PA) por acción de XO. La XO también puede actuar directamente sobre PZA formando 5-ácido hidroxipZA (5-OH-PZA). Parte del PA es conjugado con glicina formando ácido pirazinúrico (PU). Es difícil de determinar el mecanismo exacto por el cual la PZA causa hepatotoxicidad (Chakraborty y Rhee, 2015; Sarkar y



Ganguly, 2016; Zhao et al., 2017). A pesar de que el mecanismo metabólico por el cual podría causar hepatotoxicidad no es claro; Zhao y colaboradores (2017) demostraron en ratas Wistar tratadas solo con PZA durante 28 días vía oral a dosis de 1 y 2 g/kg mostraron un incremento en los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) indicando daño en hígado, y en el caso del grupo de la dosis más alta, en cortes histológicos de hígado, presentaron infiltrado inflamatorio.

#### **1.2.4 Hepatotoxicidad causada por el tratamiento antiTB**

El daño hepático inducido por fármacos es uno de los mayores problemas en la práctica médica, en Estados Unidos (EU) es una de las principales causas para realizar trasplantes de hígado (Chen et al., 2015; Kotsampasakou et al., 2017) o bien son causa para retirar fármacos de mercado (Yu et al., 2017). Varios fármacos de usos actual son hepatotóxicos, siendo los más comunes los antiinflamatorios no esteroideos y los antibióticos, incluyendo a los fármacos antituberculosos -antiTB- (Yu et al., 2017). Está bien demostrado que RIF, INH y PZA, son fármacos básicos y de primera línea para el tratamiento la TB pero causan hepatotoxicidad. Siendo ésta la reacción adversa la más severa y es la causa por la que hay abandono de tratamiento, estos factores favorecen la aparición de cepas FR (Björnsson, 2016; Jiménez-Arellanes et al., 2016; Nagarajan y Whitaker, 2018).

Nagarajan y Whitaker (2018) reportaron que cerca del 48% de las personas que suspenden el tratamiento contra la TB se debe a la hepatotoxicidad. Los casos TB-MFR son tratados con la mezcla de al menos ocho fármacos de primera y segunda línea (fluoroquinolonas, amikacina, capreomicina, etc.) por periodos de hasta 30 meses, por lo que el daño hepático se incrementa en más del 69% de pacientes.

Un estudio realizado en Indonesia en 41 niños de 1 a 15 años con TB y tratados con los fármacos de primera línea; describen que se observó daño hepático desde el día 14 y el tratamiento fue suspendido en 6 pacientes de 11 por esta causa (Gafar et al., 2019). Otro estudio realizado en Marruecos, en 142 pacientes

mayores a 15 años con TB pulmonar y extrapulmonar, tratados con la mezcla de INH, RIF y PZA se encontró que el 24.6% desarrollo hepatotoxicidad (Bouazzi et al., 2016). Por otra parte, en un estudio realizado en Reino Unido, reportan que, de 1529 pacientes con TB observados de abril del 2010 a mayo del 2014, se encontró una prevalencia del 6.9% de daño hepático asociado al tratamiento, aunque este porcentaje fue entre el 2 al 30% (Abbara et al., 2017).

RIF, INH y PZA son los fármacos básicos y a la fecha no pueden ser sustituidos; dado esta problemática, en la actualidad se están realizando investigaciones encaminadas a reducir los efectos colaterales del tratamiento empleando extractos herbales y/o compuestos de origen natural como la silimarina (SM), resveratrol, vitaminas E y C, polifenoles, ajo, entre otros (Bailón-Martínez y Jiménez-Arellanes, 2018; Jiménez-Arellanes et al., 2016).

### **1.2.5 Nefrotoxicidad causada por el tratamiento con antiTB**

Diversas sustancias de usos terapéuticos también tienen la capacidad de causar efectos adversos en la función renal como resultados de toxicidad o perfusión renal comprometida, esto incluye necrosis tubular, daño glomerular y tubulointersticial, daño mediado hemodinámicamente y nefropatía obstructiva. Entre los principales fármacos causantes de nefrotoxicidad están los antibióticos y los anti-inflamatorios no esteroideos (Bicalho et al., 2015).

En un estudio retrospectivo hecho entre 1995 y 2007, 41 pacientes que fueron diagnosticados con nefritis intersticial, todos ellos habían recibido tratamiento antiTB con RIF, lo que sugiere que está asociado a la habilidad de la RIF de producir una elevada respuesta inmune asociada a daño celular (Beebe et al., 2015).

Otro estudio realizado en Taiwán durante 2006 y 2010, donde se estudiaron 1,394 pacientes >18 años, diagnosticados con TB y que recibieron tratamiento con los fármacos antiTB de primera línea, se encontró que desarrollaron daño renal agudo con incremento significativo en los niveles de creatinina sérica, y en algunos casos, hematuria persistente y proteinuria (Chang et al., 2014).

Por otra parte, otro trabajo realizado en ratas Wistar macho tratadas con INH:RIF a una dosis de 50:50 mg/kg vía oral durante 45 días, reportan un incremento en los niveles séricos de creatinina, urea y ácido úrico; y en el análisis histopatológico se observó atrofia glomerular e infiltrado inflamatorio celular en el riñón (Hussein et al., 2016).

Martin y Sabina (2016) realizaron un estudio en ratas Wistar hembras tratadas con una la mezcla de INH y RIF (50 mg/kg/vía oral/diariamente) durante 28 días, donde encontraron un incremento significativo en los niveles séricos de creatinina, urea y ácido úrico en comparación al grupo control (sin tratamiento). Además, el grupo tratado con fármacos antiTB mostraron daño glomerular y tubular por análisis histopatológico, además de congestión en los riñones.

En ratas Wistar hembras, a las cuales se les administró INH:RIF (50:50 mg/kg/día/28 días), se encontró una disminución del peso corporal, e incremento en el peso de los riñones respecto a los controles sanos. Además, los niveles séricos de urea, ácido úrico y creatinina incrementaron significativamente en el grupo que recibió INH:RIF; además de observarse disminución en los niveles de CAT, SOD, glutatión reducido y glutatión peroxidasa. A nivel histológico del riñón, se apreció que la celularidad de los glomérulos fue menor comparada con los riñones sanos y un incremento en el tamaño de las células de los túbulos renales (Prince et al., 2019).

### **1.3 Sustancias y extractos naturales con efecto hepatoprotector ante el daño inducido con fármacos antiTB**

Dentro de la búsqueda de sustancias con efecto hepatoprotector se tienen algunos reportes de plantas con este efecto. Por ejemplo, se evaluó el efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Anacyclus pyrethrum* en ratas Sprague Dawley macho. Se indujo la hepatotoxicidad con INH:RIF a dosis de 50:50 mg/kg diariamente durante 28 días por vía oral. El extracto a dosis de 200 y 400 mg/kg se administró conjuntamente con los fármacos antiTB. Se observó que los animales tratados con el extracto a ambas dosis, presentaron una disminución en ALT, AST, fosfatasa alcalina (FA) y HDL respecto al grupo

que solo fue administrado con antiTB. En el análisis histológico del hígado, se observó arquitectura normal con poco infiltrado linfocitario en el grupo que recibió el extracto, mientras que el grupo administrado con antiTB presentó necrosis (Usmani et al., 2016).

El extracto acuoso de *Turbinaria ornata* también se evaluó en ratas macho albino suizos con daño hepático generado con INH:RIF a 75:75 mg/kg administrado diariamente por vía oral durante 14 días. Este extracto fue administrado a la dosis de 10, 25, 50 y 200 mg/kg. Se observó efecto hepatoprotector en los animales tratados con 200 mg/kg de extracto, disminuyendo los niveles de AST y ALT, y preservando la estructura del tejido hepático en comparación con el hígado de los animales que recibieron solo antiTB, los cuales presentaron fibrosis (Mohan et al., 2018).

Otro extracto evaluado fue el etanólico de *Moringa oleifera*, el cual se probó en ratas Wistar macho, a las que se le indujo hepatotoxicidad con INH:RIF a 50:50 mg/kg durante 28 días. Conjuntamente fueron tratadas con tres diferentes dosis de extracto (250, 500 y 1000 mg/kg). Se observó una disminución de ALT, AST, FA y bilirrubina directa en los grupos tratados con 250 y 500 mg de extracto; sin embargo, el grupo tratado con el extracto a 1000 mg/kg mostró efectos similares al grupo tratado con 500 mg/kg. En el análisis histológico, se observó que el grupo tratado con antiTB mostró necrosis e infiltrado inflamatorio en hígado, mientras que los animales tratados con extractos presentaron ligera congestión (Salama et al., 2018).

En un estudio se evaluó el extracto metanólico de *Maytenus royleanus* en ratones macho BALB/c. Se indujo daño hepático con la mezcla de RIF:INH:PZA:Etb a 13.5:6.75:36.0:24.8 mg/kg diariamente por vía intraperitoneal durante 15 días. El extracto se co-administró a 200 y 400 mg/kg. En el análisis histológico, se observó que los animales que recibieron solamente antiTB, presentaron esteatosis y congestión de los vasos sanguíneos en hígado, mientras que los que recibieron el extracto, mostraron disminución en las alteraciones tisulares, siendo la dosis de 400 mg/kg la que mostró mejores resultados (Shabbir et al., 2020).

El extracto metanólico de las hojas de *Erythrina indica* fue evaluado en ratas macho Sprague Dawley con daño hepático inducido con INH:RIF (50:50 mg/kg) por vía oral durante 28 días. El extracto se administró a 100 y 200 mg/kg y emplearon SM a 100 mg/kg como hepatoprotector de referencia. Al finalizar el estudio, se observó que los animales con antiTB mostraron un incremento en los niveles séricos de AST, ALT, FA, mientras que los animales tratados con los extractos tuvieron los niveles de enzimas similares al control y a los de los animales tratados con SM, siendo la dosis de 200 mg/kg la que mostró mejores resultados (Mujahid et al., 2017).

También se evaluó en extracto hidroalcohólico al 50% de *Trapa natans* en ratas macho Wistar, a los cuales, se les administró INH:RIF a 50:50 mg/kg vía intraperitoneal durante 15 días. El extracto se administró a 200 y 400 mg/kg vía oral, y se utilizó SM a 100 mg/kg como estándar. Se observó que los niveles de AST, ALT y FA disminuyeron en los animales tratados con el extracto en comparación con los que solo recibieron antiTB, manteniendo valores similares al del grupo control y al de SM, siendo la dosis de 400 mg/kg la que mostró mejores resultados. A nivel histológico, se observó que el hígado de los animales administrados solo con antiTB presentó necrosis e infiltrado inflamatorio, mientras que los que recibieron el extracto a 200 mg/kg mostró disminución de estas alteraciones, y los animales que recibieron el extracto a 400 mg/kg no mostraron alteración de la arquitectura hepática (Hussain et al., 2018).

Otro estudio reporta la evaluación el extracto hidroalcohólico (30:70) del fruto de *Monothea buxifolia* en ratas macho Sprague Dawley. Se indujo daño hepático con INH:RIF a 50:50 mg/kg por vía oral durante 21 días, y el extracto se administró a 150 y 300 mg/kg, además de utilizarse SM a 100 mg/kg como control positivo. En los animales tratados solo con antiTB, se observó incremento de ALT, AST y FA, mientras que el extracto a 150 mg/kg mostró valores similares a los observados en los animales control y a los tratados con SM; sin embargo, se observó que a la dosis de 300 mg/kg solo había una ligera disminución respecto a los animales que recibieron solo antiTB. En el análisis histológico, se observó esteatosis en hígado de los animales tratados solo con antiTB, mientras que los animales que recibieron el extracto a ambas dosis presentaron cambios mínimos en la estructura hepática (Ullah et al., 2016).

También se evaluó el extracto acuoso del fruto de *Tamarindus indica* en ratas Wistar de ambos sexos. Se indujo daño hepático con INH:RIF a 50:100 mg/kg administrado por vía intraperitoneal en el primer día de estudio. El extracto se administró a 250 y 500 mg/kg/vía oral durante 14 días. Además, de un grupo administrado con SM a 25 mg/kg. En este estudio, se observaron mejores resultados en los animales administrados con el extracto a 500 mg/kg, en los cuales disminuyeron los niveles de ALT, AST, FA y bilirrubina total en comparación con los animales que solamente recibieron antiTB, los resultados fueron muy similares a los del grupo de control positivo, SM (Amir et al., 2016).

Cabe mencionar que en la literatura existen numerosos trabajos que describen el efecto hepatoprotector de extractos y compuestos puros ante el daño ocasionado por otros agentes hepatotóxicos, como el CCl<sub>4</sub> (Adamu et al., 2020, Nwidi et al., 2018), paracetamol (Ahmad et al., 2020), etanol (Cho et al., 2016), acetato de plomo (Wardani et al., 2017) y tioacetamida (Abood et al.; 2020), pero a la fecha son escasos los trabajos que describen el efecto hepatoprotector de sustancias contra el daño inducido con fármacos antiTB.

#### **1.4 Efecto hepatoprotector de la silimarina (SM)**

SM es el extracto de acetato de etilo obtenido de *Silybum marianum*. Está compuesta por flavolignanós (silibinina A y B, isosilibinina, silicristina, isosilicristina y silidianina) y un flavonoide (taxifolina). De esta mezcla de polifenoles, la silibinina A y B son las que presentan el efecto biológico más importante y son los más abundantes. El efecto hepatoprotector de este compuesto ha sido ampliamente estudiado, tanto en enfermedades infecciosas como la hepatitis viral (Lozano-Sepúlveda et al 2015; Wei et al., 2013), daño hepático por consumo de alcohol (Das y Mukherjee, 2012; Grattagliano et al., 2013), fibrosis causada por CCl<sub>4</sub> en estudios agudos (Clichico et al., 2015; Hermenean et al, 2015).

Respecto al efecto protector de SM en casos de hepatotoxicidad causada por antiTB; a la fecha se tienen algunas investigaciones. En un estudio realizado en ratas Wistar hembras, a las cuales se les indujo daño hepático con INH:RIF

(50:50 mg/kg) administrado por vía oral durante 28 días. Se observó que los animales tratados solamente con antiTB presentaron incremento en los valores de AST, ALT y FA, mientras que los animales que fueron administrados con SM (25 mg/kg), presentaron valores muy cercanos al de los controles sanos. Además, los animales que recibieron SM mostraron niveles similares a los controles sanos de SOD y catalasa, mientras que el grupo con antiTB presentó valores inferiores. Por análisis histológico, se observó inflamación periportal en el hígado de los animales con antiTB, mientras que en el hígado de los animales que recibieron SM no se observó inflamación (Sabina et al., 2019).

En otro estudio, se evaluó el efecto hepatoprotector de la SM en conejos con daño hepático inducido con INH (50 mg/kg) administrado diariamente por vía oral durante 19 días y la SM se administró a 50 mg/kg. En este caso se observó que el grupo que recibió solo antiTB presentó un incremento en los niveles de bilirrubina sérica y ALT respecto a los animales que recibieron INH más SM (Jahan et al., 2015).

En cuanto a las evaluaciones clínicas del efecto hepatoprotector de la SM frente a fármacos antiTB. Luangchosiri y colegas (2015) realizaron un estudio doble ciego aleatorizado entre enero y diciembre del 2012, en el Hospital Ramathibodi de la Facultad de Medicina de Mahidol, en Bangkok, Tailandia. Donde evaluaron a 55 pacientes con diagnóstico de TB y que ya habían iniciado su tratamiento. A 27 de estos pacientes se les administró SM (140 mg, tres veces al día) y a 28 pacientes se les administró placebo. A la cuarta semana de haber iniciado el tratamiento, se les cuantificó ALT, AST, FA y *gamma-glutamyl transferasa* (GGT); donde se observó una disminución de los valores de estas enzimas en el grupo tratado con SM respecto al grupo placebo; observando que solo dos pacientes tratados con SM desarrollaron daño hepático, mientras que 9 del grupo placebo desarrollaron daño. Por lo que el riesgo de daño hepático de los tratados en conjunto con SM fue del 7.4% contra 32.1% del grupo placebo.

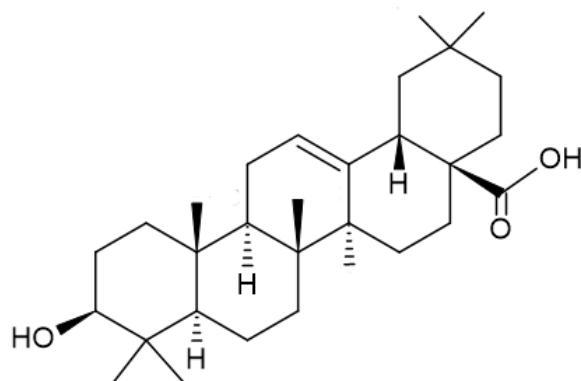
Recientemente se ha descrito que la SM y la silibinina (Sb) presentaron efectos antimicobacterianos en ensayos *in vitro*. La SM mostró una concentración mínima inhibitoria (CMI) = 12.5 µM contra *M. tuberculosis* H37Rv, una CMI = 50 µM contra *M. tuberculosis* MFR (CIBIN 99, cepa resistente a Est, INH, RIF, Etb y PZA), y la Sb también resultó activo con CMI = 50 µM contra H37Rv y CMI =

12.5  $\mu\text{M}$  contra CIBIN 99. La SM y la Sb mostraron efecto sinérgico *in vitro* en combinación con los antiTB de primera línea (RIF, PZA e INH) contra la cepa sensible (H37Rv) y también mostraron sinergia al combinarlos con fármacos de segunda línea (amikacina, moxifloxacina y etionamida) contra la cepa MFR (CIBIN 99). En ambos ensayos se observó una disminución significativa de las UFC en comparación a los que solo recibieron antiTB. Continuando con los ensayos *in vitro*, en macrófagos derivados de monocitos humanos (MDMH) infectados con las cepas *M. tuberculosis* H37Rv y CIBIN-99, se observó que la carga bacilar disminuía en presencia de SM y Sb a dosis de 50 y 100  $\mu\text{M}$ , mostrando que Sb tuvo mejor efecto contra la cepa H37Rv mientras que SM fue más activo contra la cepa MFR. Dada la actividad mostrada en *in vitro* se realizó la evaluación *in vivo* en el modelo de TB pulmonar progresiva en ratones BALB/c infectados con *M. tuberculosis* H37Rv. En este ensayo encontraron que SM a la dosis de 5 mg/kg administrado por vía intragástrica diariamente durante 30 y 60 días redujo la carga bacilar en los pulmones después de 1 y 2 meses de tratamiento. También encontraron que la combinación SM/fármacos antiTB redujo la carga bacilar y el porcentaje de neumonía en los animales infectados (Rodríguez-Flores et al., 2019).

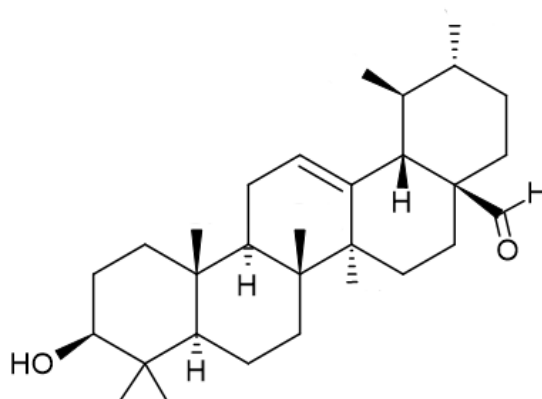
## 1.5 AU/AO

Debido a la hepatotoxicidad que causan los fármacos antiTB, se están investigando compuestos naturales con efecto hepatoprotector entre los que se encuentran triterpenos como el ácido oleanólico (AO, **Figura 2**), y el ácido ursólico (AU, **Figura 3**) (Jiménez-Arellanes et al., 2016). Estos compuestos están presentes en numerosas plantas medicinales como *Bouvardia ternifolia* (Gutiérrez-Rebolledo et al., 2016), *Lantana hispida* (Jiménez-Arellanes et al., 2007), *Chamaedora tepejilote* (Jiménez-Arellanes et al., 2005) entre otras (Jesus et al., 2015; López-Hortas et al., 2018). Estos triterpenos tienen estructuras y actividades farmacológicas similares, ya que ambos son triterpenoides pentacíclicos; se les atribuye, además de los efectos hepatoprotectores, propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas (Ayeleso et al., 2017; Jesus et al., 2015; Mancha-Ramírez y Slaga, 2016).





**Figura 2.** Estructura del AO



**Figura 3.** Estructura del AU

En un estudio realizado en ratones BALB/c machos con daño hepático inducido con la mezcla de fármacos antiTB y donde evaluaron los siguientes grupos: grupo I con vehículo (solución salina isotónica, vía oral y aceite de olivo ultra puro vía subcutánea); grupo II: fármacos antiTB (RIF:INH:PZA a 10:10:30 mg/kg), solubilizados en solución salina isotónica, vía oral; Grupo III y IV: mezcla AU/AO 100 y 200  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  respectivamente solubilizada en aceite de olivo ultra puro, vía subcutánea; grupo V: fármacos antiTB + AU/AO (100  $\mu\text{g}/\text{ratón}$ ); grupo VI: fármacos antiTB más la mezcla AU/AO a 200  $\mu\text{g}/\text{ratón}$ . Al final del estudio, el grupo II que recibió sólo los fármacos antiTB, presentó pérdida de peso

significativa en comparación con el grupo I (vehículo), mientras que los animales de los demás grupos, incluyendo los tratados con la mezcla AU/AO mostraron un incremento de peso similar al grupo I (vehículo). A su vez, los pesos relativos de los hígados del grupo II incrementaron respecto al grupo I, mientras los pesos relativos del grupo VI tuvieron un incremento respecto al vehículo (grupo I), los demás grupos mostraron resultados muy parecidos al control negativo. En cuanto a los resultados hematológicos, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. En el análisis bioquímico, el grupo II y el VI presentaron incrementos en los niveles séricos de urea, AST y ALT, mientras que el grupo V mostró una disminución de AST y ALT. La FA (F se vio alterada en ningún grupo. Al realizar el análisis histopatológico, se encontró esteatosis y un incremento en la apoptosis en el grupo II (antiTB), mientras que en los animales tratados con los triterpenos no mostraron cambios importantes. No se observaron cambios histológicos en riñón (Gutiérrez-Rebolledo et al., 2016).

También se realizó la evaluación del efecto hepatoprotector de la mezcla de AU y AO (obtenida de *Rosmarinus officinalis*). Para esto se emplearon ratones macho BALB/c que fueron administrados diariamente durante 28 días vía intragástrica (i.g.), y se formaron cinco grupos con los siguientes tratamientos: grupo I: Vehículo (carboximetilcelulosa -CMC- al 0.5%); grupo II: antiTB (RIF:INH:PZA a 10:10:30 mg/kg) solubilizado en agua inyectable; grupo III: fármacos antiTB más mezcla de AU y AO a 100 mg/kg solubilizados en CMC al 0.5%; grupo IV: fármacos anti TB más AU y AO a 200 mg/kg y grupo V: fármacos antiTB más SM a la dosis de 2.5 mg/kg solubilizada en CMC al 0.5%. Se observó que el grupo I (vehículo) mostró pérdida de peso, mientras que los grupos III, IV y V (antiTB + AU/AO a 100 mg/kg, antiTB + AU/AO a 200 mg/kg y antiTB + SM, respectivamente) mostraron aumentos regulares. El grupo II (antiTB) mostró una ganancia mínima. Sin embargo, los grupos III y IV, presentaron obstrucción en vías urinarias por formación de cristales, aunado a problema de solubilidad de los triterpenos. En un estudio adicional, se evaluó el efecto hepatoprotector de la mezcla AU/AO a 60 días, en este caso se redujo la dosis de AU/AO, para ello se emplearon los siguientes grupos: grupo I: vehículo (CMC 0.5%); grupo II: antiTB (RIF:INH:PZA a 10:10:30 mg/kg) solubilizado en agua inyectable; grupo III: antiTB + AU/AO (10 mg/kg); grupo IV: antiTB + AU/AO (20 mg/kg) y grupo V:

antiTB + SM a 2.5 mg/kg. Durante esta fase del estudio se observó un incremento de peso corporal en el grupo III (antiTB + AU/AO a 10 mg/kg), e inclusive el incremento fue mayor al del grupo I (vehículo); el grupo IV (antiTB + AU/AO a 20 mg/kg) también presentó incremento de peso corporal respecto al grupo I; sin embargo, este incremento se mantuvo por debajo del observado en los grupos III y el grupo V (administrados con AU/AO a 10 mg/kg y SM, respectivamente). En cuanto a los resultados de parámetros de bioquímica clínica, se observó un incremento de ALT, AST en el grupo II administrado solamente con fármacos antiTB y también en el grupo IV (antiTB más AU/AO a 20 mg/kg); en cambio, el grupo III (antiTB más AU/AO) presentó valores muy similares al grupo I (vehículo) y al grupo V (antiTB más SM). Los niveles de urea se vieron incrementados en todos los grupos respecto al grupo I (vehículo), siendo el grupo II (antiTB) el que presentó el mayor incremento en comparación con los grupos III (antiTB más AU/AO a 10 mg/kg) y IV (antiTB más SM). La creatinina se vio incrementada en el grupo II (antiTB) y en el grupo IV (antiTB más AU/AO a 20 mg/kg), mientras los otros grupos mantuvieron valores similares al del grupo I (control). No se presentaron diferencias significativas en el estudio hematológico. En todos los grupos se presentó esteatosis de leve a moderada, y en el grupo II con antiTB se observó infiltrado linfocítico (Bailón-Martínez, 2016).

Respecto a estudios de nefrotoxicidad de esta mezcla de triterpenos, Ma y colaboradores (2014) realizaron un ensayo con ratones macho ICR, en los cuales se indujo daño renal con la administración de CCl<sub>4</sub> vía intraperitoneal (0.5 mL/2 veces/semana durante 1 semana). Se formaron cuatro grupos: grupo I: control (vehículo), grupo II: CCl<sub>4</sub> + AU 25 mg/ratón/día; grupo III: CCl<sub>4</sub> + AU a 50 mg/ratón/día, y grupo IV: CCl<sub>4</sub>. El grupo II tratado con AU a 25 mg presentó disminución significativa sobre los niveles séricos de urea, ácido úrico y creatinina respecto al grupo I (control de vehículo). El grupo III con AU a 50 mg no presentó cambios significativos. Sin embargo, a nivel histológico, los animales del grupo III tratados con AU a 50 mg mostraron una disminución significativa de necrosis celular en los túbulos renales y menor cantidad de lesiones glomerulares y del intersticio tubular.

## 2. Hipótesis

En estudios previos se demostró el efecto hepatoprotector de la mezcla de AU/AO a 100 y 200  $\mu\text{g}$ /ratón administrada por vía subcutánea y a la dosis de 100 y 200 mg/kg administrada por vía i.g. en animales sanos con daño hepático inducido con dosis baja de RIF:INH:PZA (10:30:30 mg/kg), por lo que se espera que esta mezcla de triterpenos a 50 mg/kg muestre efecto hepato y nefrotoprotector ante el daño inducido con dosis altas de RIF:INH:PZA (150:75:150 mg/kg).

## 3. Objetivo general

Evaluar el efecto hepato y nefroprotector de la mezcla de triterpenos (AU/AO) administrados por vía i.g. a dosis de 50 mg/kg en ratones BALB/c con daño inducido con la mezcla fármacos anti-TB (RIF:INH:PZA) a dosis elevadas (150:75:150 mg/kg).

### 3.1 Objetivos particulares

- Obtener los triterpenos (ácido ursólico y oleanólico) a partir de una fuente natural.
- Tratar a los animales con la mezcla de triterpenos y los fármacos antiTB durante 30 y 60 días por vía i.g.
- Obtener suero de los animales tratados para evaluar el perfil hepático y renal.
- Extraer riñón, hígado, corazón y estómago para análisis histológico.

## 4. Metodología

El trabajo experimental se desarrolló en la Unidad de Investigación Médica en Farmacología, CMN Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social, con apoyo del área de Patología del Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI y del área de Patología Experimental del Instituto de Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador. Los animales empleados fueron alojados de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-O62-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

### 4.1 Obtención de los triterpenos (ácido úrsólico y oleanólico) a partir de una fuente natural

Previamente se ha descrito que la especie *Rosmarinus officinalis* biosintetiza la mezcla de AU/AO (Bailón-Martínez, 2016; González, 2012), por lo que a partir de esta especie medicinal se preparó el extracto EtOH vía maceración. El extracto (10 g) libre de solvente orgánico, se sometió a 3 lavados con acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) (50 mL/lavado) con agitación constante durante 20 min en parrilla de agitación magnética. Posteriormente, cada lavado se filtró en un sistema de vacío (Millipore). Una vez filtrado, se concentró en un rotaevaporador (Buchi R-100) acoplado a un sistema de vacío, y el concentrado se colocó en un vial previamente pesado. Posteriormente, se realizaron lavados con  $\text{CHCl}_3$  y MeOH siguiendo la misma metodología anteriormente descrita. Todo el procedimiento se realizó por triplicado, por lo tanto, se procesó un total de 30 g de extracto EtOH. El residuo de los lavados se guardó en un vial.

Se realizaron cromatografías en capa fina (CCF) en placas de sílice como fase estacionaria, y empleando como fase móvil, la mezcla de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH 96:4. Como estándar de referencia, se empleó la mezcla de AU/AO y  $\beta$ -sitosterol (ambos de la marca Sigma). Las placas se revelaron con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 10% y calentamiento.

En los tres lavados ( $\text{CH}_3\text{CN}$ , MeOH y  $\text{CHCl}_3$ ) se detectó la mezcla de AU/AO con diferentes grados de pureza, por lo que fueron sometidos a fraccionamiento por

cromatografía en columna (CC), utilizando gel sílice como fase estacionaria en una proporción 1:20. Como fase móvil, se emplearon diferentes mezclas de disolventes como hexano (Hex), CHCl<sub>3</sub> y MeOH, siguiendo un orden ascendiente de polaridad. Cada fracción obtenida se concentró en un rotaevaporador y se guardaron en viales previamente pesados y etiquetados. Para corroborar la presencia de los triterpenos de interés en cada fracción, se realizaron CCF de cada una. Las fracciones ricas en AU/AO se pusieron a cristalizar en MeOH a temperatura ambiente.

#### **4.2 Ensayo *in vivo* para determinación de dosis de antiTB**

En estudios previos se emplearon dosis bajas de la mezcla de antiTB y SM, por lo que en este trabajo se emplearan dosis altas de los mismos. Como primer paso, se evaluó la dosis de INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg en ratones BALB/c machos con peso promedio de 23 g, los cuales fueron administrados diariamente por vía i.g. durante 37 días, para esto, se utilizó una cánula rígida de acero inoxidable. Para este estudio se formaron los siguientes grupos con n=5:

- Grupo I: Control (Agua inyectable)
- Grupo II: antiTB (INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg) disuelto en agua inyectable

Los animales se pesaron 3 veces a la semana para el registro de la ganancia de peso corporal (GPC). Se ha descrito que los animales tratados con la mezcla de fármacos antiTB pierden peso. En cambio, los animales sanos presentan incremento de peso corporal de manera constante.

Al finalizar el tratamiento, se tomaron muestras de sangre por el plexo retro-orbital y se realizó la necropsia de tres animales por grupo para la toma de muestras de órganos (hígado, corazón, bazo, riñones y estómago). De las muestras de sangre, se obtuvo el suero de dos animales por grupo para análisis de química sanguínea (laboratorio de Patología Clínica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM) para la determinación de urea, creatinina, ácido úrico, colesterol, HDL, triglicéridos, bilirrubinas, AST, ALT y FA. Los órganos mencionados fueron pesados y posteriormente se colocaron en

formaldehído al 10% para análisis histológico, el cual, se realizó en el área de Patología del Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI por la Dra. G. S. Reyes.

#### **4.3 Ensayo *in vivo* para determinación de dosis de SM**

Para evaluar la dosis elevada de SM (100 mg/kg) solubilizada en CMC al 0.5%. Se formaron 3 grupos de ratones BALB/c machos con peso promedio de 24 g, mismos que fueron administrados vía i.g. 3 veces a la semana durante 93 días. Los grupos (n=10) fueron los siguientes:

- Grupo I: Control (agua inyectable)
- Grupo II: antiTB (INH:RIF:PZA, 75:150:150 mg/kg) solubilizado en agua inyectable
- Grupo III: antiTB (INH:RIF:PZA, 75:150:150 mg/kg) en agua inyectable + SM (100 mg/kg) en CMC al 0.5%

Los animales se pesaron tres veces a la semana para registrar la GPC con el fin de monitorear la ganancia o pérdida de peso que ocasiona la mezcla de fármacos antiTB y SM.

A los 90 días, se tomaron muestras de sangre a través del plexo retro-orbital para la obtención de suero; además, de la realización de la necropsia de 3 animales por grupo para la obtención de hígado, corazón, bazo, riñones y estómago. Los órganos fueron pesados y posteriormente colocados en formaldehído al 10%. El análisis histológico se realizó en el área de Patología del Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI por la Dra. G. S. Reyes.

#### **4.4 Ensayo *in vivo* con AU/AO (Parte 1)**

Para la evaluación de la mezcla de AU/AO, se utilizaron ratones BALB/c machos con peso promedio de  $24 \pm 3$  g, que fueron tratados vía i.g. 3 veces a la semana durante 50 días, los grupos (n=10) fueron los siguientes:

- Grupo I: Control (Tween 80 al 0.1% en CMC al 0.5%)
- Grupo II: antiTB (INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg) solubilizado en agua inyectable
- Grupo III: antiTB (INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg ) más SM (100 mg/kg) solubilizado en CMC al 0.5%
- Grupo IV: antiTB (INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg) más AU/AO (50 mg/kg) solubilizado en Tween 80 al 0.1%
- Grupo V: SM (200 mg/kg) solubilizado en CMC al 0.5%

Los animales se pesaron dos veces a la semana para registrar la GPC con el fin de monitorear la ganancia o pérdida de peso que ocasionan los diferentes tratamientos.

A los 50 días, se realizaron las necropsias para la obtención de hígado, corazón, bazo, riñones y estómago de 3 animales por grupo. Los órganos fueron pesados y colocados en formaldehído al 10%. El análisis histológico se realizó en el área de Patología del Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI por la Dra. G. S. Reyes.

#### **4.5 Ensayo *in vivo* con AU/AO (Parte 2)**

Para continuar con la evaluación de la mezcla de AU/AO, se emplearon ratones BALB/c machos con peso promedio de 25 g, que fueron tratados vía i.g. 3 veces a la semana durante 91 días. Los grupos (n=10) fueron los siguientes:

- Grupo I: Control (Tween 80 al 0.1% en CMC al 0.5%)
- Grupo II: antiTB (INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg) en agua inyectable
- Grupo III: antiTB (INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg ) más SM (100 mg/kg) solubilizado en CMC al 0.5%



- Grupo IV: antiTB (INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg) más AU/AO (50 mg/kg) solubilizado en Tween 80 al 0.1%
- Grupo V: SM (200 mg/kg) solubilizado en CMC al 0.5%

Los animales se pesaron una vez a la semana para obtener la GPC. Al finalizar el estudio a los 91 días, se tomó muestra de sangre para la obtención de suero de 3 animales por grupo y se realizaron las necropsias de 2 animales por grupo para la obtención de hígado, y riñones. Los órganos fueron pesados y colocados en formaldehído al 10%. El análisis histológico se realizó en el área de Patología Experimental del Instituto de Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) por el Dr. Rogelio Hernández Pando.

#### **4.6 Ensayo *in vivo* con AU/AO (Parte 3)**

En este último experimento se siguió el mismo esquema de tratamiento del experimento anterior. Al finalizar el estudio se tomó muestra de sangre para la obtención de suero de todos los animales y se realizó la necropsia de los cinco animales para la obtención de hígado y riñones. Los órganos fueron pesados y colocados en formaldehído al 10%. El análisis histológico se realizó en el área de Patología Experimental del INCMNSZ por el Dr. Rogelio Hernández Pando.

#### **4.7 Análisis estadísticos**

Para los análisis estadísticos se utilizó el software Sigma Plot 12.0. Para las variables peso corporal, parámetros bioquímicos y peso de órganos, se utilizaron análisis de varianza (ANOVA) bifactorial y diferencia de medias repetidas con una prueba pos hoc Student Newman Keuls donde  $p > 0.05$  fue considerado significativo

## 5. Resultados

### 5.1 Obtención de los triterpenos AU/AO a partir de *Rosmarinus officinalis*

Al realizar los tres lavados del extracto, se obtuvo un residuo, al cual se le hizo una CCF para detectar la presencia de la mezcla de triterpenos. En la CCF se observó una mancha con coloración rosa intenso al ser revelado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% y calor, con R<sub>f</sub> similar al de la referencia de AU/AO (Sigma). Al determinar la presencia de la mezcla de triterpenos, se procedió a realizar una CC de dichos residuos (2.06 g). Mediante este proceso, se obtuvieron fracciones de 250 mL utilizando como fase móvil Hex, CHCl<sub>3</sub> y MeOH, y mezclas de ellos con grado ascendiente de polaridad, obteniendo un total de 34 fracciones. En las fracciones 21, 23-28 se detectó principalmente AU/AO (Tabla 1). Se obtuvo un total de 38.8 mg de la mezcla de triterpenos, lo que equivale un rendimiento del 1.15%.

**Tabla 1.** Fracciones obtenidas de la CC del residuo de los lavados del extracto EtOH de *Rosmarinus officinalis*.

Sistema de elución	Fracciones colectadas	Reuniones de fracciones	Peso (mg)	Compuesto detectado
Hex 100%	1-4	1-16	16.6	AU/AO
Hex:CHCl <sub>3</sub> 9:1	5-17	17-19	0.5	
Hex:CHCl <sub>3</sub> 8:2	18-28	20, 22	1.1	
Hex:CHCl <sub>3</sub> 6:4	21-18	21, 23-28	5.6	
Hex:CHCl <sub>3</sub> 4:6	29-34	29	13	β-Sitosterol sucio
		30-34	0.3	Fracción desechada
	<b>Total AU/AO (mg)</b>	23.8	<b>Rendimiento %</b>	1.15

Por otro lado, los tres lavados (CHCl<sub>3</sub>, MeOH, CH<sub>3</sub>CN) se reunieron porque todos contenían la mezcla de los triterpenos. 6.5 g de muestras se sometió a un fraccionamiento por CC para obtener la mezcla de triterpenos. Se obtuvieron 114 fracciones de 1000 mL, en las cuales se pudo observar la presencia de los triterpenos casi puros en las fracciones 86-99; mismas que se pusieron a cristalizar para obtener un total de 0.65 g de AU/AO, lo que equivale a un 10% de rendimiento (Tabla 2). En las fracciones 100 a 114, también se observó la

mezcla de triterpenos, pero presentaban algo de impurezas; por lo que se decidió que posteriormente serían fraccionados en otra CC para purificar la mezcla de triterpenos.

**Tabla 2.** Fracciones obtenidas de la CC-FN de los lavados realizados con CH<sub>3</sub>CN, CHCl<sub>3</sub> y MeOH, del extracto EtOH de *Rosmarinus officinalis*.

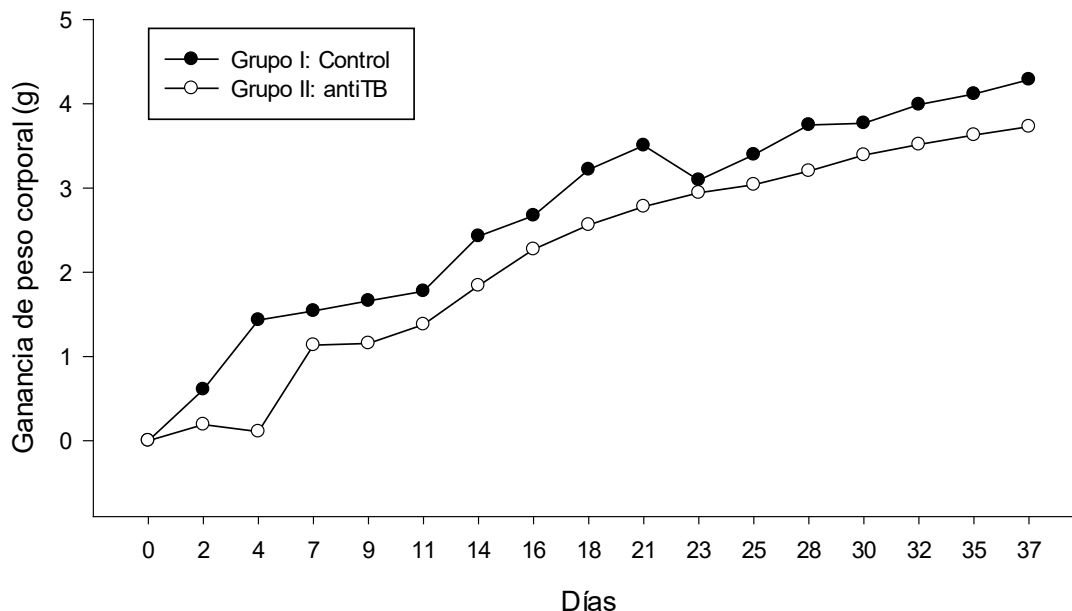
Sistema de elución	Fracciones colectadas	Reuniones de fracciones	Peso (mg)	Compuesto detectado
Hex 100 %	1-13	1-16	71.69	fracciones desechadas
Hex:CHCl <sub>3</sub> 9:1	14-21	17-28	59.16	
Hex:CHCl <sub>3</sub> 8:2	22-29	29	31.24	
Hex:CHCl <sub>3</sub> 7:3	30-37	30-36	40.37	
Hex:CHCl <sub>3</sub> 6:4	38-45	37-47	135.58	
Hex:CHCl <sub>3</sub> 1:1	46-62	48-71	61.74	No determinados
CHCl <sub>3</sub> :Hex 6:4	63-73	72-79	55.97	
CHCl <sub>3</sub> :Hex 75:25	74-78			
CHCl <sub>3</sub> 100%	79-99	80-83	94.64	
CHCl <sub>3</sub> :MeOH 9:1	100-108	84-85	42.55	
		86-95	595.13	AU/AO
		96-99	54.82	
CHCl <sub>3</sub> :MeOH 75:25	109-114	100-107	169.3	AU/AO impuro
		108-114	146.8	
	<b>Total AU/AO (mg)</b>	649.95	<b>Rendimiento de AU/AO puros %</b>	10.00

## 5.2 Ensayo *in vivo* para evaluar la dosis alta de antiTB

Previamente, se reportó la realización de un experimento en ratones machos BALB/c, utilizando la mezcla de INH:RIF:PZA a dosis bajas (10:10:30 mg/kg) administrados diariamente por vía i.g. Es este estudio se encontraron diferencias significativas sobre los niveles de enzimas hepáticas en suero y provocó esteatosis en hígado en el grupo tratado con antiTB (Bailón-Martínez, 2016). Si bien, esta dosis, ocasionó daño en hígado, se decidió someter a los animales a un desafío mayor, utilizando dosis más altas de antiTB reportada por Bello-

Monroy y colegas (2019), quienes administraron la dosis de RIF:INH a 150:75 mg/kg diariamente durante 90 días. En nuestro caso, decidimos agregar PZA porque junto con INH y RIF, forma parte del esquema básico para el tratamiento de la TB; además, PZA es el fármaco que provoca mayor hepatotoxicidad (Bouazzi et al., 2016; Björnsson et al., 2016; Gafar et al., 2019; Zhao et al., 2017).

En un primer experimento se evaluó el efecto de una dosis elevada de antiTB (INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg, administrado por vía i.g.) en un grupo de 5 animales con su respectivo control; los cuales fueron tratados durante 37 días. Durante el periodo de tratamiento, ningún animal murió. Al finalizar el estudio, se tomaron órganos de tres animales por grupo, y sangre de 2 animales por grupo. La GPC entre el grupo I (control) y el grupo II (antiTB) no presentaron diferencias significativas (**Figura 4**), mostrando una GPC final de  $4.29 \pm 0.93$  g y  $3.73 \pm 0.80$  g, respectivamente, siendo ligeramente más alto el valor para el grupo I (control). Cabe señalar que, aunque no hubo diferencia significativa sobre la GPC entre los grupos de estudio al finalizar el experimento, la GPC del grupo I se mantuvo por arriba del grupo II, durante el periodo de experimentación.



**Figura 4.** Efecto de la mezcla de antiTB administrada vía i.g. durante 37 días sobre la ganancia de peso corporal en ratones macho BALB/c. Grupo I: Agua inyectable; grupo II: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg solubilizado en agua inyectable; n=5.

En cuanto al peso de los órganos (**Tabla 3**) y parámetros bioquímicos (**Tabla 4**), tampoco se observaron diferencia significativa entre ambos grupos; estos resultados nos permitieron observar que el daño empieza después de los 37 días del tratamiento. En el análisis histológico de hígado (**Figura 5**) se puede observar esteatosis localizada en el grupo II, mientras que en el grupo I se observa la morfología normal del tejido. En el análisis histológico del riñón (**Figura 6**) no se observa alteración en ningún grupo. Por lo que se decidió realizar el ensayo a 90 días.

**Tabla 3.** Efectos de la mezcla de antiTB administrada vía i.g. durante 37 días sobre el peso de órganos en ratones macho BALB/c.

Peso de órganos (g)		
Órgano	Grupo I: Control	Grupo II: antiTB
Hígado	1.48 ± 0.04	1.58 ± 0.29
Corazón	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.05
Riñones	0.46 ± 0.04	0.46 ± 0.09
Bazo	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01
Estómago	0.32 ± 0.04	0.36 ± 0.05

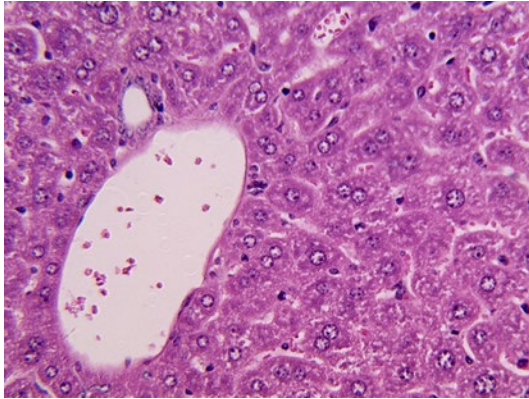
**Tabla 3.** Efectos de la mezcla de antiTB administrada vía i.g. durante 37 días sobre el peso de órganos en ratones macho BALB/c. Datos presentados como la media ± su error estándar. Grupo I: Agua inyectable; Grupo II: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg, solubilizados en agua inyectable; n=3.

Parámetro	Grupo I: Control	Grupo II: antiTB
Creatinina (µmol/L)	38.0 ± 2.8	37.5 ± 2.1
AST (UI/L)	325.5 ± 99.7	272.5 ± 195.9
ALT (UI/L)	286.0 ± 14.1	337.0 ± 287.1
Triglicéridos (mmol/L)	1.5 ± 0.0	1.3 ± 1.1
Colesterol (mmol/L)	3.1 ± 0.1	2.0 ± 1.3
FA (UI/L)	133.5 ± 24.7	139.5 ± 6.4
BUN (mmol/L)	8.2 ± 0.6	8.2 ± 1.3
Urea (mmol/L)	17.5 ± 0.7	17.5 ± 2.1

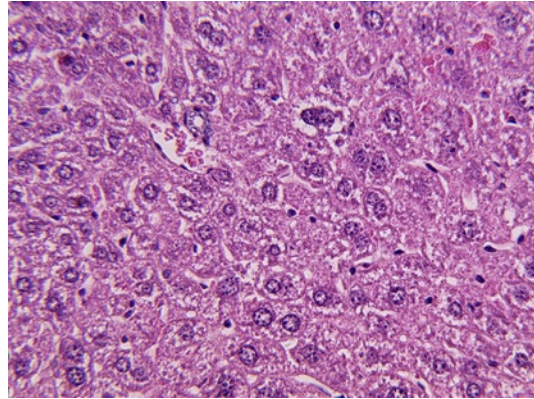
**Tabla 4.** Efectos de la mezcla de antiTB administrada vía i.g. durante 37 días sobre parámetros bioquímicos en ratones macho BALB/c. Datos presentados como la media ± su error estándar. Grupo I: Agua inyectable; Grupo II: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg en agua inyectable; n=2.

\*determinado en el equipo Dirui CS-T240 de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, el 19 de agosto del 2019.

Grupo I: Control

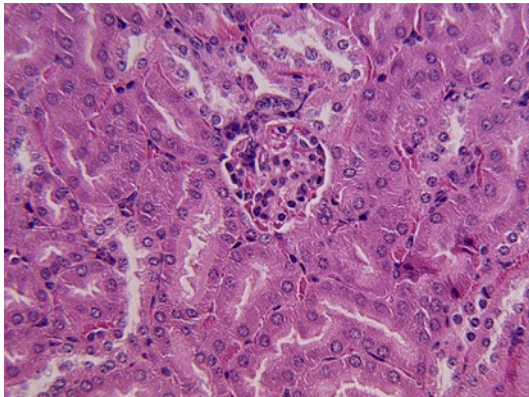


Grupo II: antiTB

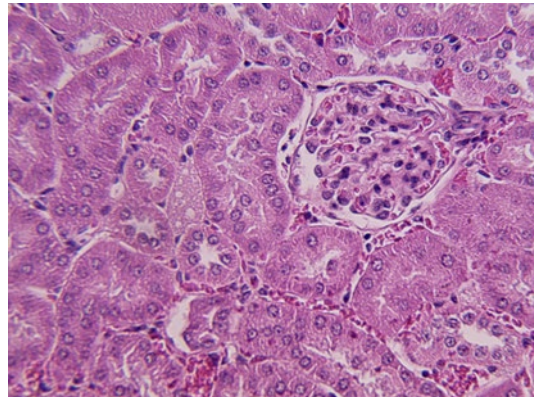


**Figura 5.** Cortes histológicos de hígado de ratones macho BALB/C con daño hepático inducido con la mezcla de antiTB, administrada via i.g. durante 37 días. Grupo I: Agua inyectable; Grupo II: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg solubilizado en agua inyectable; n=3. Tinción con H&E a 40x.

Grupo I: Control



Grupo II: antiTB



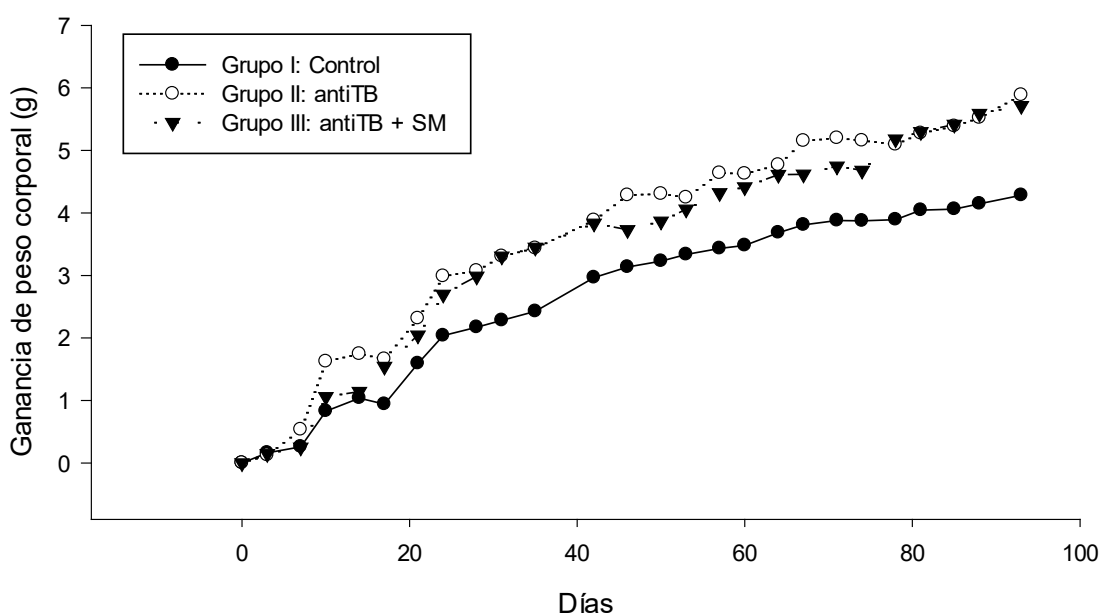
**Figura 6.** Cortes histológicos de riñón de ratones macho BALB/C con daño hepático inducido con la mezcla de antiTB administrada via i.g. durante 37 días. Grupo I: Agua inyectable; Grupo II: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg solubilizado en agua inyectable; n=3. Tinción con H&E a 40x.

### 5.3 Ensayo *in vivo* para evaluar la dosis alta de antiTB y SM

En el estudio realizado por Bailón-Martínez (2016), los grupos fueron administrados con la mezcla de antiTB RIF:INH:PZA a la dosis bajas (10:10:30 mg/kg), y el grupo del control positivo recibió SM a la dosis baja (2.5 mg/kg); sin embargo, en estudios recién publicados se reporta que la dosis de SM utilizada fue de 100 mg/kg (Domitrović et al., 2015; Kim et al., 2016; Sozmen et al., 2013).

Dado este antecedente, se decidió realizar un ensayo donde evaluamos la SM a la dosis de 100 mg/kg durante 93 días. Para este experimento se emplearon tres grupos: grupo I: control, grupo II: antiTB y grupo III: antiTB más SM. Durante el periodo de tratamiento, ninguno de los animales murió. No se pudo realizar la cuantificación de los parámetros bioquímicos porque las muestras sufrieron hemólisis. En la **Figura 7** se muestra la GPC, en la que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos. Al finalizar el experimento, se puede apreciar que la GPC para el grupo II (antiTB) y el grupo III (antiTB más SM) fue muy similar, mostrando valores de  $5.89 \pm 1.21$  y  $5.72 \pm 0.91$  g, respectivamente y la GPC para el grupo I (control) fue de  $4.28 \pm 0.67$  g, siendo este último grupo el que mostró la menor ganancia. Los tres grupos mostraron comportamiento parecido durante todo el estudio.

Las muestras de suero no fueron procesadas debido a la presencia de hemólisis en las mismas, lo que interfiere en la cuantificación de los parámetros bioquímicos.



**Figura 7.** Efectos de la mezcla de antiTB sobre la GPC en ratones macho BALB/C al ser administrada vía i.g. durante 93 días. Grupo I: Agua inyectable; Grupo II: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg en agua inyectable; Grupo III: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg en agua inyectable + SM a 100 mg/kg en CMC al 0.5%; n= 10.

Por otro lado, al registrar el peso de órganos (**Tabla 5**) se encontraron diferencias entre el peso del hígado de los animales del grupo II (antiTB) respecto al grupo III (antiTB + SM) y el grupo I (control) con  $p= 0.018$ . El peso del hígado fue de 1.38 g para el grupo I y de 1.55 y 1.39 g, para los grupos II y III respectivamente. Como se puede observar el hígado del grupo antiTB fue ligeramente mayor. También se presentaron diferencias estadísticamente significativas en el peso de los riñones, el grupo II (antiTB) mostro un peso elevado, siendo de 0.55 g respecto a los otros dos grupos ( $p= 0.002$ ), en este caso el peso fue de 0.42 y 0.46 g para los grupos I (control) y III (antiTB más SM).

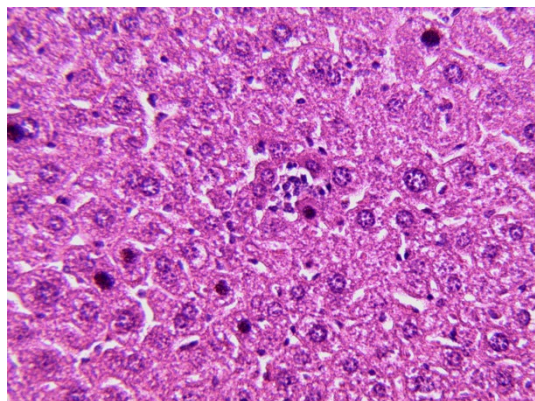
Peso de órganos (g)			
Órgano	Grupo I: Control	Grupo II: antiTB	Grupo III: antiTB + SM
Hígado	1.38± 0.03 <sup>b</sup>	1.55± 0.03 <sup>a,c</sup>	1.39± 0.13
Riñones	0.42± 0.02 <sup>b</sup>	0.55± 0.02 <sup>a,c</sup>	0.46± 0.01
Corazón	0.17± 0.00	0.25± 0.04	0.20± 0.03
Bazo	0.20± 0.07	0.16± 0.02	0.14± 0.03
Estómago	0.49± 0.3	0.40± 0.06	0.36± 0.03

**Tabla 5.** Efectos de la mezcla de antiTB administrado vía i.g. durante 93 días el sobre el peso de órganos en ratones macho BALB/c. Datos presentados como la media ± su error estándar. Grupo I: Agua inyectable; Grupo II: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg en agua inyectable; Grupo III:INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg en agua inyectable + SM a 100 mg/kg en CMC al 0.5%. Análisis estadístico (ANOVA) bifactorial de medias repetidas con post hoc Student Newman Keuls ( $p<0.05$ ); vs <sup>a</sup>Grupo I; vs <sup>b</sup>Grupo II; vs <sup>c</sup>Grupo III. n=3.

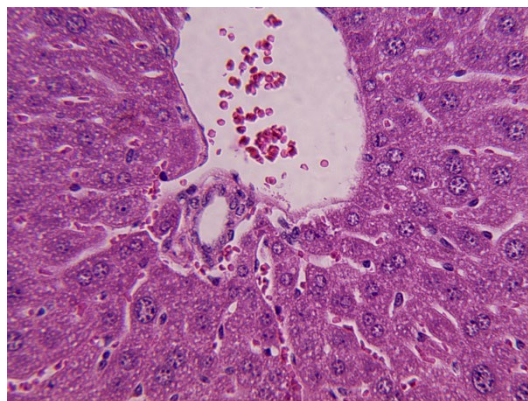
En el análisis histológico de hígado (**Figura 8**), se observó ligera esteatosis localizada e infiltrado linfocítico portal en el grupo II, mientras que en el grupo I y III no se observan alteraciones. En cuanto al análisis histopatológico de riñón (**Figura 9**), se observa nefritis moderada en los grupos II y III, mientras que el grupo I (control) no presenta alteraciones.



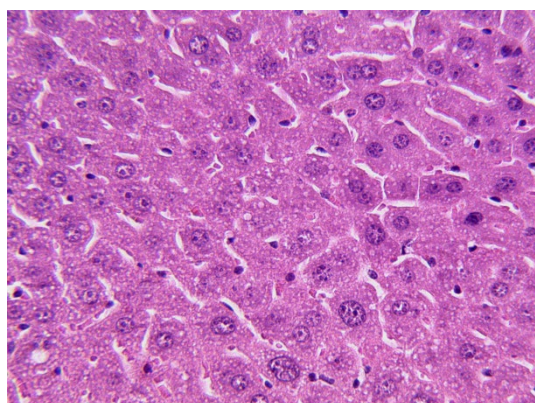
Grupo I: Control



Grupo II: antiTB

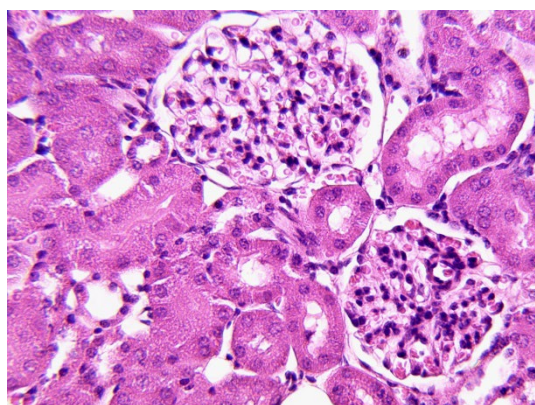


Grupo III: antiTB + SM

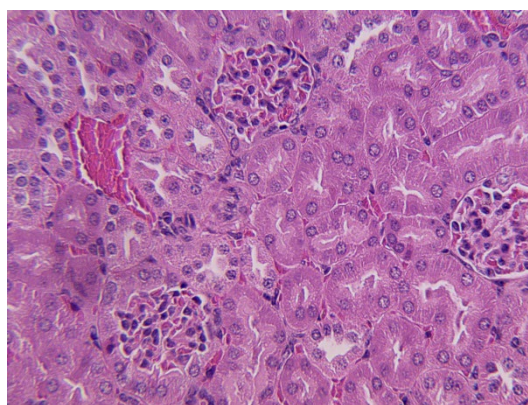


**Figura 8.** Cortes histológicos de hígado de ratones macho BALB/C con daño hepático inducido con la mezcla de antiTB administrada via i.g. durante 93 días. Grupo I: Agua inyectable; Grupo II: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg en agua inyectable; Grupo III:INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg en agua inyectable + SM a 100 mg/kg en CMC al 0.5%. n=3. Tinción con H&E a 40x.

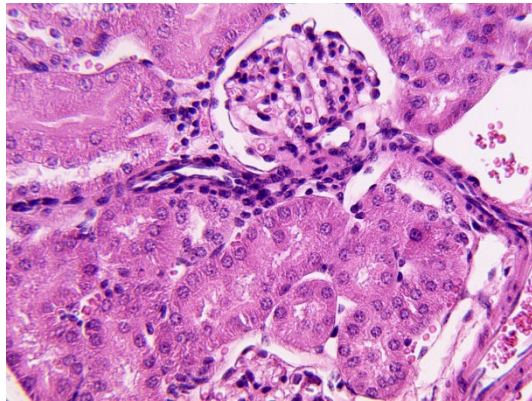
Grupo I: Control



Grupo II: antiTB



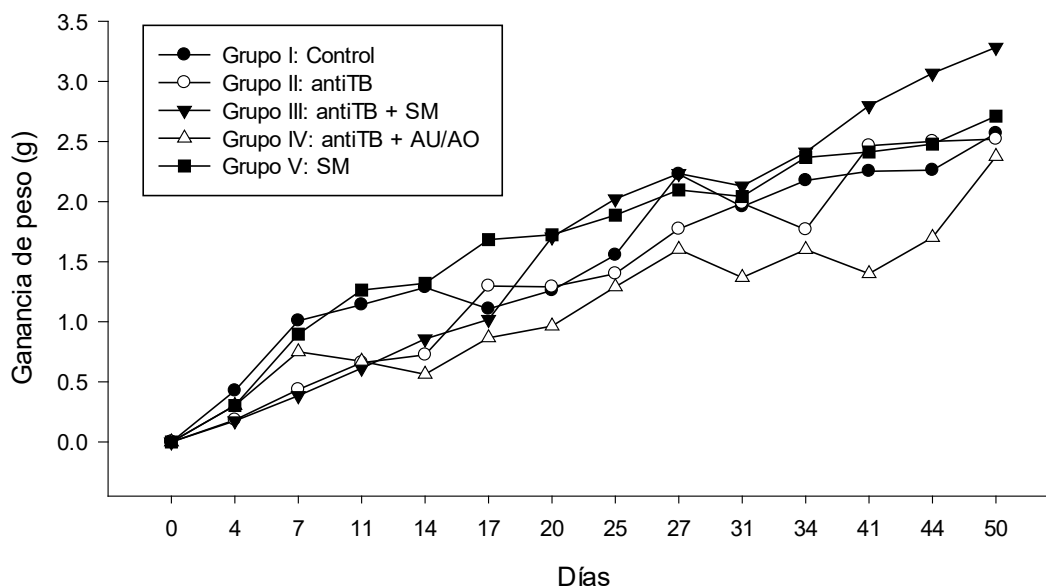
### Grupo III: antiTB + SM



**Figura 9.** Cortes histológicos de riñón de ratones macho BALB/C con daño hepático inducido con la mezcla de antiTB administrada vía i.g. durante 93 días Grupo I: Agua inyectable; Grupo II: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg en agua inyectable. Grupo III:INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg en agua inyectable + SM a 100 mg/kg en CMC al 0.5%. n=3. Tinción con H&E a 40x.

#### 5.4 Ensayo *in vivo* con AU/AO (Parte 1)

Para realizar este ensayo se formaron cinco grupos (n= 10): grupo I: Control, grupo II: antiTB, grupo III: antiTB + SM, grupo IV: antiTB + AU/AO y grupo V: SM. Este estudio fue planeado a 90 días; sin embargo, debido a la emergencia sanitaria a causa de la Covid-19, el estudio se finalizó a los 50 días, y sólo se obtuvieron los órganos para estudio histológico de tres animales por grupo. Los valores de la GPC se muestran en la **Figura 10**, en este caso no se observaron diferencias estadísticamente significativas y tampoco se observó diferencia significativa sobre los pesos de los órganos. El grupo con mayor GPC fue el grupo III ( $3.28 \pm 1.00$  g), seguido del grupo V ( $2.71 \pm 1.10$  g) y el grupo I ( $2.57 \pm 0.90$  g); en cambio los grupos II ( $2.52 \pm 0.78$  g), IV ( $2.38 \pm 0.84$  g) fueron los que mostraron pobre GPC.



**Figura 10.** Efectos de la mezcla de antiTB sobre la GPC en ratones macho BALB/C al ser administrada vía i.g. durante 50 días. Grupo I: Agua inyectable; Grupo II: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg solubilizado en agua inyectable; Grupo III: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + SM a 100 mg/kg en CMC al 0.5%; Grupo IV: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + AU/AO a 50 mg/kg en Tween 80 al 0.1%; Grupo V: SM a 200 mg/kg en CMC al 0.5%; n=10.

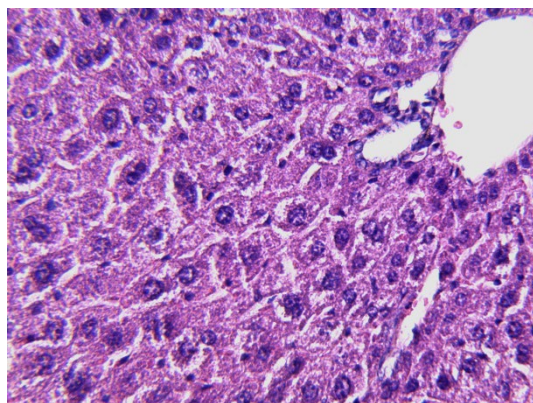
En cuanto al peso de los órganos (**Tabla 6**), no se observaron diferencias significativas; sin embargo, el peso del hígado del grupo II (1.65 g) fue mayor al peso de los otros grupos, en cambio, el peso del hígado del grupo IV (1.31 g) fue similar al peso del grupo I (1.37 g), el cual es el grupo control. El peso de los riñones del grupo II (0.51 g) también fue mayor al observado en los demás grupos, siendo estos muy similares entre ellos, y de nueva cuenta se observa, que el peso de los riñones del grupo IV es menor en comparación a los otros grupos.

Peso de órganos (g)					
Órgano	Grupo I: Control	Grupo II: antiTB	Grupo III: antiTB + SM	Grupo IV: antiTB + AU/AO	Grupo V: SM
Hígado	1.37± 0.02	1.65± 0.17	1.57± 0.15	1.31± 0.14	1.55± 0.23
Riñones	0.44± 0.06	0.51± 0.07	0.46± 0.07	0.40± 0.06	0.46± 0.07
Corazón	0.15± 0.03	0.17± 0.03	0.18± 0.03	0.16± 0.03	0.18± 0.06
Bazo	0.10± 0.02	0.17± 0.08	0.13± 0.01	0.20± 0.15	0.15± 0.04
Estómago	0.39± 0.17	0.36± 0.04	0.30± 0.03	0.48± 0.05	0.25± 0.03

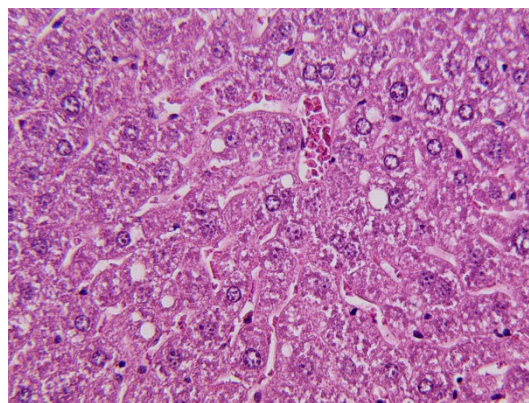
**Tabla 6.** Efectos de la mezcla de antiTB administrada vía i.g. durante 50 días sobre el peso de órganos en ratones macho BALB/c. Datos presentados como la media ± su error estándar. Grupo I: Agua inyectable; Grupo II: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg solubilizado en agua inyectable; Grupo III: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + SM a 100 mg/kg en CMC al 0.5%; Grupo IV: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + AU/AO a 50 mg/kg en Tween 80 al 0.1%; Grupo V: SM a 200 mg/kg en CMC al 0.5%; n=3.

En la **Figura 11** se muestran los cortes histológicos de los hígados; los grupos II (antiTB), III (antiTB más SM) y V (SM) presentaron esteatosis localizada, núcleos binucleados y macronúcleos. El grupo IV (antiTB más AU/AO) no presenta esteatosis; sin embargo, se observa necrosis focal, y el grupo I (control) no presentó alteraciones. En los cortes histológicos de riñón (**Figura 12**), no se observaron alteraciones significativas en ninguno de los grupos de estudio.

Grupo I: Control

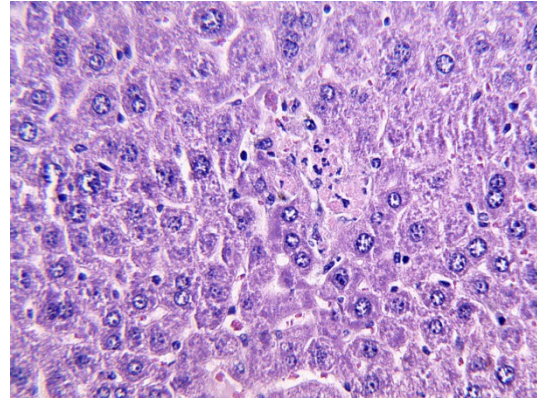
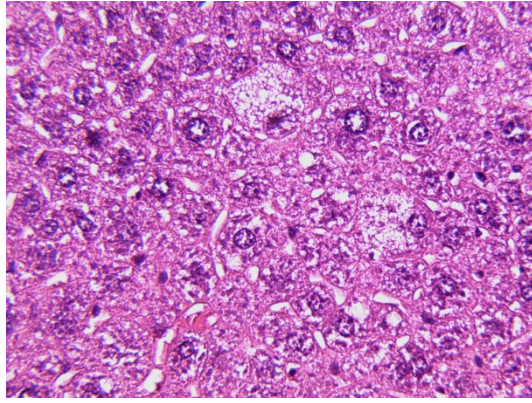


Grupo II: antiTB

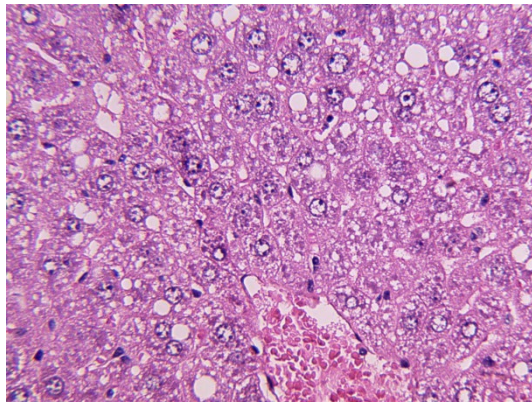


Grupo III: antiTB + SM

Grupo IV: antiTB + AU/AO

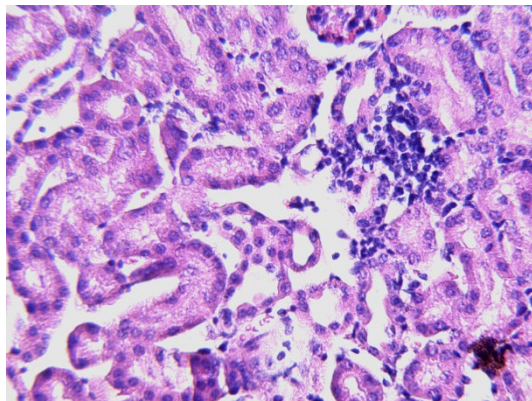


Grupo V: SM

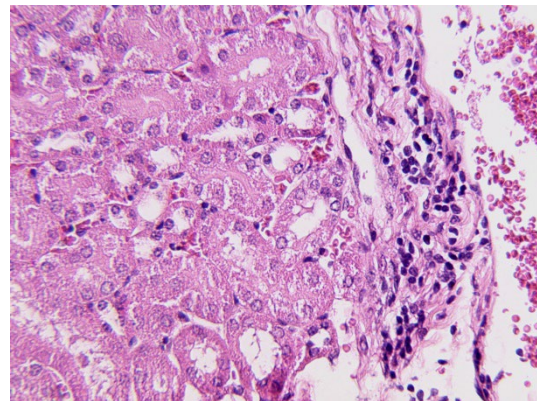


**Figura 11.** Cortes histológicos de hígado para la evaluación de la mezcla de antiTB administrada vía i.g. durante 50 días en ratones macho BALB/c; Grupo I: Agua inyectable; Grupo II: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg solubilizado en agua inyectable; Grupo III: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + SM a 100 mg/kg en CMC al 0.5%; Grupo IV: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + AU/AO a 50 mg/kg en Tween 80 al 0.1%; Grupo V: SM a 200 mg/kg en CMC al 0.5%; n=3. Tinción con H&E a 40x.

Grupo I: Control

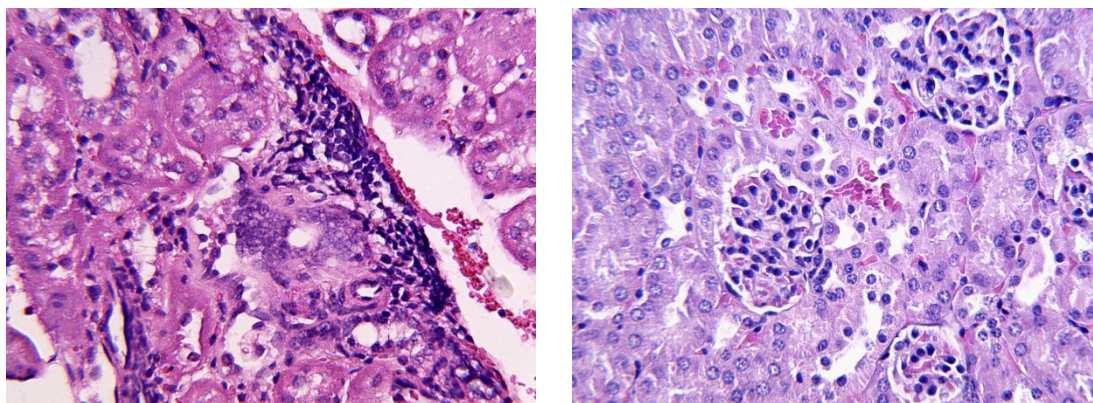


Grupo II: antiTB

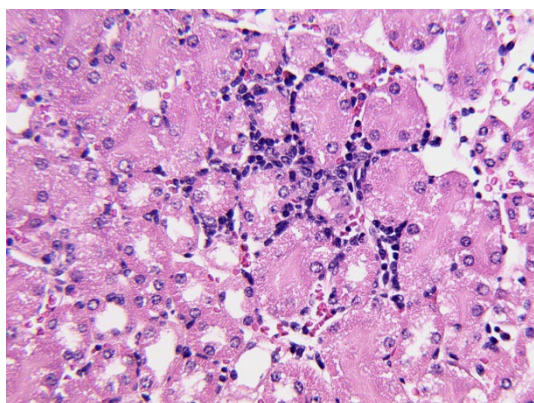


Grupo III: antiTB + SM

Grupo IV: antiTB + AU/AO



Grupo V: SM

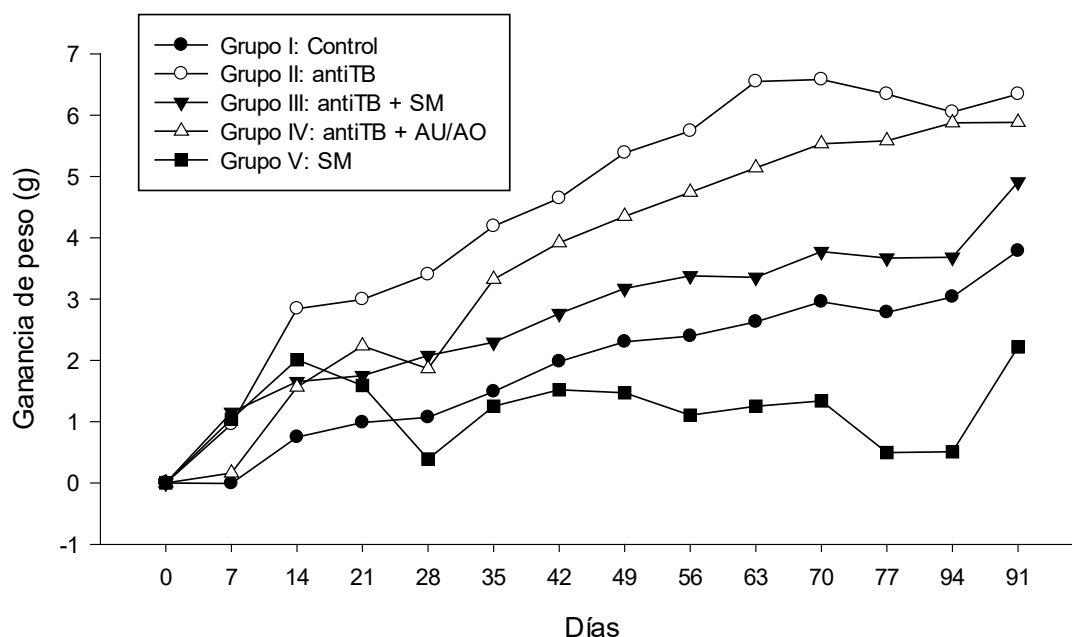


**Figura 12.** Cortes histológicos de riñón para la evaluación de la mezcla de antiTB administrada vía i.g. durante 50 días en ratones macho BALB/c; Grupo I: Agua inyectable; Grupo II: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg solubilizado en agua inyectable; Grupo III: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + SM a 100 mg/kg en CMC al 0.5%; Grupo IV: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + AU/AO a 50 mg/kg en Tween 80 al 0.1%; Grupo V: SM a 200 mg/kg en CMC al 0.5%; n= 3. Tinción con H&E a 40x.

### 5.5 Ensayo *in vivo* con AU/AO (Parte 2)

Para realizar este ensayo se formaron cinco grupos de 5 animales c/u: grupo I: Control, grupo II: antiTB, grupo III: antiTB + SM, grupo IV: antiTB + AU/AO y grupo V: SM: En este caso, los animales fueron administrados 3 veces a la semana durante 91 días y fueron pesados cada semana. Al finalizar el estudio, se tomaron muestras de órganos de 2 animales por grupo y muestras de suero de 3 animales por grupo. Cabe mencionar, que una muestra de sangre de cada grupo sufrió hemólisis, por lo que se descartó del análisis. Los resultados de la GPC se muestran en la **Figura 13**, se observa que el grupo II (antiTB) fue el que mostró mayor ganancia ( $6.34 \pm 0.32$  g), el cual presentó diferencia significativa

( $p= 0.012$ ) respecto al control (grupo I,  $3.79 \pm 0.74$  g) y al grupo V ( $2.22 \pm 0.37$  g). El grupo IV (antiTB + AU/AO) fue el segundo con mayor ganancia ( $5.88 \pm 0.80$  g) seguido del grupo III (antiTB + SM) con  $4.91 \pm 1.30$  g. La menor GPC ( $2.22$  g) fue para el grupo que recibió sólo SM (200 mg/kg).



**Figura 13.** Efectos de la mezcla de antiTB sobre la GPC en ratones macho BALB/C al ser administrada vía i.g. durante 91 días. Grupo I: Agua inyectable; Grupo II: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg solubilizado en agua inyectable; Grupo III: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + SM a 100 mg/kg en CMC al 0.5%; Grupo IV: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + AU/AO a 50 mg/kg en Tween 80 al 0.1%; Grupo V: SM a 200 mg/kg en CMC al 0.5%; n=5.

Respecto al peso de los órganos no se presentaron diferencias significativas (**Tabla 7**); sin embargo, se puede observar un incremento en el peso del hígado del grupo IV (1.85 g), respecto a los demás grupos ( $< 1.66$  g). El peso de los riñones del grupo III (0.52 g) y del grupo V (0.54 g) fue mayor respecto a los pesos de los demás grupos (0.45, 0.42 y 0.49 g, respectivamente).

**Tabla 7.** Efectos de la mezcla de antiTB administrada vía i.g. durante 91 días sobre el peso de órganos en ratones macho BALB/c.

Peso de órganos (g)					
Órgano	Grupo I: Control	Grupo II: antiTB	Grupo III: antiTB + SM	Grupo IV: antiTB + AU/AO	Grupo V: SM
Hígado	1.65± 0.02	1.64±0.12	1.58± 0.10	1.85±0.06	1.66± 0.14
Riñones	0.45± 0.04	0.42± 0.02	0.52± 0.01	0.49± 0.02	0.54± 0.06
Corazón	0.20± 0.03	0.17± 0.01	0.20±0.03	0.17± 0.03	0.20± 0.02
Bazo	0.13± 0.01	0.15± 0.02	0.09± 0.01	0.16± 0.02	0.09± 0.01
Estómago	0.38± 0.12	0.28± 0.04	0.48±0.01	0.37± 0.10	0.40± 0.08

Datos presentados como la media ± su error estándar. Grupo I: Agua inyectable; Grupo II: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg solubilizado en agua inyectable; Grupo III: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + SM a 100 mg/kg en CMC al 0.5%; Grupo IV: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + AU/AO a 50 mg/kg en Tween 80 al 0.1%; Grupo V: SM a 200 mg/kg en CMC al 0.5%; n=2.

Los valores de los parámetros bioquímicos se describen en la **Tabla 8**. Respecto a estos resultados, en los valores de FA se observa diferencias ( $p= 0.007$ ) entre el grupo V y el grupo I (77.00 y 131.2 UI/L, respectivamente) respecto a los demás grupos. El grupo III y el grupo II (60.45 y 79.05 UI/L respectivamente) presentaron una disminución del nivel de AST respecto al grupo I ( $p= 0.007$ ; 195.5 UI/L), además, el grupo IV y V presentaron elevadas desviaciones estándar. Los niveles de ALT mostraron incrementos significativos en cuatro grupos (grupo II: 394.3 UI/L; grupo III: 762.1 UI/L; grupo IV: 859.4 UI/L; grupo V: 339.65 UI/L;  $p= 0.004$ ) respecto al grupo control (grupo I: 66.05 UI/L), siendo los grupos III y IV los que mostraron el mayor incremento, sin embargo, presentan elevadas desviaciones estándar. Los niveles de colesterol de los grupos II y III presentaron incrementos significativos ( $p= 0.007$ ; grupo II: 142.8 mg/dL; grupo III: 154.7 mg/dL) respecto al grupo control (grupo I: 86.75 mg/dL). El grupo I (control) presentó aumento significativo en el valor de triglicéridos ( $p= 0.012$ ; 262.8 mg/dL) respecto a los demás grupos ( $p= 0.012$ ; grupo II: 129.95 mg/dL; grupo III: 113.05 mg/dL; grupo IV: 112.3.3 mg/dL; grupo V: 134.85 mg/dL). Los valores de urea, BUN y creatinina no presentaron diferencias significativas.



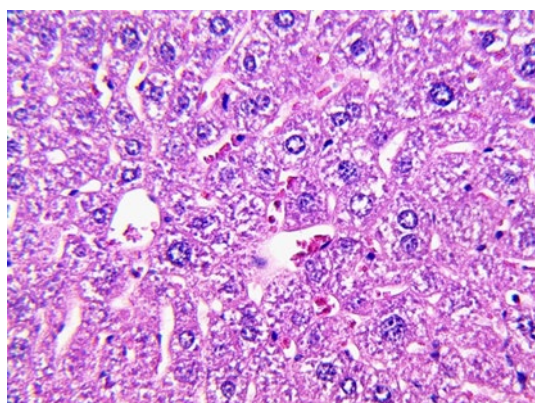
**Tabla 8.** Efectos de la mezcla de antiTB administrada vía i.g. durante 91 días sobre parámetros bioquímicos en ratones machos BALB/c.

Parámetro	Grupo I: Control	Grupo II: antiTB	Grupo III: antiTB + SM	Grupo IV: antiTB + AU/AO	Grupo V: SM
Creatinina (mg/dL)	0.26± 0.01	0.28± 0.01	0.32± 0.04	0.34± 0.00	0.28± 0.01
AST (UI/L)	195.5± 9.48 <sup>bc</sup>	79.05± 10.96	60.45± 6.01	162.8± 137.6	142.6± 117.38
ALT (UI/L)	66.05± 0.64 <sup>bcde</sup>	394.3± 60.10	762.1± 512.65	859.4±478.85	339.65± 92.56
Triglicéridos ( mg/dL)	262.8± 50.35 <sup>bcde</sup>	129.95± 11.81	113.05± 47.05	112.3± 32.53	134.85± 15.63
Colesterol (mg/dL)	86.75± 0.78 <sup>bcd</sup>	142.8± 6.36	154.7± 23.76	134.25± 13.65	106.75± 21.20
FA (UI/L)	131± 2.83	129± 4.24	122± 4.24	137.5± 7.78 <sup>e</sup>	77.00± 12.73
BUN (mg/dL)	28.5± 4.95	20.5± 0.71	24± 2.83	22.5± 4.95	30.5± 6.36
Urea (mg/dL)	60.85± 10.54	43.95± 1.77	51± 6.51	48.7± 10.32	56.05± 0.64

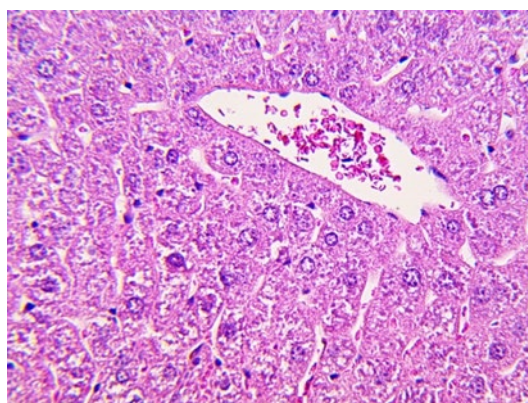
Datos presentados como la media ± su error estándar. Grupo I: Agua inyectable; Grupo II: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg solubilizado en agua inyectable; Grupo III: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + SM a 100 mg/kg en CMC al 0.5%; Grupo IV: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + AU/AO a 50 mg/kg en Tween 80 al 0.1%; Grupo V: SM a 200 mg/kg en CMC al 0.5%. Análisis estadístico (ANOVA) bifactorial de medias repetidas con pos hoc Student Nweman Keuls ( $p < 0.05$ ); vs <sup>a</sup>Grupo I; vs <sup>b</sup>Grupo II; vs <sup>c</sup>Grupo III; vs <sup>d</sup>Grupo IV; vs <sup>e</sup>Grupo IV; n=2.

En la **Figura 14** se observan los cortes histológicos de hígado. En los grupos II, III y IV se observan hepatocitos binucleados y macronúcleos, mientras que en los grupos I y V no se observan alteraciones. En la **Figura 15** se observan los cortes histológicos de riñón, el cual no presentan alteraciones.

Grupo I: Control

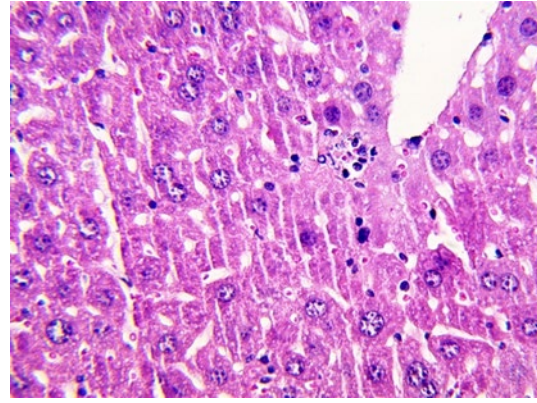
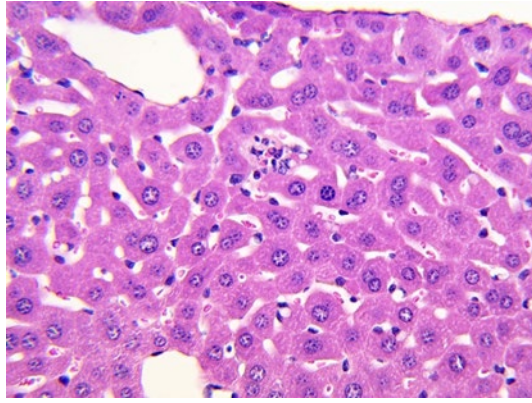


Grupo II: antiTB

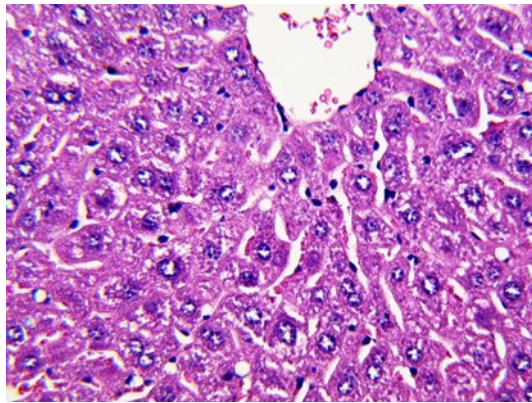


Grupo III: antiTB + SM

Grupo IV: antiTB + AU/AO

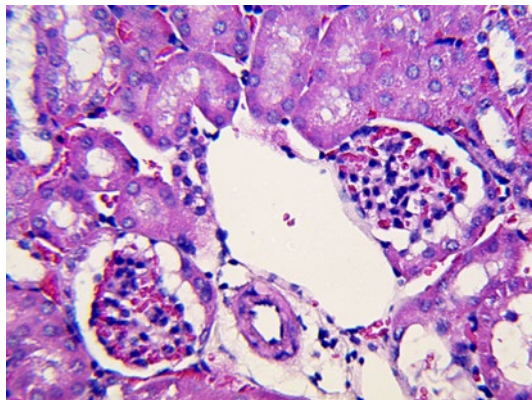


Grupo V: SM

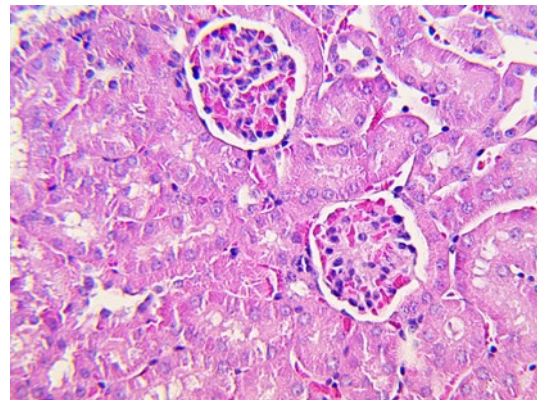


**Figura 14.** Cortes histológicos de hígado para la evaluación de la mezcla de antiTB administrada via i.g. durante 91 días en ratones macho BALB/c; Grupo I: Agua inyectable; Grupo II: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg solubilizado en agua inyectable; Grupo III: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + SM a 100 mg/kg en CMC al 0.5%; Grupo IV: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + AU/AO a 50 mg/kg en Tween 80 al 0.1%; Grupo V: SM a 200 mg/kg en CMC al 0.5%; n=2. Tinción con H&E a 40x.

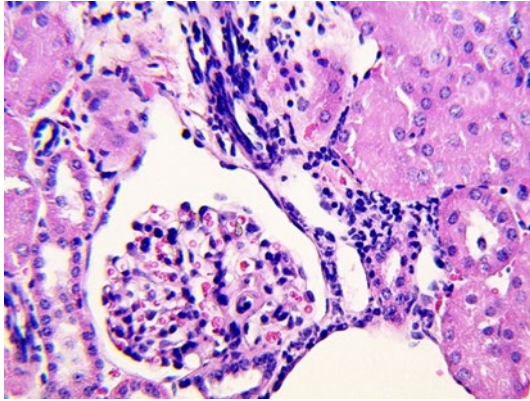
Grupo I: Control



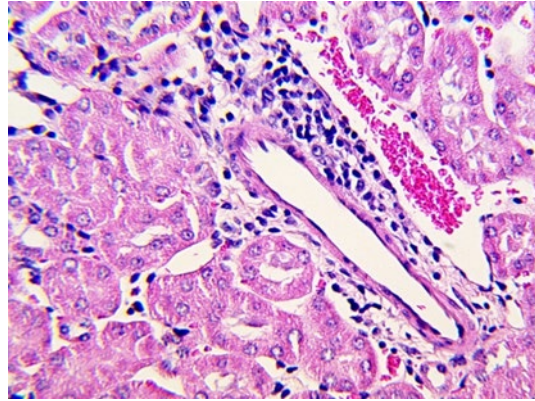
Grupo II: antiTB



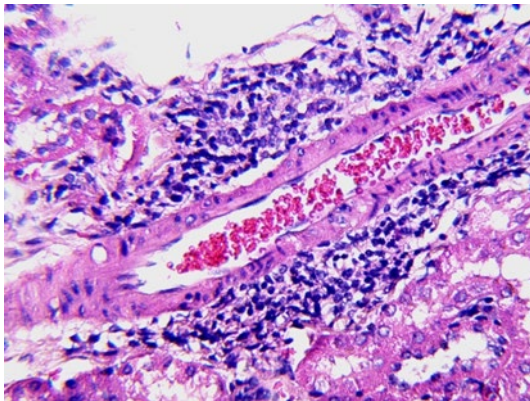
Grupo III: antiTB + SM



Grupo IV: antiTB + AU/AO



Grupo V: SM

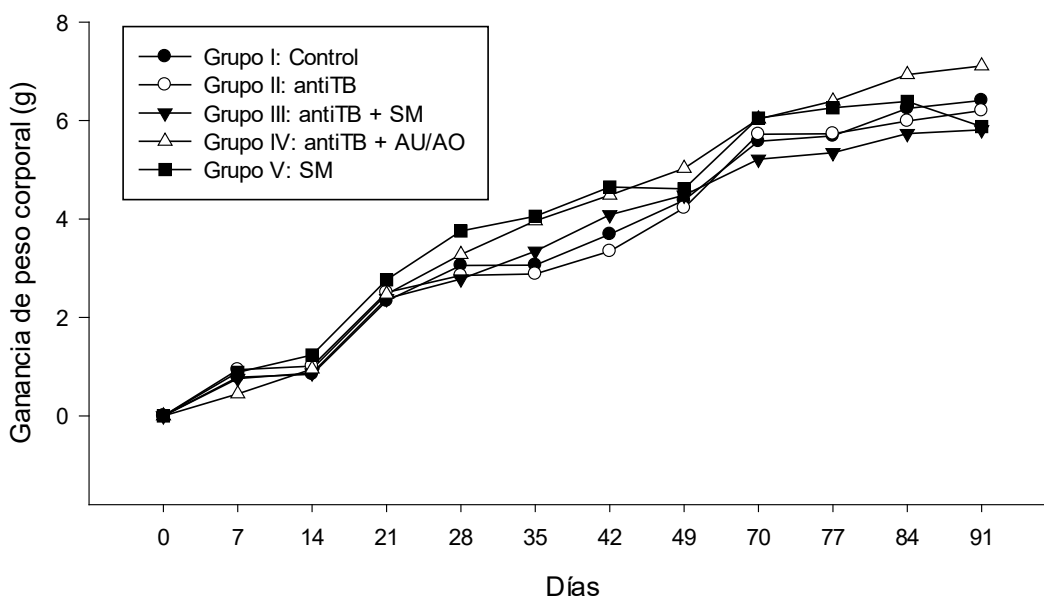


**Figura 15.** Cortes histológicos de riñón para la evaluación de la mezcla de antiTB administrada vía i.g. durante 91 días en ratones macho BALB/c; Grupo I: Agua inyectable; Grupo II: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg solubilizado en agua inyectable; Grupo III: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + SM a 100 mg/kg en CMC al 0.5%; Grupo IV: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + AU/AO a 50 mg/kg en Tween 80 al 0.1%; Grupo V: SM a 200 mg/kg en CMC al 0.5%; n= 2. Tinción con H&E a 40x.

### 5.6 Ensayo in vivo con AU/AO (Parte 3)

Para realizar este ensayo se formaron cinco grupos con n = 5: grupo I (Control), grupo II (antiTB), grupo III (antiTB + SM), grupo IV (antiTB + AU/AO) y grupo V (SM), los cuales fueron administrados durante 91 días y al finalizar el estudio, se tomaron muestras de órganos y suero de todos los animales. Los datos de GPC se muestran en la **Figura 16**; donde se observa que el grupo con mayor ganancia es el grupo IV (antiTB + AU/AO,  $7.11 \pm 0.81$  g), seguido del grupo I (control,  $6.41 \pm 0.86$  g), grupo II (antiTB,  $6.2 \pm 0.71$  g), grupo V (SM,  $5.88 \pm 0.98$  g), siendo el

grupo III (antiTB + SM) el que mostró menor GPC ( $5.81 \pm 1.07$  g); cabe señalar que ningún grupo presentó diferencias significativas.



**Figura 16.** Efectos de la mezcla de antiTB sobre la GPC en ratones macho BALB/C al ser administrada vía i.g. durante 91 días. Grupo I: Agua inyectable; Grupo II: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg solubilizado en agua inyectable; Grupo III: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + SM a 100 mg/kg en CMC al 0.5%; Grupo IV: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + AU/AO a 50 mg/kg en Tween 80 al 0.1%; Grupo V: SM a 200 mg/kg en CMC al 0.5%; n=5.

Al no haber diferencias en peso ni histológicas en corazón, estómago y bazo de los ensayos anteriores, se decidió que solo se pesarían y analizaría la histología del hígado y los riñones. Respecto al peso de los órganos, no se observaron diferencias significativas (**Tabla 9**), sin embargo, el peso del hígado del grupo V (1.59 g) se ve incrementado en comparación con el grupo I (1.35 g).

**Tabla 9.** Efectos de la mezcla de antiTB administrada vía i.g. durante 91 días sobre el peso de órganos en ratones macho BALB/c.

Peso de los órganos (g)					
Órgano	Grupo I: Control	Grupo II: antiTB	Grupo III: antiTB + SM	Grupo IV: antiTB + AU/AO	Grupo V: SM
Hígado	1.35± 0.11	1.37± 0.15	1.41± 0.2	1.39± 0.13	1.59± 0.19
Riñones	0.44± 0.05	0.42± 0.05	0.46± 0.05	0.44± 0.06	0.49± 0.07

Datos presentados como la media ± su error estándar. Grupo I: Agua inyectable; Grupo II: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg solubilizado en agua inyectable; Grupo III: INH:RIF:PZA a

75:150:150 mg/kg + SM a 100 mg/kg en CMC al 0.5%; Grupo IV: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + AU/AO a 50 mg/kg en Tween 80 al 0.1%; Grupo V: SM a 200 mg/kg en CMC al 0.5%; n=5.

En cuanto a los resultados de los parámetros bioquímicos, estos se muestran en la **Tabla 10**. Cabe mencionar que los valores obtenidos de ALT y AST son irregulares, ya que los valores del error estándar son más altos que el valor real o casi iguales, por lo que no se tomarán en cuenta en este estudio. En cuanto a la FA, se observó incremento significativo de los grupos III y IV respecto al grupo I ( $p=0.006$ ; grupo III: 141.40 UI/L; grupo IV: 141.40 UI/L vs grupo I: 91.40 UI/L). En los valores de los demás parámetros no presentan diferencias significativas; sin embargo, en el valor de creatinina, se observa que, mientras los valores son muy semejantes al grupo I (control; 0.21 mg/dL), el valor del grupo III presenta una ligera disminución (0.15 mg/dL). El valor de triglicéridos del grupo III se encuentra incrementado con respecto al grupo I (126.12 vs 85.30 mg/dL). El nivel de colesterol del grupo IV presenta un incremento respecto al grupo I (124.46 vs 101.06 mg/dL). En el caso de BUN y urea, los valores de todos los grupos se encuentran ligeramente disminuidos respecto a los valores del grupo I (control).

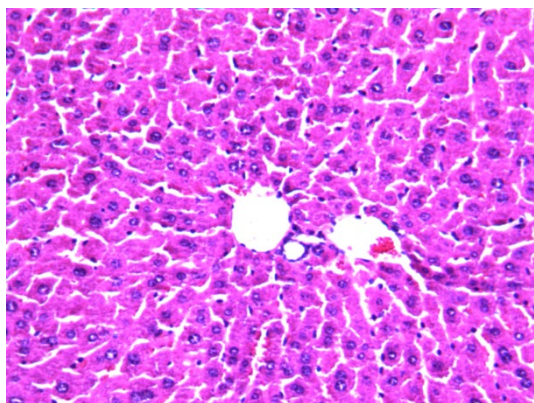
**Tabla 10.** Efectos de la mezcla de antiTB administrada vía i.g. durante 91 días sobre parámetros bioquímicos en ratones macho BALB/c.

Grupo	Grupo I: Control	Grupo II: antiTB	Grupo III: antiTB + SM	Grupo IV: antiTB + AU/AO	Grupo V: SM
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0.21± 0.02	0.18± 0.05	0.15± 0.02	0.21± 0.11	0.18± 0.08
<b>AST (UI/L)</b>	327.30± 236.01	424.44± 340.18	1668.60± 1200.48	1153.30± 502.26	588.92± 266.96
<b>ALT (UI/L)</b>	121.46± 145.44	252.10± 238.09	861.70± 514.72	768.62± 369.15	181.54± 82.00
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	85.30± 26.76	105.16± 16.50	126.12± 20.67	98.40± 30.66	87.22± 17.59
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	101.06± 10.20	120.70± 11.60	112.14± 4.03	124.46± 20.33	93.68± 5.47
<b>FA (UI/L)</b>	91.40± 28.38	116.80± 18.10	141.40± 25.13 <sup>ae</sup>	141.40± 32.68 <sup>ae</sup>	76.00± 9.14
<b>BUN (mg/dL)</b>	34.00± 3.54	28.00± 0.71	26.80± 2.59	29.00± 8.46	33.00± 6.20
<b>Urea (mg/dL)</b>	72.64± 7.50	59.78± 1.39	57.32± 5.51	61.40± 18.47	70.60± 12.99

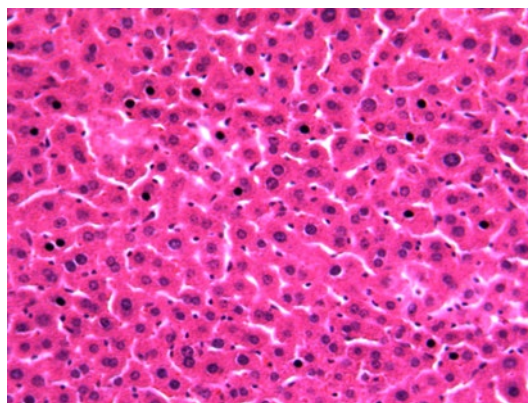
Datos presentados como la media ± su error estándar. Grupo I: Agua inyectable; Grupo II: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg solubilizado en agua inyectable; Grupo III: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + SM a 100 mg/kg en CMC al 0.5%; Grupo IV: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + AU/AO a 50 mg/kg en Tween 80 al 0.1%; Grupo V: SM a 200 mg/kg en CMC al 0.5%. Análisis estadístico (ANOVA) bifactorial de medias repetidas con pos hoc Student Newman Keuls ( $p<0.05$ ); vs <sup>a</sup>Grupo I; vs <sup>b</sup>Grupo II; vs <sup>c</sup>Grupo III; vs <sup>d</sup>Grupo IV; vs <sup>e</sup>Grupo V; n=10.

En el análisis histológico del hígado (**Figura 17**), se observa que los grupos II, III y IV presentan hepatocitos binucleados y macronúcleos, y en los grupos I y V no se observó alteraciones. En el análisis histológico de riñón (**Figura 18**) no se encuentran alteraciones.

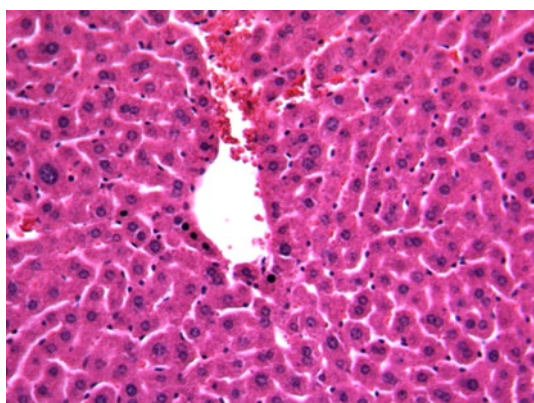
Grupo I: Control



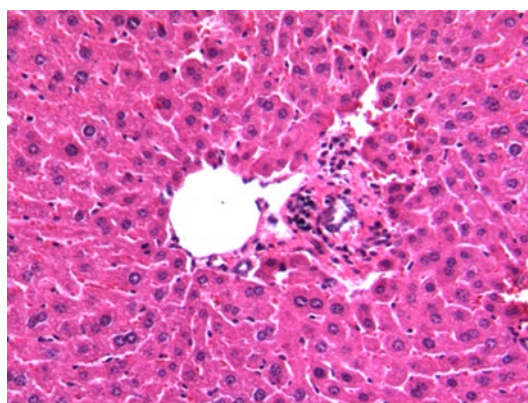
Grupo II: antiTB



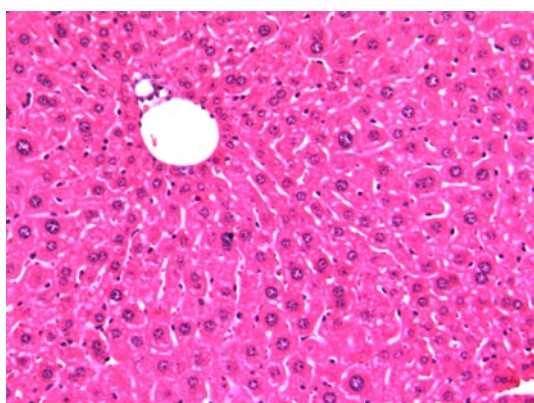
Grupo III: antiTB + SM



Grupo IV: antiTB + AU/AO

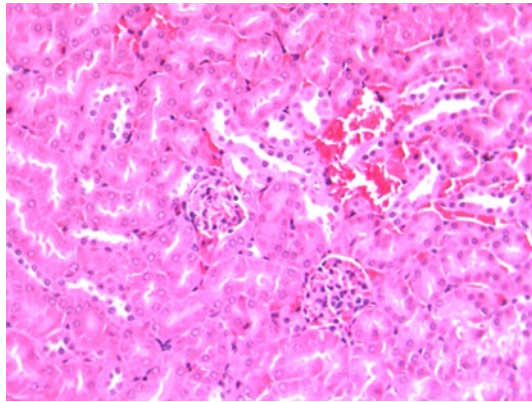


Grupo V: SM

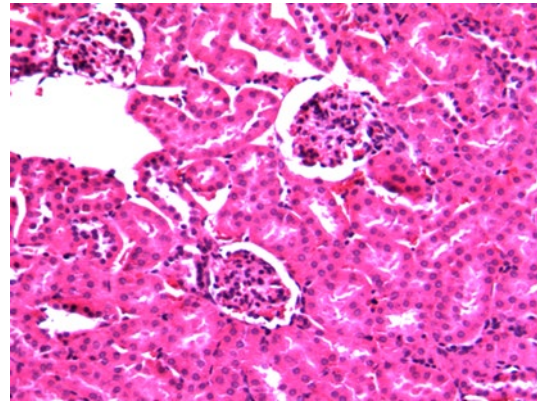


**Figura 17.** Cortes histológicos de hígado para la evaluación de la mezcla de antiTB administrada vía i.g. durante 91 días en ratones macho BALB/c; Grupo I: Agua inyectable; Grupo II: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg solubilizado en agua inyectable; Grupo III: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + SM a 100 mg/kg en CMC al 0.5%; Grupo IV: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + AU/AO a 50 mg/kg en Tween 80 al 0.1%; Grupo V: SM a 200 mg/kg en CMC al 0.5%; n=5. Tinción con H&E a 40x

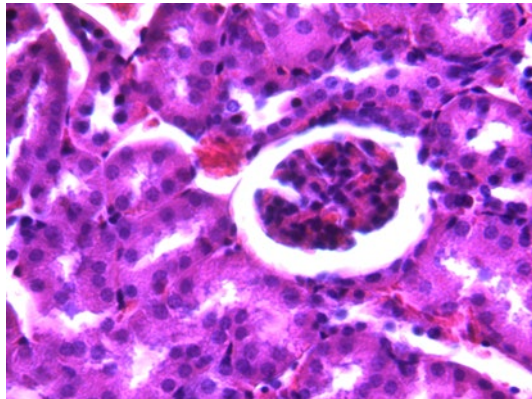
Grupo I: Control



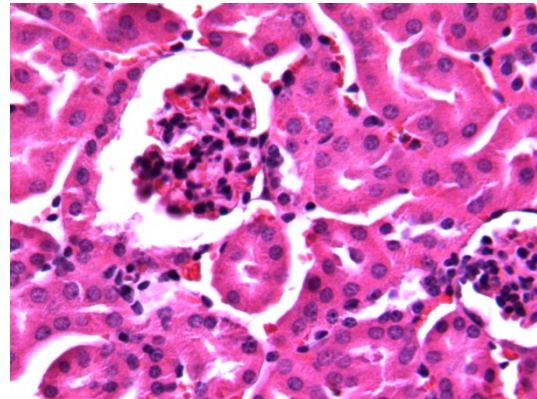
Grupo II: antiTB



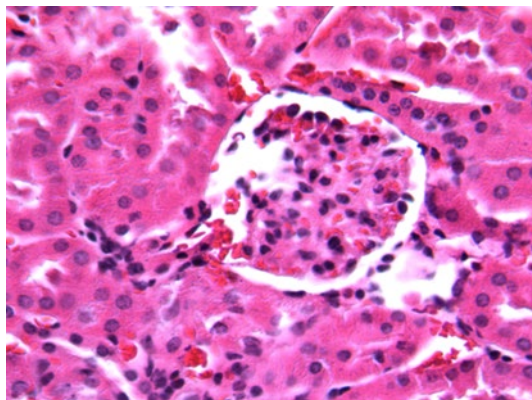
Grupo III: antiTB + SM



Grupo IV: antiTB + AU/AO



Grupo V: SM



**Figura 18.** Cortes histológicos de riñón para la evaluación de la mezcla de antiTB administrada vía i.g. durante 91 días en ratones macho BALB/c; Grupo I: Agua inyectable; Grupo II: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg solubilizado en agua inyectable; Grupo III: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + SM a 100 mg/kg en CMC al 0.5%; Grupo IV: INH:RIF:PZA a 75:150:150 mg/kg + AU/AO a 50 mg/kg en Tween 80 al 0.1%; Grupo V: SM a 200 mg/kg en CMC al 0.5%; n=5. Tinción con H&E a 40x.

## 6. Discusión

La mezcla de fármacos antiTB han sido empleados para inducir el daño hepático en modelos animales, empleando conejo (Jahan et al., 2015), ratas (Amir et al., 2016; Hussain et al., 2018; Mujahid et al., 2017) y ratones (Bailón-Martínez, 2016; Gutiérrez-Rebolledo et al., 2016; Shabbir et al., 2020); los cuales se han desarrollado con el fin de evaluar el efecto hepatoprotector de sustancias puras y extractos de plantas medicinales. La combinación INH:RIF es la mezcla más empleada para desarrollar este tipo de investigación (Martin y Sabina, 2016; Mohan et al., 2018; Prince et al., 2019; Salama et al., 2018), y son pocos los trabajos donde describen el empleo de la mezcla INH:RIF:PZA (Bailón-Martínez et al, 2016; Gutiérrez-Rebolledo et al., 2016; Siordia-Reyes et al., 2021), a pesar que se ha demostrado que PZA es el fármacos que causa mayor efecto hepatotóxico (Gafar et al., 2019; Zhao et al., 2017). Dentro de los estudios que han utilizado la mezcla INH:RIF:PZA, han empleado la dosis de 10:10:30 mg/kg respectivamente, administrado por vía oral diariamente. Sin embargo, a esta dosis no se observa claramente un efecto hepatotóxico. En el presente estudio se decidió incrementar la dosis utilizando como base la dosis empleada por Bello-Monroy et al., 2019, quienes administraron la dosis de INH:RIF a 75:150 mg/kg diariamente durante 90 días, y sumando la PZA a dosis de 150 mg/kg.

En el primer ensayo, se observa que esta mezcla (INH:RIF:PZA) a dosis elevada (75:150:150 mg/kg) administrada diariamente durante 30 días, provocó menor GPC en comparación con el grupo control (4.29 vs 3.73 g) sin ser estadísticamente significativo. En cuanto al peso de los órganos, tanto el hígado como los riñones de los animales del grupo II (antiTB), fueron ligeramente mayor; sin embargo, al momento de ver los resultados de los parámetros bioquímicos, se observa que, si bien, la AST no se vio afectada, los niveles de ALT y FA fueron mayores en el grupo antiTB respecto al grupo I (control), dato que concuerda con el análisis histológico del hígado, donde se observó ligera esteatosis localizada en el grupo II (antiTB). Estos resultados, concuerdan con lo observado anteriormente en otros estudios (Bailón-Martínez et al., 2016; Gutiérrez-Rebolledo et al., 2016).



También, en este proyecto se empleó SM a mayor dosis (100 mg/kg), como control positivo, ya que esta sustancia es muy empleada como control positivo en la búsqueda de nuevos agentes hepatoprotectores (Hussain et al., 2018; Mujahid et al., 2017; Ulla et al., 2016). Se ha reportado que reduce los niveles de enzimas hepáticas y reduce la esteatosis en animales con daño hepático inducido con INH:RIF:PZA. En un estudio anterior, donde evaluaron el efecto hepatoprotector de triterpenos y antiTB, se utilizó SM a dosis de 2.5 mg/kg (Bailón-Martínez, 2016), y en donde, los animales tratados con antiTB + SM presentaron microabscesos, infiltrado linfocítico e infiltrado inflamatorio, mientras que la GPC fue menor al de los grupos administrados con antiTB + AU/AO y antiTB. Sin embargo, revisando en la literatura, se encontró que en algunos estudios realizados en ratones Balb/C, utilizan la SM a la dosis de 100 mg/kg (Domitrović et al., 2015; Kim et al., 2016; Sozmen et al., 2013), por lo que decidimos emplear esta dosis. Para ello, realizamos un estudio para probar esta dosis y observamos que la GPC fue igual entre los grupos II (antiTB) y III (antiTB + SM) y estos fueron mayores respecto al control, (grupo I) pero no mostraron diferencia significativa. En cuanto al peso de los órganos, se pudo apreciar que el peso del hígado y de los riñones del grupo II (antiTB) fue mayor respecto a los otros dos grupos (I y III); estos dos últimos grupos mostraron pesos similares; resultados que al compararlos con los del análisis histológico, se observa que hay esteatosis ligera localizada en el hígado del grupo II (antiTB) y en el grupo III (antiTB + SM) se observó esteatosis mínima, dada la capacidad hepatoprotectora de la SM, observada en los estudios previamente citados. La SM a dosis elevada es segura para administrarse en estudios crónicos (90 días, administrado tres veces a la semana) ya que tiene la capacidad de proteger al hígado y durante este periodo no murió ningún animal.

En un estudio previo se evaluó la mezcla de AU/AO a la dosis de 100 mg/kg y 200 mg/kg; sin embargo, esta dosis causó problemas en vías urinarias (Bailón-Martínez, 2016) aunado a que en este estudio se encontró que, a esa dosis, los triterpenos presentaban problemas de solubilidad en el vehículo empleado (CMC al 0.05%). Por esta razón, se decidió disminuir la dosis a 50 mg/kg y utilizar Tween 80 al 0.1% como vehículo; además, en este experimento se agregó un grupo de animales administrados con SM a una dosis elevada de 200 mg/kg,

para observar si la dosis alta provoca efectos tóxicos. Este estudio estaba programado a 90 días; sin embargo, tuvo una duración de 50 días, dado la emergencia sanitaria causada por la COVID-19. En la GPC se observan resultados poco esperados dado los resultados previos obtenidos por Bailón-Martínez (2016) y Gutiérrez-Rebolledo y colaboradores (2016), pues la GPC del grupo I (control) es muy similar al observado en el grupo II (antiTB), mientras que el grupo IV (antiTB + AU/AO) fue el que mostró la menor GPC; el grupo III (antiTB + SM) fue el grupo con mayor GPC, seguido por el grupo V (SM). En cuanto al peso de hígado y riñones, se observó ligero incremento en el peso de estos órganos el grupo II (antiTB) respecto al resto de los otros grupos, resultados esperados según estudios previos citados anteriormente. En el análisis histológico se puede apreciar que la mezcla de AU/AO (grupo IV, antiTB + AU/AO) protege la aparición de esteatosis, incluso mejor que la SM (grupo III: antiTB + SM), cabe resaltar que la SM a alta dosis (grupo V) provocó esteatosis localizada, algo que no se había reportado hasta el momento. En los grupos I (antiTB), II (antiTB + SM), III (antiTB + AU/AO), presentaron hepatocitos binucleados y macronúcleos, siendo más abundantes en el grupo II (antiTB), algo no reportado en este tipo de estudios, pero que indican procesos de regeneración en el hígado después de haber sufrido daño (Miyaoka et al., 2012).

El siguiente ensayo tuvo una duración de 91 días, se emplearon los mismos grupos que en el estudio anterior. Se observa que el grupo II (antiTB) fue el que presentó la mayor GPC, la cual fue significativamente mayor respecto al grupo control (6.34 g vs 3.79 g), el grupo V (antiTB + AU/AO) y el grupo III (antiTB + SM) también presentaron buena GPC (5.88 g y 4.91 g, respectivamente) en comparación con el grupo control, mientras que el grupo con menor GPC fue el V (SM) con apenas 2.22 g, siendo menor al valor observado en el grupo control (6.34 g). No se observaron diferencias significativas en los pesos de los órganos; sin embargo, se puede observar que el peso del hígado del grupo IV (antiTB + AU/AO) fue mayor respecto al grupo control (1.85 g vs 1.65 g), mientras que el peso de los otros grupos fue muy similar al del grupo control. En cuanto al peso de los riñones, se presenta que el peso del grupo V (SM) y grupo III (antiTB + SM) son mayores respecto al grupo control (0.54 g y 0.52 g respectivamente vs 0.44 g). En cuanto a la bioquímica clínica, se observa que el valor de AST del

grupo control (195.5 UI/L) fue mayor que el de los demás grupos, mientras que los grupos III (antiTB + AU/AO) y II (antiTB) fueron los que presentaron los valores más bajos (60.45 y 79.05 UI/L, respectivamente). Los valores de ALT de los grupos III (antiTB + AU/AO) y IV (antiTB + SM) se encuentran muy por arriba del grupo control (762.5 y 859.4 UI/L vs 66.05 UI/L); sin embargo, las desviaciones estándar de estos grupos son muy altas (512.65 y 478.85), por lo que no se tomaron en cuenta. Tanto el grupo II (antiTB) y V (SM) también muestran incremento en la ALT respecto al grupo control (394.3 y 339.65 UI/L vs 66.05 UI/L). En los valores de la FA, los grupos presentan valores similares al grupo control, excepto por el grupo V (SM), el cual es menor al grupo control (77 UI/L vs 131 UI/L). En cuanto al análisis histológico, se observa que los grupos II (antiTB), III (antiTB + SM) y IV (antiTB + AU/AO) presentan mayor cantidad de células binucleadas y macronúcleos en el hígado en comparación con los grupos I (control) y V (SM), los cuales no presentaron alteraciones; estos hallazgos se observan en el tejido hepático en regeneración como respuesta posterior a un daño. En el tejido renal no se observaron cambios.

El siguiente ensayo, se formaron los mismos grupos de estudio que el anterior con duración de 91 días. En la GPC no se observaron diferencias significativas; el grupo IV (antiTB + AU/AO) fue el único que mostró mayor GPC respecto al grupo control (7.11 g vs 6.41 g), mientras que el grupo III (antiTB + SM) fue el que tuvo menor GPC (5.81 g). Tampoco se observaron diferencias significativas en el peso de los órganos; sin embargo, el peso del hígado del grupo V (SM) está incrementado en comparación con el grupo control (1.59 g vs 1.35 g); el peso de los riñones es muy parecido entre los grupos. Respecto a los valores de bioquímica clínica, los valores de ALT y AST, al presentar elevadas desviaciones estándar, no se tomaron en cuenta en el análisis. La FA de los grupos III (antiTB + SM) y IV (antiTB + AU/AO) presentan incrementos significativos respecto al grupo control (FA: 141.40 y 141.40 UI/L vs 91.40 UI/L). En los valores de los demás parámetros no hubo diferencias estadísticas, pero se puede observar que los triglicéridos del grupo III (antiTB + SM) se encuentra incrementado con respecto al grupo control (126.12 mg/dL vs 85.30 mg/dL); mientras que el valor de colesterol del grupo IV (antiTB + AU/AO) presentó un incremento respecto al grupo control (126.46 mg/dL vs 101.06 mg/dL). En el caso de la creatinina, se

observa que, mientras los valores de los otros grupos son muy semejantes al del grupo control, el grupo III (antiTB + SM) presenta una ligera disminución respecto al grupo control (0.21 mg/dL vs 0.15 mg/dL). Tanto BUN como urea, los valores son muy similares a los del grupo control.

En el análisis histológico de hígado se observa que los grupos II (antiTB), III (antiTB + SM) y IV (antiTB + AU/AO) se observan células binucleadas y macronúcleos en el hígado, siendo más abundantes en el grupo II (antiTB), seguido de los grupos III (antiTB + SM) y IV (antiTB + AU/AO), lo que indica que el tejido hepático se encuentra en un proceso de regeneración a través de la división celular, mientras que los grupos I (control) y V (SM) no presentaron alteraciones. La histología del riñón no presentó alteraciones.

Los resultados encontrados en estos últimos tres experimentos difieren a los observados anteriormente en estudios similares, esto puede ser por el cambio de la frecuencia de administración de los fármacos que pasó de ser diaria a ser de tres veces por semana; por lo tanto, los daños provocados por los fármacos antiTB no fueron tan evidentes como en estudios previos donde la administración fue diaria, en donde se observa esteatosis de moderada a intensa como principal alteración, y que se ve acompañada de incrementos de ALT, AST y FA presentes en el suero.

## **7. Conclusiones**

En la hipótesis de este estudio se plantea el demostrar en efecto hepato y nefroprotector de los triterpenos ante el daño causado por los fármacos antiTB, sin embargo, los resultados no fueron concluyentes para determinar si son o no hepatoprotectores, dado que ni siquiera los animales tratados solo con antiTB presentaron el daño esperado en el tejido hepático, pues en estudios anteriores se había observado presencia de esteatosis acompañada de incremento en los niveles de enzimas hepáticas en el suero. Esto pudo deberse al cambio de la frecuencia de administración, que, en vez de ser diaria, pasó a ser tres veces por semana, a pesar de haber incrementado la dosis de los fármacos antiTB en más del doble por administración. Sin embargo, se observaron indicios de

regeneración tisular, tales como gran cantidad de hepatocitos binucleados y macronúcleos en el hígado en los grupos administrados con antiTB, antiTB + AU/AO y antiTB + SM, presentándose en menor cantidad en los últimos dos grupos, lo que puede sugerir que el hígado de dichos grupos sufrió un menor daño. Para hacer una mejor evaluación de los triterpenos, se deberá realizar el estudio con administración diaria, pues el hígado fue capaz de metabolizar sin problemas altas dosis de antiTB cuando la frecuencia de administración fue cada tercer día. En cuanto al efecto nefroprotector, no se encontraron alteraciones en ninguno de los estudios.

En la evaluación de la dosis alta de SM, en el estudio a 50 días se observa esteatosis ligera, sin embargo, en los dos estudios posteriores a 91 días, ninguno de los animales administrado con esta dosis, presentó alteraciones tisulares en el hígado, demostrando así que no tiene efectos tóxicos.

## REFERENCIAS

- Abbara A, Chitty S, Roe JK, Ghani R, Collin SM, Ritchie A, Kon OM, Dzvoza J, Davidson H, Edwards TE, Hateley C, Routledge M, Buckley J, Davidson RN, John L. Drug-induced liver injury from antituberculous treatment: a retrospective study from a large TB centre in the UK. *BMC Infectious Diseases* 2017;17:231-240.
- Abood WN, Bradosty SW, Shaikh FK, Salehen NA, Farghadani R, Agha NFS, Al-Medhtiy MH, Kamil TDA, Agha AS, Abdulla MA. *Garcinia mangostana* peel extracts exhibit hepatoprotective activity against thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. *Journal of Functional Foods* 2020;74:104200.
- Adamu BA, Emiru YK, Sintayehu B, Araya EM, Periasamy G, Gebrelibanos Hiben M. In vivo hepatoprotective and in vitro radical scavenging activities of extracts of *Rumex abyssinicus* Jacq. rhizome. *Journal of Experimental Pharmacology* 2020;12:221-231.
- Ahmad G, Masoodi MH, Tabassum N, Mir SA, Iqbal MJ. In vivo hepatoprotective potential of extracts obtained from floral spikes of *Prunella vulgaris* L. *Journal Ayurveda Integrative Medicine* 2020;31:S0975-9476(19)30344-4.
- Ahmed MM, Velayati AA, Mohammed SH. Epidemiology of multidrug-resistant, extensively drug resistant, and totally drug resistant tuberculosis in middle east countries. *International Journal of Mycobacteriology* 2016;5(3):249–256.
- Amir M, Khan MA, Ahmad S, Akhtar M, Mujeeb M, Ahmad A, Akhtar M, Ahmad A, Khan SA, Al-Abbasi FA. Ameliorating effects of *Tamarindus indica* fruit extract on anti-tubercular drugs induced liver toxicity in rats. *Natural Product Research* 2016;30(6):715-719.
- Augenstreich J, Haanappel E, Ferré G, Czaplicki G, Jolibois F, Destainville N, Guilhot C, Milon A, Astarie-Dequeker C, Chavent M. The conical shape of DIM lipids promotes *Mycobacterium tuberculosis* infection of macrophages. En Klein ML, eds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2019;116(51):25649-25658.

- Ayeleso T, Matumba M. Oleanolic acid and its derivatives: Biological activities and therapeutic potential in chronic diseases. *Molecules* 2017;22(11):e1915.
- Bailo R, Bhatt A, Aínsa JA. Lipid transport in *Mycobacterium tuberculosis* and its implications in virulence and drug development. *Biochemical Pharmacology* 2015;96(3):159-67.
- Bailón-Martínez DJ, Jiménez-Arellanes MA. Efecto hepatoprotector de compuestos naturales, productos biológicos y extractos de plantas medicinales contra el daño provocado por fármacos antituberculosos (Parte II). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 2018;49(1):7-23.
- Bailón-Martínez DJ. Evaluación del efecto hepatoprotector de *Rosmarinus officinalis* y la mezcla de triterpenos contra el daño inducido por fármacos antituberculosos [Tesis de maestría]. Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México; 2016.
- Beebe A, Seaworth B, Patil N. Rifampicin-induced nephrotoxicity in a tuberculosis patient. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases* 2015;1:13-15.
- Bello-Monroy O, Mata-Espinosa D, Enríquez-Cortina C, Souza V, Miranda RU, Bucio L, Barrios-Payán J, Marquina-Castillo B, Rodríguez-Ochoa I, Rosales P, Gutiérrez-Ruiz MC, Hernández-Pando R, Gomez-Quiroz LE. Hepatocyte growth factor enhances the clearance of a multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain by high doses of conventional chemotherapy, preserving liver function. *Journal of Cellular Physiology* 2019;235(2):1637-1648.
- Bicalho MD, Soares DB, Botoni FA, Reis AMM, Martins MAP. Drug-induced nephrotoxicity and dose adjustment recommendations: Agreement among four drug information sources. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2015;12:11227-11240.
- Björnsson E. Hepatotoxicity by drugs: the most common implicated agents. *International Journal of Molecular Sciences* 2016;17(2):224-230.
- Bouazzi O, Hammi S, Bourkadi JE, Tebaa A, Tanani DS, Soulaymani-Bencheikh R, Bengueddour R. First line anti-tuberculosis induced

hepatotoxicity: incidence and risk factors. *The Pan African Medical Journal* 2016;25:167-177.

- Chakraborty S, Rhee KY. Tuberculosis drug development: History and evolution of the mechanism-based paradigm. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2015;5(8):a021147.
- Chang CH, Chen YF, Wu VC, Shu CC, Lee CH, Wang JY, Lee LN, Yu CJ. Acute kidney injury due to anti-tuberculosis drugs: a five-year experience in an aging population. *BMC Infectious Diseases* 2014;14(1):23.
- Chen M, Suzuki A, Borlak J, Andrade RJ, Lucena MI. Drug-induced liver injury: Interactions between drug properties and host factors. *Journal of Hepatology* 2015;63:503-514.
- Cho I, Kim J, Jung J, et al. Hepatoprotective effects of hoveniae semen cum fructus extracts in ethanol intoxicated mice. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry* 2016;20(1):49-64.
- Clichico S, Olteanu D, Nagy AL, Oros A, Filip A, Mircea PA. Silymarin inhibits the progression of fibrosis in the early stages of liver injury in CCl<sub>4</sub>-treated rats. *Journal of Medicinal Food* 2015;18(3):290-8.
- Collins KS, Raviele ALJ, Elchynski AL, Woodcock AM, Zhao Y, Cooper-DeHoff RM, Eadon MT. Genotype-Guided Hydralazine Therapy. *American Journal of Nephrology* 2020;51(10):764-776.
- Das SK, Mukherjee S. Biochemical and immunological basis of silymarin effect, a milk thistle (*Silybum marianum*) against ethanol-induced oxidative damage. *Toxicology Mechanisms and Methods* 2012;22(5):409-13.
- Dheda K, Gumbo T, Maartens G, Dooley KE, McNerney R, Murray M, Furin J, Nardell EA, London L, Lessem E, Theron G, van Helden P, Niemann S, Merker M, Dowdy D, Van Rie A, Siu GKH, Pasipanodya JG, Rodrigues C, Clark TG, Sigel FA, Esmail A, Lin HH, Atre SR, Schaaf HS, Chang KC, Lange C, Nahid P, Udwadia ZF, Horsburgh Jr CR, Churchyard GJ, Menzies D, Hesselink AC, Nuermberger E, McIlleron H, Fennelly KP, Goemaere E, Jaramillo E, Low Marcus, Morán Jara C, Padayatchi N, Warren RM. The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and



- incurable tuberculosis. *The Lancet Respiratory Medicine* 2017;5(4):291–360.
- Dheda K, Barry CE, Maartens G. Tuberculosis. *The Lancet* 2016;387(10024):1211–1226.
  - Domitrović R, Rashed K, Cvijanović O, Vladimir-Knežević S, Škoda M, Višnić A. Myricitrin exhibits antioxidant, anti-inflammatory and antifibrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice. *Chemico-biological Interactions* 2015;230:21-29.
  - Erwin ER, Addison AP, John SF, Olaleye OA, Rosell RC. Pharmacokinetics of isoniazid: The good, the bad, and the alternatives. *Tuberculosis* 2019;116:S66-S70.
  - Evan Prince S, Udhaya LB, Sunitha PS, Arumugam G. Reparation of isoniazid and rifampicin combinatorial therapy-induced hepatotoxic effects by *Bacopa monnieri*. *Pharmacology* 2016;98(1-2):29-34.
  - Gafar F, Arifin H, Jurnalys YD, Yani FF, Fitria N, Alffenaar JWC, Wilffert B. Antituberculosis drug-induced liver injury in children: Incidence and risk factors during the two-month intensive phase of therapy. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2019;38:50-53.
  - González RA. Obtención de compuestos antimicobacterianos a partir del extracto metanólico de *Rosmarinus officinalis* [Tesis de licenciatura]. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México; 2012.
  - Gordon SV, Parish T. Microbe profile: *Mycobacterium tuberculosis*: humanity's deadly microbial foe. *Microbiology* 2018;164(4):437-439.
  - Grattagliano I, Diogo CV, Mastrodonato M, de Bari O, Persichella M, Wang DQ, Liquori A, Ferri D, Carratù MR, Oliveira PJ, Portincasa P. A silybin-phospholipids complex counteracts rat fatty liver degeneration and mitochondrial oxidative changes. *World Journal of Gastroenterology* 2013;19(20):3007-17. Gutiérrez-Rebolledo G, Siordia-Reyes G, Meckes-Fischer M, Jiménez-Arellanes A. Hepatoprotective properties of oleanolic and ursolic in antitubercular drug-induced liver damage. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2016;9(7):644-651.
  - Hermenean A, Stan M, Ardelean A, Pilat L, Mihali CV, Popescu C, Nagy L, Deák G, Zsuga M, Kéki S, Bácskay I, Fenyvesi F, Costache M,

- Dinischiotu A, Vecsernyés, M. Antioxidant and hepatoprotective activity of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) seed oil. *Open Life Sciences* 2015;10(1):225-236.
- Hussain T, Subaiea GM, Firdous H. Hepatoprotective evaluation of *Trapa natans* against drug-induced hepatotoxicity of antitubercular agents in rats. *Pharmacognosy Magazine* 2018;14(54):180-185.
  - Hussein OE, Germoush MO, Mahmoud AM. *Ruta graveolens* protects against isoniazid/rifampicin-induced nephrotoxicity through modulation of oxidative stress and inflammation. *Global Journal of Biotechnology and Biomaterial Science* 2016;1(1):017-022.
  - Jahan S, Khan M, Imran S, Sair M. The hepatoprotective role of Silymarin in isoniazid induced liver damage of rabbits. *Journal of Pakistan Medical Association* 2015;65(6):620-2.
  - Jesus JA, Lago JHG, Laurenti MD, Yamamoto ES, Passero LFD. Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids: An update. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015;2015:1-14.
  - Jiménez-Arellanes MA, Gutiérrez-Rebolledo GA, Meckes-Fischer M, León-Díaz R. Medical plant extracts and natural compounds with a hepatoprotective effect against damage caused by antitubercular drugs: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2016;9(12):1141-1149.
  - Jiménez-Arellanes A, Meckes M, Torres J, Luna-Herrera J. Antimycobacterial triterpenoids from *Lantana hispida* (Verbenaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 2007;111(2):202-205.
  - Jiménez-Arellanes MA, Meckes M, Alvarez V, Torres J, Parra R. Secondary metabolites from *Chamaedora tepejilote* (Palmae) are active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Phytotherapy Research* 2005;19(4):320-322.
  - Khajotia RR. Totally Drug Resistant Tuberculosis (TDR-TB): Has its Existence been Conclusively Proved?. *ECronicon: Pulmonology and Respiratory Medicine* 2018;7:231-232.
  - Kim SH, Oh DS, Oh JY, Son TG, Yuk DY, Jung YS. Silymarin prevents restraint stress-induced acute liver injury by ameliorating oxidative stress and reducing inflammatory response. *Molecules* 2016;21(4):443.

- Kotsampasakou E, Montanari F, Ecker GF. Predicting drug-induced liver injury: The importance of data curation. *Toxicology* 2017;389:139-145.
- Luangchosiri C, Thakkinstian A, Chitphuk S, Stitchantrakul W, Petraksa S, Sobhonslidsuk A. A double-blinded randomized controlled trial of silymarin for the prevention of antituberculosis drug-induced liver injury. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2015;15(1):334.
- López-Hortas L, Pérez-Larrán P, González-Muñoz MJ, Falqué E, Domínguez H. Recent developments on the extraction and application of ursolic acid. A review. *Food Research International* 2018;103:130-149.
- Lozano-Sepulveda SA, Bryan-Marrugo OL, Cordova-Fletes C, Gutierrez-Ruiz MC, Rivas-Estilla AM. Oxidative stress modulation in hepatitis C virus infected cells. *World Journal of Hepatology* 2015;7(29):2880-9.
- Lyon SM, Rossman MD. Pulmonary tuberculosis. *Microbiology Spectrum* 2017;5(1):TNMI7-0032-2016.
- Ma JQ, Ding J, Zhang L, Liu CM. Ursolic acid protects mouse liver against CCl<sub>4</sub>-induced oxidative stress and inflammation by the MAPK/NF- $\kappa$ B pathway. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2014;37(3):975-83.
- Mancha-Ramirez AM, Slaga TJ. Ursolic acid and chronic disease: an overview of UA's effects on prevention and treatment of obesity and cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2016;928:75-96.
- Martin SJ, Sabina EP. Amelioration of anti-tuberculosis drug induced oxidative stress in kidneys by *Spirulina fusiformis* in a rat model. *Renal Failure* 2016;38(7):1115-1121.
- Mayer-Barber KD, Barber DL. Innate and Adaptive Cellular Immune Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2015;a018424.
- Metushi I, Uetrecht J, Phillips E. Mechanism of isoniazid-induced hepatotoxicity: then and now. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2016;81(6):1030-1036.
- Mohan MSG, Ramakrishnan T, Mani V, Achary A. Protective effect of crude sulphated polysaccharide from *Turbinaria ornata* on isoniazid rifampicin induced hepatotoxicity and oxidative stress in the liver, kidney

- and brain of adult Swiss albino rats. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 2018;55:237-244.
- Mujahid M, Hussain T, Siddiqui HH, Hussain A. Evaluation of hepatoprotective potential of *Erythrina indica* leaves against antitubercular drugs induced hepatotoxicity in experimental rats. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine* 2017;8(1):7-12.
  - Mukherjee A, Lodha R, Kabra SK. Pharmacokinetics of First-Line Anti-Tubercular Drugs. *The Indian Journal of Pediatrics* 2019;86(5):468-478.
  - Miyaoka Y, Ebato K, Kato H, Arakawa S, Shimizu S, Miyajima A. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Current Biology* 2012;22(13):1166-75.
  - Nagarajan S, Whitaker P. Management of adverse reactions to first-line tuberculosis antibiotics. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2018;18(4):333-341.
  - Nwidi LL, Elmorsy E, Oboma YI, Carter WG. Hepatoprotective and antioxidant activities of *Spondias mombin* leaf and stem extracts against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Journal of Taibah University Medical Sciences* 2018;13(3):262-271.
  - Parida SK, Axelsson-Robertson R, Rao MV, Singh N, Master I, Lutckii A, Keshavjee S, Andersson J, Zumla A, Maeurer M. Totally drug-resistant tuberculosis and adjunct therapies. *Journal of Internal Medicine* 2015;277(4):388-405.
  - Perwitasari DA, Irham LM, Darmawan E, Mulyani UA, Atthobari J. CYP2E1 polymorphism, acetylator profiles and drug-induced liver injury incidence of Indonesian tuberculosis patients. *Indian Journal of Tuberculosis* 2016;63(3):139–143.
  - Pinto R, Nambiar JK, Leotta L, Counoupas C, Britton WJ, Triccas JA. Influence of phthiocerol dimycocerosate on CD4(+) T cell priming and persistence during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis* 2016;99:25-30.
  - Prince SE, Martin SJ, Lavinya BU, Selvanathan K, Geetha A. Anti-tuberculosis drug-induced oxidative stress in kidneys: Role of brahmi as

- an antioxidant supplement. *Pharmacognosy Magazine* 2019;15(62):12-16.
- Rodríguez-Flores EM, Mata-Espinosa D, Barrios-Payan J, Marquina-Castillo B, Castañón-Arreola M, Hernández-Pando R. A significant therapeutic effect of silymarin administered alone, or in combination with chemotherapy, in experimental pulmonary tuberculosis caused by drug-sensitive or drug-resistant strains: in vitro and in vivo studies. *PLoS One* 2019;14(5):e0217457.
  - Sabina EP, Peter SJ, Geetha A. A comparison of hepatoprotective activity of Bacoside to Silymarin treatment against a combined Isoniazid and Rifampin-induced hepatotoxicity in female Wistar rats. *Journal of Histotechnology* 2019;42(3):128-136.
  - Salama AAA, Fayed AHM, Attia TA, Seham E, Ismaiel IE, Hassan A. Protective Effects of Moringa oleifera extract on Isoniazid and Rifampicin Induced Hepatotoxicity in Rats: Involvement of Adiponectin and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . *Egyptian Journal of Veterinary Sciences* 2018;49(1):25-34.
  - Sakamoto K. The pathology of Mycobacterium tuberculosis infection. *Veterinary Pathology* 2012;49(3):423-439.
  - Sarkar S, Ganguly A. Current overview of anti-tuberculosis drugs: Metabolism and toxicities. *Mycobacterial Diseases* 2016;6(209):2161-1068.
  - Scordo JM, Daren LK, and Jordi B. Alveolar epithelial cells in Mycobacterium tuberculosis infection: active players or innocent bystanders?. *Journal of Innate Immunity* 2016;8(1):3-14.
  - Seaworth BJ, Griffith DE. Therapy of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *Microbiology Spectrum* 2017;5(2):1-28.
  - Singh P, Kant S, Gaur P, Tripathi A, y Pandey S. Extra pulmonary tuberculosis: An overview and review of literature. *International Journal of Life Sciences Scientific Research* 2018;4(1):1539-1541.
  - Secretaría de Salud. Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. Número 5. Volumen 38. Semana 5.

- <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/616566/sem05.pdf>; 2021 [consultada el 10 de febrero de 2021].
- Secretaría de Salud. Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. Número 53. Volumen 37. Semana 53. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/historico-boletin-epidemiologico.pdf>; 2020 [consultada el 11 febrero de 2021].
- Shabbir M, Afsar T, Razak S, Almajwal A, Khan MR. Phytochemical analysis and Evaluation of hepatoprotective effect of *Maytenus royleanus* leaves extract against anti-tuberculosis drug induced liver injury in mice. *Lipids in Health and Disease* 2020;19(1):46.
- Sozmen M, Devrim AK, Tunca R, Bayezit M, Dag S, Essiz D. Protective effects of silymarin on fumonisin B1-induced hepatotoxicity in mice. *Journal of Veterinary Science* 2013;15(1):51.
- Suvichapanich S, Fukunaga K, Zahroh H, Mushiroda T, Mahasirimongkol S, Toyo-Oka L, Chaikledkaew U, Jittikoon J, Yuliwulandari R, Yanai H, Wattanapokayakit S, Tokunaga K. NAT2 ultra-slow acetylator and risk of anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a genotype-based meta-analysis. *Pharmacogenet Genomics* 2018;28(7):167-176.
- Tang J, Yam WC, y Chen Z. *Mycobacterium tuberculosis* infection and vaccine development. *Tuberculosis* 2016, 98:30-41.
- Ullah I, Khan JA, Adhikari A, Shahid M. Hepatoprotective effect of *Monotheca buxifolia* fruit against antitubercular drugs-induced hepatotoxicity in rats. *Bangladesh Journal of Pharmacology* 2016;11(1):248-256.
- Usmani A, Mujahid M D, Khushtar M, Siddiqui HH, Rahman M. Hepatoprotective effect of *Anacyclus pyrethrum* Linn. against antitubercular drug-induced hepatotoxicity in SD rats. *Journal of Complementary and Integrative Medicine* 2016;13(3):295-300.
- Velayati AA, Farnia P, Hoffner S. Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* : Epidemiology and role of morphological alterations. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2018;12:192-196.

- Wang P, Pradhan K, Zhong XB, Ma X. Isoniazid metabolism and hepatotoxicity. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2016;6(5):384-392.
- Wardani G, Farida N, Andayani R, Kuntoro M, Sudjarwo SA. The potency of red seaweed (*Eucheuma cottonii*) extracts as hepatoprotector on lead acetate-induced hepatotoxicity in mice. *Pharmacognosy Research* 2017;9(3):282-286.
- Wei F, Liu SK, Liu XY, Li ZJ, Li B, Zhou YL, Zhang HY, Li YW. Meta-analysis: silymarin and its combination therapy for the treatment of chronic hepatitis B. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2013;32(5):657-69.
- World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report 2019. [https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/); 2019 [consultada el 27 de marzo de 2020].
- World Health Organization (WHO). Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care Update; <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255052/9789241550000-eng.pdf?sequence=1>; 2017 [consultada el 10 de junio de 2020].
- Yu Y-C, Mao Y, Chen C, Chen J-J, Chen J, Cong W, Ding Y, Duan Z, Fu Q, Guo X, Hu P, Hu X, Jia J, Lai R, Li D, Liu Y, Lu L, Ma S, Ma X, Nan Y, Ren H, Shen T, Wang H, Wang J, Wang T, Wang X, Wei L, Xie Q, Xie W, Yang C, Yang D, Yu Y-Y, Zeng M, Zhang L, Zhao X, Zhuang H. CSH guidelines for the diagnosis and treatment of drug-induced liver injury. *Hepatology International* 2017;11:221-241.
- Zhao H, Si ZH, Li MH, Jiang L, Fu YH, Xing YX, Hang W, Ruan LY, Li PM, Wang JS. Pyrazinamide-induced hepatotoxicity and gender differences in rats as revealed by a <sup>1</sup>H NMR based metabolomics approach. *Toxicology Research* 2017;6(1):17-29.