

ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA DE *MIMOSA LACERATA* EN CÉLULAS HEPG2

Data de aceite: 04/07/2023

Vianey Moreno-Dimas

Universidad Autónoma de Guerrero,
Facultad de Ciencias Químico Biológicas.

Dolores Vargas Álvarez

Universidad Autónoma de Guerrero,
Facultad de Ciencias Químico Biológicas.

Guillermina Vences-Velázquez

Universidad Autónoma de Guerrero,
Facultad de Ciencias Químico Biológicas.

Luz del Carmen Alarcón-Romero

Universidad Autónoma de Guerrero,
Facultad de Ciencias Químico Biológicas.

RESUMEN: Introducción: El hígado es uno de los órganos más importantes que participa en la desintoxicación, por lo que a menudo se encuentra sujeto a estrés oxidativo lo que conlleva a un daño celular grave. Por esta razón las plantas medicinales, debido a su riqueza natural en compuestos, han sido utilizadas para obtener compuestos bioactivos que podrían aplicarse en el tratamiento de dolencias hepáticas. *Mimosa lacerata* es utilizada en la medicina tradicional, sin embargo, las propiedades hepatoprotectoras de esta planta no han sido investigadas.

Objetivo: Evaluar *in vitro* la actividad antioxidante de las fracciones de *Mimosa lacerata* en el papel hepatoprotector ante la inducción de daño hepático con CCl_4 .

Material y métodos: Se realizó un perfil fitoquímico por cromatografía en capa fina y resonancia magnética nuclear (RMN) de los extractos y fracciones previamente obtenidas de *Mimosa lacerata*. La actividad antioxidante se midió mediante el ensayo de eliminación de radicales libres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). El efecto biológico de los extractos se evaluó mediante la determinación de los niveles de aspartato amino transferasa en células HepG2 tratadas con CCl_4 .

Resultados: La elucidación estructural de RMN del extracto metanólico sugiere la presencia de taninos, principalmente de polímeros de profisetidina/ prorobinetidina. Se encontró una alta actividad antioxidante para el extracto metanólico (CE_{50} $4.58 \mu\text{g mL}^{-1}$) y la fracción 2 ($5.59 \pm \mu\text{g mL}^{-1}$). El tratamiento previo de células HepG2 con estos extractos mostró protección contra el daño hepático inducido por CCl_4 al reducir significativamente la actividad enzimática de AST ($p < 0.05$). **Conclusiones:** El extracto metanólico y la fracción 2 de *M. lacerata* poseen actividad biológica en

células HepG2 tratadas con CCl_4 , al reducir significativamente los niveles de AST, efecto que se atribuye a sus propiedades antioxidantes.

PALABRAS CLAVE: Antioxidante, hepatoprotector, estrés oxidativo, extractos naturales, *Mimosa lacerata*.

ABSTRACT: Introduction: The liver is one of the most important organs that participates in detoxification, so it is often subject to oxidative stress, which leads to serious cell damage. For this reason medicinal plants, due to their natural richness in compounds, have been used to obtain bioactive compounds that could be applied in the treatment of liver ailments. *Mimosa lacerata* is used in traditional medicine, however, the hepatoprotective properties of this plant have not been investigated. **Objective:** To evaluate *in vitro* the antioxidant activity of the *Mimosa lacerata* fractions in the hepatoprotective role before the induction of liver damage with CCl_4 . **Material and methods:** A phytochemical profile was made by thin layer chromatography and nuclear magnetic resonance (NMR) of the extracts and fractions previously obtained from *Mimosa lacerata*. The antioxidant activity was measured by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay. The biological effect of the extracts was evaluated by determining the levels of aspartate amino transferase in HepG2 cells treated with CCl_4 . **Results.** The structural elucidation of NMR of the methanolic extract suggests the presence of tannins, mainly of polymers of profisetidine/proobinethidine. A high antioxidant activity was found for the methanolic extract (EC50 4.58 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and fraction 2 (5.59 $\pm \mu\text{g mL}^{-1}$). Pretreatment of HepG2 cells with these extracts showed protection against CCl_4 -induced liver damage by significantly reducing the enzymatic activity of AST ($p < 0.05$). **Conclusions:** The methanolic extract and fraction 2 of *M. lacerata* have biological activity in HepG2 cells treated with CCl_4 , by significantly reducing AST levels, an effect that is attributed to their antioxidant properties.

KEYWORDS: antioxidant, hepatoprotective, oxidative stress, natural extracts, *Mimosa lacerata*.

MARCO TEÓRICO

1 | ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL HÍGADO

El hígado es la glándula más voluminosa del cuerpo y pesa alrededor de 1,4 kg en el adulto promedio. Se encuentra por debajo del diafragma y ocupa la mayor parte del hipocondrio derecho y parte del epigastrio, en la cavidad abdominopelvicana, rodeado casi por completo por el peritoneo visceral y revestido en su totalidad por una capa de tejido conectivo denso irregular, que yace en la profundidad del peritoneo (Tortora y Derrickson, 2010). Se divide en cuatro lóbulos: lóbulo derecho (lóbulo más grande), lóbulo izquierdo, lóbulo cuadrado (ubicado entre la vesícula biliar y el ligamento redondo del hígado), y lóbulo caudado (ubicado entre la vena cava inferior, el ligamento venoso y el porta hepático) (Hansen *et al.*, 2015).

Desde el punto de vista histológico, se encuentra formado por hepatocitos, que

son las principales células funcionales del hígado con una amplia variedad de funciones metabólicas, secretoras y endocrinas; otros componentes son los canalículos biliares (pequeños conductos que recogen la bilis producida por los hepatocitos) y sinusoides hepáticos (Tortora y Derrickson, 2010), los cuales están revestidos por células endoteliales, con la característica de ser más permeables que otros capilares (Fox, 2013), y tienen la función de recibir sangre oxigenada de las ramas de la arteria hepática y sangre desoxigenada de las ramas de vena porta (Marshall *et al.*, 2013). Dentro de los sinusoides hepáticos se encuentran las células fagocíticas de Kupffer, que son integrantes del sistema reticuloendotelial (también llamado sistema fagocítico mononuclear) (Fox, 2013).

El hígado realiza importantes funciones como el almacenamiento de hierro y vitaminas (vitaminas B12 y vitamina A), producción de ácidos biliares, excreción de sustancias (bilirrubina) (Hansen *et al.*, 2015), metabolismo y excreción de hormonas esteroideas (Marshall *et al.*, 2013). Además, cumple funciones vitales en el metabolismo de los hidratos de carbono en los procesos de glucogénesis, lipogénesis, glucogenólisis y gluconeogénesis. Otra función hepática es el metabolismo de los lípidos en la síntesis de triglicéridos y colesterol, excreción de colesterol y la generación de ATP a partir de ácidos grasos. El hígado participa también en el metabolismo de las proteínas en la producción de albúmina, y de factores de la coagulación (fibrinógeno, protrombina y otros). Además, juega un papel importante en el procesamiento de fármacos capaz de detoxificar sustancias, como el alcohol, y excretar fármacos (Fox, 2013).

2 I METABOLISMO DE FÁRMACOS

El citocromo P450 se trata de una familia hemoproteínas, involucradas en el metabolismo de fármacos a través de reacciones enzimáticas, que desempeña un papel clave en la desintoxicación y la toxificación (Testa y Clement, 2015), a través de reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, entre otras, para generar compuestos que puedan ser excretados con mayor facilidad (Olsen *et al.*, 2015). Este sistema enzimático está presente en mamíferos, siendo el hígado el tejido más importante donde el citocromo P450 es extremadamente activo, localizado en la membrana del retículo endoplasmático liso y en la membrana interna mitocondrial, donde desempeñan funciones biosintéticas de compuestos endógenos y de biotransformación de xenobióticos (Rodríguez y Rodeiro, 2014).

Las reacciones de biotransformación de xenobióticos se han agrupado en dos fases, fase I y II. En la fase I los xenobióticos son transformados mediante reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis, y convertidos en productos más hidrosolubles a causa de la formación de nuevos grupos funcionales polares (carboxilo, hidroxilo, amino) (Rodríguez y Rodeiro, 2014). En la fase II, los fármacos o metabolitos de las vías de la fase I se conjugan enzimáticamente con un compuesto endógeno hidrófilo con la ayuda de enzimas transferasas, con moléculas endógenas de carácter polar (ácido glucurónico, sulfatos,

acetatos, glutatión o algunos aminoácidos) para combinarlos mediante reacciones de glucuroconjugación, sulfonación y acetilación. El objetivo final de esta fase es aumentar la solubilidad en agua de los compuestos y facilitar su excreción a través de la orina o la bilis (Almazroo *et al.*, 2017). Sin embargo, se ha encontrado que estas reacciones así como determinados conjugados de glutatión reducido (GSH) desempeñan un papel importante en la toxicación, debido a la generación de metabolitos tóxicos o reactivos capaces de inducir toxicidad, y con un impacto considerable para generar de una lesión hepática (Testa *et al.*, 2012).

3 I HEPATOTOXICIDAD Y LESIÓN HEPÁTICA INDUCIDA POR FÁRMACOS

El hígado es altamente susceptible a efectos adversos de los xenobióticos a causa de su particular vulnerabilidad, debido a su papel activo en el metabolismo y excreción de los medicamentos (Hañari-Quispe *et al.*, 2015). La hepatotoxicidad resulta de la toxicidad directa de los compuestos primarios, sus metabolitos reactivos o de la respuesta inmune que afecta a los hepatocitos, células epiteliales biliares, y/o vasculatura hepática (Tolosa *et al.*, 2018) y es el resultado de la toxicidad directa del fármaco, relacionada con la dosis (Dara *et al.*, 2016).

Los hepatocitos están constituidos por abundantes mitocondrias, reconocidas como mediadoras críticas en la hepatotoxicidad inducida por fármacos, proceso en el cual una gran cantidad de funciones mitocondriales se ven afectadas (Ramachandran *et al.*, 2018). La toxicidad se puede estimar como reducciones en la viabilidad celular, también como alteraciones en varios parámetros indicativos de daño celular mediante diferentes mecanismos como disfunción mitocondrial, estrés oxidativo o acumulación de lípidos (Tolosa *et al.*, 2019).

Según la duración de la lesión y la ubicación histológica del daño, se clasifica como aguda o crónica, y ya sea como hepatitis, colestásica o como un patrón mixto de lesión (David y Hamilton, 2010).

El diagnóstico de lesión hepática se basa en gran medida con el historial de un fármaco conocido de causar esta patología, así como la exclusión de otras posibles causas de lesión hepática (Navarro *et al.*, 2017). Sin embargo, se asocia con un aumento en los niveles de enzimas hepáticas y bilirrubina. El patrón de estas anomalías puede ser hepatocelular, colestásico o mixto. El patrón hepatocelular se caracteriza por niveles elevados de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), que refleja la destrucción de los hepatocitos (David y Hamilton, 2010). En cuanto a la histología hepática es bastante común mostrar una colestasis blanda y canalicular con escasa necrosis e inflamación de hepatocitos (Hu *et al.*, 2016).-

3.1 Hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono (CCl₄)

El tetracloruro de carbono (CCl₄) es una hepatotóxica común que se usa ampliamente para inducir lesiones hepáticas asociadas a estrés oxidativo *in vivo* o *in vitro*, así como para evaluar las propiedades protectoras de los ingredientes activos de plantas (Ma *et al.*, 2014).

Se trata de un hidrocarburo clorado, incoloro, volátil y muy estable, utilizado como refrigerante, agente de limpieza en seco y como disolvente para aceites y grasas. La inhalación de sus vapores puede deprimir la actividad del sistema nervioso central y causar la degeneración del hígado y los riñones. Así mismo, es un carcinógeno humano basado en la evidencia de carcinogenicidad en animales de experimentación (NCI Thesaurus, 2019).

El CCl₄ produce una intoxicación aguda en humanos, por ingestión o inhalación. Datos experimentales mencionan que sólo alrededor del 1% del CCl₄ incorporado es responsable de producir una la lesión hepática, debido a que es metabolizado en el hígado por el citocromo P450 2E1, en donde se producen radicales tóxicos (Teschke, 2018). Los radicales triclorometilo (CCl₃^{*}), derivados del metabolismo del CCl₄, pueden iniciar el estrés oxidativo que resulta en hepatotoxicidad, asimismo, estos radicales se pueden biotransformar en triclorometil peroxi (CCl₃OO^{*}), un oxidante fuerte (Tseng *et al.*, 2018), que atacan las estructuras celulares, incluidas las proteínas y fosfolípidos, lo que conduce a la apoptosis y necrosis celular (Teschke, 2018), este proceso de ilustra en la figura 1.

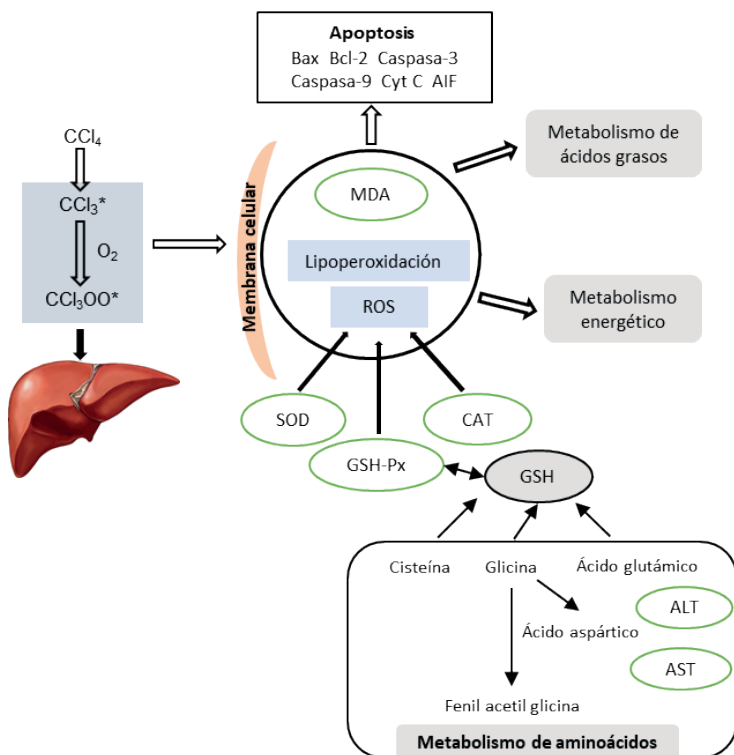


Figura 1. Hepatotoxicidad causada por CCl₄. Modificado de Zhu *et al.*, 2019.

En los últimos años, investigadores como Jia, *et al.*, 2014 y Zeng *et al.*, 2017 han evaluado el daño hepático causado por CCl_4 en distintos modelos experimentales, a través de marcadores apoptóticos, inflamatorios y parámetros de estrés oxidativos, así como la evaluación de biomarcadores séricos. Como se observa en la tabla 1, diferentes estudios coinciden en la observación de un incremento de los niveles de caspasa-3, caspasa-9, Bax, factor de necrosis alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), factor nuclear κB (NF- κB), malondialdehído (MDA), AST, ALT y fosfatasa alcalina (ALP), así como una disminución en los niveles de expresión de las proteínas Bcl-2, glutatión (GSH), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px).

| Modelo experimental | Marcadores apoptóticos | Marcadores de inflamación | Parámetros de estrés oxidativo | Perfil bioquímico | Referencia |
|---------------------|---|--|---|--|--------------------------------|
| Ratas | ----- | ----- | Disminución de GSH, SOD y CAT Aumento de MDA | Aumento de AST, ALT y ALP | (Zeashan <i>et al.</i> , 2008) |
| Carpa común | Aumento de caspasa-3, caspasa-8 y caspasa-9 | Aumento de TLR4 | Disminución de SOD, GSH-Px, CAT y GSH Aumento de MDA | Aumento de ALT y AST | (Jia <i>et al.</i> , 2014) |
| Ratas | ----- | ----- | Disminución de CAT, SOD, GSH y GSH-Px Aumento de MDA | Aumento de ALT, AST, ALP y bilirrubina | (Oriakhi <i>et al.</i> , 2018) |
| Ratas | Aumento de caspasa-9, Bax, Cyt C, caspasa-3 Disminución de Bcl-2 | ----- | Disminución en los niveles de SOD, CAT y GSH-Px Aumento de MDA | Aumento de ALT y AST | (Zhu <i>et al.</i> , 2019) |
| Ratas | ----- | Aumento de, TNF- α , IL-6 y NF κB | Disminución de GSH Aumento de MDA y NO | Aumento de ALT Y AST | (Fathy <i>et al.</i> , 2019) |
| Ratones | Aumento de Caspasa-3 y Bax Disminución de Bcl-2 | Incremento de TNF- α , IL1 β , IL-6 y NF κB | Disminución de los niveles de SOD, CAT y GSH-Px y GSH Aumento de MDA | Aumento de ALT Y AST | (Zeng <i>et al.</i> , 2017) |

Bcl-2 asociado a proteína X (Bax), factor de necrosis alfa (TNF- α), glutatión (GSH), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-Px), malondialdehído (MDA), aspartato amino transferasa (AST), alanino amino transferasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP), receptor 4 tipo Toll (TLR4), factor nuclear κB (NF- κB), interleucina 6 (IL-6), linfoma de células B2 (Bcl-2), citocromo C (Cyt C) y óxido nítrico (NO).

Tabla1. Efecto del CCl_4 en diferentes modelos experimentales.

4 I PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

El estrés oxidativo es un estado en el cual las defensas y antioxidantes celulares son insuficientes para inactivar completamente las sustancias oxidantes generadas, debido a una producción excesiva de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y especies reactivas de nitrógeno (RNS por sus siglas en inglés), lo que ocasiona daño a las proteínas, ácidos nucleicos, los lípidos insaturados, comprometiendo la salud y viabilidad celular, originando una gran variedad de respuestas celulares que puede conducir a la muerte celular por necrosis o apoptosis (Souki *et al.*, 2015). Se cree que contribuye al desarrollo de varias enfermedades, incluido el cáncer (Alexandre *et al.*, 2017).

Existen múltiples fuentes celulares de generación de ROS, pero las más significativas son los complejos mitocondriales de transporte de electrones I y III, las enzimas P450 dentro del retículo endoplásmico. Sin embargo, estos intermedios reactivos interactúan con otras moléculas para formar ROS secundarias, como productos de peroxidación de lípidos, peroxinitrito y ácido sulfénico y disulfuros, estos procesos se ilustran en la figura 2 (Singal *et al.*, 2011). Además, otras circunstancias que pueden producir daño oxidativo grave se encuentran las infecciones, los procesos inflamatorios, determinadas anomalías metabólicas, el consumo excesivo de ciertos fármacos, la exposición a una radiación intensa, o el contacto frecuente con determinados contaminantes ambientales (McKee y McKee, 2013).

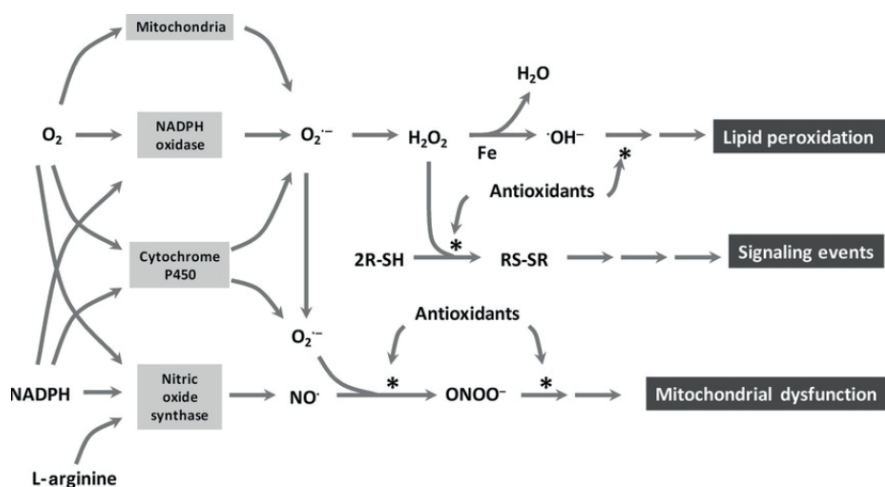


Figura 2. Efecto reactivo de las especies de oxígeno y nitrógeno. A la izquierda, la figura, representa esquemáticamente las principales fuentes de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de especies reactivas de nitrógeno (RNS) en el hígado. Los productos inmediatos de estas fuentes, el superóxido y el óxido nítrico, se someten a una serie de reducciones e interacciones posteriores que conducen a la peroxidación de lípidos, la formación de disulfuros que desencadenan varios eventos singulares y la reducción de la respiración mitocondrial con un aumento adicional en la producción de ROS mitocondrial. Los compuestos antioxidantes, pueden actuar como eliminadores de radicales libres que inhiben la progresión de estas vías (Singal *et al.*, 2011).

Los antioxidantes son aquellas moléculas que participan en la eliminación de estas especies reactivas, que causan estrés oxidativo, y actúan como eliminadores de radicales libres y pueden prevenir reacciones oxidativas, que conducen a diversas enfermedades. Los antioxidantes endógenos producidos por el organismo incluyen enzimas antioxidantes tales como catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reducido (GSH) (Sarangarajan *et al.*, 2017). Estas enzimas antioxidantes son proteínas involucradas en la transformación catalítica de especies reactivas de oxígeno y sus subproductos en moléculas no tóxicas (Schwab, 2017).

Los antioxidantes exógenos ingeridos por la dieta abarcan diferentes clases de compuestos que pueden interferir con ciclos oxidativos para inhibir o retardar el daño oxidativo de las biomoléculas. Dentro de estos, las principales clases de componentes con actividad antioxidante son: vitaminas (vitamina C y vitamina E), carotenoides (carotenos y xantofilas) y polifenoles (flavonoides, ácidos polifenólicos, lignanos y estilbenos) (Oroian y Escriche, 2015).

5 I ETNOBOTÁNICA Y EL POTENCIAL HEPATOPROTECTOR

La etnobotánica se denomina como la disciplina científica de la interacción del hombre con las plantas, la cual incluye el estudio de la dinámica de los ecosistemas e involucra componentes naturales y sociales (Carreño-Hidalgo, 2016). El conocimiento tradicional que se conoce, es el resultado de innumerables observaciones y experimentos empíricos de generaciones que observaron a la naturaleza, registraban y transmitían sus conocimientos a nuevas generaciones, a través de sus estelas, códices o a través de las enseñanzas verbales (Gómez-Pompa, 1993).

Las plantas medicinales, especialmente aquellas con uso tradicional, siempre han sido consideradas como una fuente rica de nuevos medicamentos efectivos (Shehab *et al.*, 2015), es un hecho que una cuarta parte de todas las recetas médicas son formulaciones basadas en sustancias derivadas de plantas o análogos sintéticos derivados de plantas (Gurib-Fakim, 2006).

El consumo de plantas medicinales y tradicionales en la protección del hígado de efectos nocivos de las hepatotóxicas, que el hombre ingiere para contrarrestar alteraciones en los mecanismos de defensa antirradicalarios, son agentes llamados hepatoprotectores (Selema y Martínez, 1999). Los hepatoprotectores ocupan un lugar clave en el tratamiento de prácticamente todas las demás enfermedades hepáticas, pues ayudan a restaurar sus funciones y a normalizar o mejorar la actividad enzimática de las células hepáticas debido a sus propiedades antioxidantes (Karamalakova *et al.*, 2019).

Los antioxidantes derivados de plantas, desde el punto de vista fitoquímico pueden ser taninos, lignanos, estilbenos, cumarinas, quinonas, xantonas, ácidos fenólicos, flavonoides, flavonolones, catequinas, antocianinas y proantocianinas, las cuales debido

a sus propiedades químicas redox pueden actuar como donadores de hidrógeno y de esta manera prevenir o retrasar el desarrollo de enfermedades degenerativas (Robards *et al.*, 1999).

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios de las plantas más numerosos y distribuidos de forma ubicua, estando presentes en las hojas, semillas, corteza y flores de las plantas (Pereira *et al.*, 2016), y van desde compuestos de anillos aromáticos simples y de bajo peso molecular simple, hasta los taninos complejos grandes y polifenoles derivados (Oroian y Escriche, 2015). Los compuestos fenólicos simples son los ácidos fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides, y los compuestos altamente polimerizados incluyen ligninas, lignanos, melaninas, taninos (Pereira *et al.*, 2016). Sus propiedades antioxidantes justifican muchos de sus efectos beneficiosos que les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción (Valencia-Avilés *et al.*, 2017).

Los taninos de acuerdo a su estructura, pueden dividirse ampliamente en dos clases, denominadas taninos hidrolizables y taninos condensados (Oroian y Escriche, 2015). Los taninos hidrolizables se han caracterizado por tener una propiedad antioxidante (Figuerola, *et al.*, 2015).

Desde 1999 se conocía que los flavonoides ocupaban un lugar sobresaliente por sus reconocidas propiedades antioxidantes y su uso como hepatoprotectores (Selema y Martínez, 1999), pues se cree que estos son buenos secuestradores de radicales libres (Sindhi *et al.*, 2013). Estos flavonoides constituyen un grupo extenso de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos y comunes en todo el reino vegetal que se pueden presentar tanto libres como conjugados con azúcares (Selema y Martínez, 1999).

Para el 2014 Torres-González y colaboradores, reportaron que en México existía un número reducido de plantas evaluadas para la actividad hepatoprotectora, en modelos celulares y animales, con el objetivo de estudiar diversos extractos de plantas en el desarrollo de nuevos fitofármacos.

Actualmente existen en el mercado medicamentos con actividad hepatoprotectora registrados como Simarin plus®, compuesto por Silimarina. La silimarina es el extracto obtenido de *Silybum marianum*, o cardo mariano, y consta de siete flavonoglignanos (silibinina, isosilibinina, siliquistina, isosilistrina y silidianina) y un flavonoide (taxifolina). Entre estas sustancias, la silibinina prevalece principalmente y tiene el efecto biológico más importante. Su acción se manifiesta en la modulación de la inflamación y la apoptosis, pues se ha demostrado que la silimarina tiene un efecto que permite su uso en todas las causas más frecuentes de daño hepático (Federico *et al.*, 2017).

Estudios en animales, ha demostrado que el pretratamiento con silimarina aumenta significativamente su estado antioxidante con aumentos significativos en las actividades de CAT y GSH hepático (Oriakhi *et al.*, 2018), este último a través de sus efectos directos sobre el metabolismo de los aminoácidos de azufre en el hígado, consistente con la reducción de

la peroxidación lipídica en el hígado (kwon, 2013), así como la inhibición en la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma, como consecuencia del bloqueo de la activación del factor nuclear hepático kappa B (NF- κ B) (Li, 2012), además de brinda una protección en niveles de AST, ALT, y ALP, con reducción del efecto tóxico del daño hepático (Oriakhi *et al.*, 2018).

6 | GÉNERO *MIMOSA*

El género *Mimosa* pertenece a la familia Fabacea, subfamilia Mimosoideae, y se ubica en la tribu Mimoseae. Por el número de especies, *Mimosa* es el género más importante de las Mimosoideae en México. Presentan diversas formas biológicas, entre las que predominan, arbustos erectos y árboles. Son utilizadas como combustible (leña o carbón), comestible, forraje para ganado caprino y ovino, material para construcción, medicinal, melífera, ornamental, peletería y como implemento agrícola (Camargo, 2001).

Como resultado de la revisión taxonómica del género, en Guerrero se registran 44 especies con 23 variedades y dos subespecies de *Mimosa*, colocando al Estado en el segundo lugar en diversidad de especies, después de Oaxaca (López, 2018).

6.2 *Mimosa lacerata*

Comúnmente conocida como íacalhuixtle, mezquite, tecolhuixtle, uña de gato (Camargo *et al.*, 2001), sierrecilla, garabato (Mendoza-Sabino, 2016), facalhuixtle, hizache, huizpantle y mezquite uña de gato (López, 2018).

Usualmente es un arbusto erecto de dos a cuatro metros de alto, ramificado, de tallos lisos y ásperos con espinas grises o blanquecinas. Las hojas son pequeñas y divididas en hojas más pequeñas que dan la apariencia de plumas. Los frutos son vainas de color rojovino o café oscuro, que pueden estar solas o agrupadas, poco alargadas de 3 a 6 cm, aplanadas con las puntas redondeadas. El exterior de los frutos estas parecen tener picos en forma de sierras, con semillas en forma de riñón de color ladrillo como se observa en la figura 3 (Mendoza-Sabino, 2016).

Su hábitat se encuentra en lugares húmedos, bosque mixto o de pino. En México se encuentra ubicada en el estado de Oaxaca, Puebla, Chiapas, Veracruz, Michoacán (Mendoza-Sabino, 2016), Hidalgo, Jalisco, Morelos, Querétaro, Tlaxcala y parte de los estados de Guerrero. Crece en suelos pedregosos, someros, derivado de rocas calizas, que florece y fructifica de febrero a diciembre con producción de frutos inmediatamente después de la floración, considerada una especie endémica en México (López, 2018).

En el 2001 *M. lacerata* se enlista dentro de una de las especies más útiles del género *Mimosa* en México, utilizada como fuente de combustible, forraje y planta medicinal en padecimientos como traumatismos de la piel, erupciones en la boca y fuegos (Camargo

et al., 2001). Así mismo, para el 2016 se reporta el uso de la corteza de esta planta como tratamiento en infecciones gastrointestinales y dolores estomacales, así como una actividad antimicrobiana para *Shigella dysenteriae* (Mendoza-Sabino, 2016), *Avibacterium paragallinarum* y *Pasteurella multocida* como agentes causales en infecciones respiratorias en pollos (Mayo et al, 2018).

Taxonomía:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: *Mimosa*

Especie: *lacerata*

Nombre científico: *M. lacerata*

Categoría: plantas ornamentales



Figura 3. *Mimosa lacerata*. A la derecha se observan frutos secos, y a la izquierda se observa un arbusto erecto de dos a cuatro metros de alto, muy ramificados de tallos lisos y ásperos (Mendoza-Sabino.,2016).

6.1.1 Fitoquímica

Mendoza-Sabino en el 2016, realiza el primer estudio fitoquímico de *Mimosa lacerata*, en donde se encontró la presencia de flavonoides, triterpenos y taninos. Así mismo, destaca la presencia de una actividad antioxidante aproximadamente del 78%, capaz de neutralizar radicales libres, además de una alta actividad antibacteriana como

extracto crudo a diferentes concentraciones.

Por todo lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* la actividad antioxidante de las fracciones de *Mimosa lacerata* en el papel hepatoprotector ante la inducción de daño hepático con CCl_4 .

MATERIAL Y MÉTODOS

Recolección de muestras

Los ejemplares de la planta, fueron facilitados por el laboratorio de Producción Integral de Alimentos de la Facultad Académica de Ciencias Químico Biológicas, de la Universidad Autónoma de Guerrero.

Obtención de los extractos

Se pesaron 30 g de muestra macerada de *M. lacerata*, para su posterior extracción sólido-líquido (maceración secuencial) con el equipo Soxhlet (Anexo 1), utilizando como disolventes: metanol (MeOH) y acetato de etilo:hexano (AcOEt:Hexano) (50:50). Posteriormente, se retiró el disolvente en un rotavapor a 80 rpm a una temperatura de 35°C para la obtención de los extractos (Anexo 2), que fueron depositados en recipientes de cristal para secarlos a temperatura ambiente.

Hidrólisis ácida

Para la obtención de flavonoides libres se realizó la prueba de hidrólisis ácida según la metodología descrita por Vargas y colaboradores en el 2006 (Anexo 3). A 3 g de extracto metanólico, se adicionó 300 mL de HCl 1.2 M en metanol acuoso al 50% durante 2 h a 98 °C en reflujo.

Cromatografía en columna (CC)

La metodología a seguir se realizó de acuerdo a una modificación de lo descrito por Revathy, *et al*, 2011. Para la muestra hidrolizada y extracto metanólico se montó una columna de 46 x 2 empacada con 8 g de gel de sílice y 1 g muestra. Se eluyó de acuerdo a una polaridad creciente: a) metanol, b) AcOEt:hexano (50:50). A todas las fracciones recogidas se eliminó el solvente orgánico mediante un evaporador rotatorio. El contenido total recogido se analizó por cromatografía en capa fina.

Cromatografía en capa fina (CCF)

Las muestras obtenidas del rotavapor se analizaron por cromatografía en capa fina

(CCF) (Anexo 4) en la fase estacionaria de gel de sílice 60. Los sistemas de elucidación utilizadas fueron metanol:diclorometano (7:3) y acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (25:1:1:2). Se utilizó al radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) como revelador de actividad antioxidante, además de reveladores como el cloruro de aluminio (AlCl_3), cloruro férrico (FeCl_3), dragendorff y vainillina, para evidenciar flavonoides, fenoles, alcaloides y terpenos respectivamente.

La lectura de las placas se llevó a cabo en una lámpara de UV a 340nm (Anexo 4).

Identificación por espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN)

Como apoyo al análisis fitoquímico se realizó una técnica de espectroscopia de RMN. Para esto fueron pesados 30 mg del extracto metanólico y enviado a la Universidad Tecnológica de la Mixteca, Huajuapán de León, Oaxaca para su procesamiento. Los espectros de protones de H-1 y C-13 del extracto metanólico fueron tomados en un espectrómetro Bruker de 400 MHz Avance III, empleando como disolvente metanol deuterado (CD_3OD). Los datos se procesaron en el software Topspin 4.0.6.

Actividad antioxidante por la técnica del radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) en microplaca

Para determinar la concentración efectiva 50 (CE_{50}) de los extractos y fracciones capaces de reducir el 50% de radicales DPPH, se realizó una técnica a microescala según lo descrito por Granados-Guzmán en 2017, por medio de espectrofotometría UV-Vis a una longitud de onda de 517 nm en placas de 96 pozos.

Para esto, se prepararon soluciones de los extractos y fracciones a una concentración de 1 mg mL^{-1} en etanol (EtOH). De esta solución se tomó 0.1 mL y se adicionó en un pozo con 0.1 mL de EtOH; a partir de esta solución se realizó una serie de diluciones seriadas (factor 1:2) por 11 pozos más. A cada uno de los pozos se les agregó 0.1 mL de DPPH (280 μM) y se dejó reposar por 15 min en obscuridad, para su posterior lectura en el lector de placas Multiskan FC (Thermo Scientific).

Se utilizó una solución de quercetina 1 mg mL^{-1} como control positivo y etanol como control negativo.

Para determinar la CE_{50} se calculó la capacidad reductora de los extractos. La capacidad reductora se determinó por medio del porcentaje de reducción mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de reducción: } \frac{\text{absorbancia del control negativo} - (\text{absorbancia de la muestra})}{\text{absorbancia del control negativo}} \times 100$$

Los porcentajes de reducción se graficaron versus la concentración del extracto en cada pozo; del gráfico generado se calculó la ecuación de la recta y se determinó la concentración del extracto necesaria para obtener un 50% de reducción.

El extracto o fracción que presentó mejor actividad antioxidante fue seleccionada para realizar el ensayo *in vitro*.

Cultivo celular

La conservación de la línea celular se realizó según la metodología descrita por Delgado, 2013.

Para la obtención de la alícuota de la línea celular HepG2, fueron distribuidos en varios frascos de cultivo con medio de cultivo DMEM Advanced con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de antibióticos (penicilina y estreptomycin) y 1% de LGlutamina; una vez obtenida una confluencia del 70-80% se retiró el medio con ayuda una bomba de aspiración. Posteriormente, se lavaron las células dos veces con buffer de fosfatos en solución salina (PBS); enseguida agregar 1 mL de tripsina y se incubaron por 5 min a 37°C con 5% de CO₂.

Pasado 5 minutos se adicionó 6 mL de medio de cultivo DMEM con SFB al 10% para neutralizar la tripsina; dicha solución se colectó en un tubo Falcon de 15 mL y se centrifugó durante 5 min a 2000 rpm y a 25 °C de temperatura.

Una vez centrifugado se decantó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 4 mL de medio de cultivo.

Para el conteo de células viables se realizó una dilución 1:10 de la suspensión celular; en un tubo eppendorf se agregó 20 µL de la suspensión celular a una mezcla de 170 µL de medio y 10 µL de azul tripano.

Se tomó un volumen indefinido de la dilución la cual se distribuyó por capilaridad en una cámara de Neubauer. Para el conteo solo se tomaron en cuenta las células vivas encontradas en los cuadrantes 1, 2, 3 y 4 (figura 4) de la cámara que no estuvieran teñidas con el colorante.

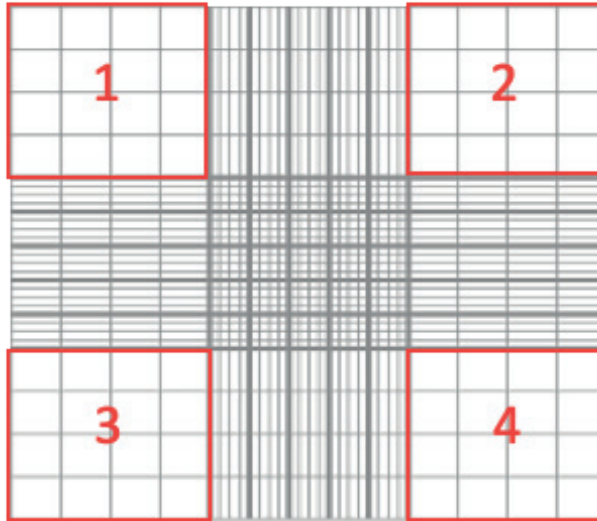


Figura 4. Cuadrantes de lectura en la cámara de Neubauer.

Para determinar la cantidad de células presentes en un mililitro se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\#células}{ml} = \frac{total\ de\ células}{4} (factor\ de\ dilución)(10^4)$$

Modelo de daño con CCl₄

Según la metodología descrita por Delgado 2013, en placas de 6 pozos agregó 1 millón de células/pozo, a las 12 h de haber agregado las células se retiró el medio y se lavaron con PBS. Se agregaron 12 μL de CCl₄ para inducir el daño en un tiempo determinado de 2 h.

Las soluciones de CCl₄ se realizaron en PBS con DMSO al 0.05%. Después de 2 h de exposición de las células con el CCl₄ se retiró el sobrenadante para llevarlo a la cuantificación AST.

Modelo hepatoprotector

- **Cuantificación de la enzima aspartato amino transferasa (AST)**

Según la metodología descrita por Delgado 2013, en placas de 6 pozos se sembraron 1 millón de células, se incubaron 12 horas a 37°C 5% CO₂ y a las 12 horas se retiró el medio y se lavaron con PBS. Posteriormente se agregaron las soluciones del extracto metanólico, la fracción 2 y silimarina disueltos en PBS al 0.1% de DMSO para obtener una

concentración final de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esto se incubó durante 1 hora a 37 °C y 5% de CO_2 . Pasado este tiempo se retiró la solución y se adicionó CCl_4 ; se dejó actuar por 2 horas en incubación, una vez pasado ese tiempo se retiró el sobrenadante e inmediatamente se realizó la cuantificación enzimática de AST.

Análisis estadístico

Todos los datos se presentaron como media \pm desviación estándar (DE), utilizando el programa STATA versión 14.0. Se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) para determinar diferencia estadística entre los tratamientos de cada grupo, considerando un nivel de confianza del 95% y un valor de significancia del $p < 0.05$. Los datos fueron graficados utilizando el programa GraphPad Prism v.5.

RESULTADOS

Obtención y purificación de extractos

Se realizó la extracción sólido líquido a partir de muestra seca, mediante el equipo Soxhlet, utilizando como solventes, metanol y AcOEt:hexano (50:50). Se obtuvieron dos extractos, un extracto metanólico (P) y un extracto de AcOEt:hexano (AC) (tabla 2), los cuales posteriormente fueron sometidas a un sistema de rotaevaporación para la eliminación del solvente restante.

El extracto metanólico fue sometido a una columna de gel de sílice y eluida con metanol, acetato de etilo y hexano, de la cual fueron obtenidas 8 fracciones (fracción 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8) (tabla 2).

Del extracto metanólico obtenido fueron tomados 3 g de muestra y llevados a un proceso de hidrólisis ácida y transcurrido 2 horas de reflujo se obtuvo un compuesto llamado extracto hidrolizado (H), este último, fue sometido a una columna cromatográfica y eluida con metanol y acetato de etilo, de la cual finalmente, se colectaron 2 fracciones (tabla 2), la fracción metanólica llamada fracción hidrolizada 1 (Hidrolizado 1) y una fracción de acetato de etilo llamada fracción hidrolizada 2 (Hidrolizado 2).

| Muestra | Extracción | Hidrólisis | Purificación |
|-----------------------------------|--------------------------|------------------|---------------------------------------|
| Corteza de <i>Mimosa lacerata</i> | Metanol | ----- | Metanol Acetato de etilo Hexano |
| | | Hidrolisis ácida | Metanol Acetato de etilo |
| | Acetato de etilo: hexano | ---- | ----- |

Tabla 2. Proceso de extracción y purificación de *M. lacerata*.

Cromatografía en capa fina

Se realizó una cromatografía en capa fina de los extractos y fracciones obtenidas utilizando diferentes reveladores, solventes y sistemas de elución, donde fue posible identificar la presencia de alcaloides utilizando dragendorff como revelador, se encontraron también, compuestos terpenicos utilizando el revelador vainillina, estos dos compuestos encontrados en el extracto metanólico y el extracto hidrolizado, además se pudo observar un desplazamiento similar de los compuestos de la misma muestra al utilizar el mismo sistema de elución con diferentes reveladores.

Asimismo, el cloruro férrico (FeCl_3) reveló la presencia de compuestos fenólicos para las fracciones 2-7 y el extracto metanólico, mientras que el cloruro de aluminio (AlCl_3) permitió la observación de flavonoides en las fracciones 3 a la 7 y el extracto metanólico.

Por último, se determinó presencia de compuestos antioxidantes con el revelador DPPH, en el cual el cambio a color amarillo indica la reducción del radical libre de este revelador, y donde fue posible observar una mayor actividad antioxidante para las fracciones 2-7 y en el extracto metanólico.

El resultado final del tamizaje fitoquímico se resume en la tabla 3, que muestra la ausencia de compuestos fenólicos y alcaloides para el caso de la fracción 1, 8, H1, H2 y AC; así como también, una baja actividad antioxidante.

Cabe mencionar, que para las fracciones 2-7 y el extracto metanólico se observó la interferencia de metabólicos desconocidos.

| | Compuesto | Alcaloides | Terpenos | Flavonoides | Fenoles | DPPH |
|------------|-----------|------------|----------|-------------|---------|------|
| Extractos | P | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | AC | N | N | - | - | + |
| | H | ++ | ++ | N | N | N |
| Fracciones | 1 | N | N | - | - | + |
| | 2 | N | N | - | + | ++ |
| | 3 | N | N | ++ | ++ | ++ |
| | 4 | N | N | ++ | ++ | ++ |
| | 5 | N | N | +++ | +++ | ++ |
| | 6 | N | N | ++ | ++ | ++ |
| | 7 | N | N | + | + | ++ |
| | 8 | N | N | - | - | - |
| | H1 | N | N | - | - | + |
| | H2 | N | N | - | - | + |

Poco (+), regular (++), abundante (+++), negativo (-), prueba no realizada (N) Extracto metanólico (P), extracto de acetato de etilo (AC), extracto hidrolizado (H), fracción hidrolizada 1 (H1), fracción hidrolizada 2 (H2).

Tabla 3. Tamizaje fitoquímico para los extractos y fracciones de *M. lacerata*

Actividad antioxidante mediante la técnica de DPPH en microplaca

Para confirmar la actividad antioxidante de las muestras se determinó la CE_{50} , para la cual fue necesario calcular la capacidad reductora del extracto metanólico, las fracciones 1-8, así como de H1, H2 y AC. Como control positivo se utilizó quercetina y como blanco etanol (EtOH).

Los porcentajes de reducción se graficaron versus la concentración del extracto en cada pozo del gráfico generado, se calculó la ecuación de la recta y se determinó la concentración del extracto necesaria para obtener un 50% de reducción (tabla 4).

| MUESTRA | CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) |
|---------------------|-------------------------------------|
| Quercetina | 4.02 ± 1.29 |
| EXTRACTO METANÓLICO | 4.58 ± 2.96 |
| Fracción 1 | 9.15 ± 4.11 |
| Fracción 2 | 5.59 ± 1.85 |
| Fracción 3 | 5.62 ± 1.12 |
| Fracción 4 | 5.67 ± 4.96 |
| Fracción 5 | 6.64 ± 1.47 |
| Fracción 6 | 25.40 ± 7.75 |
| Fracción 7 | 15.43 ± 6.02 |
| Fracción 8 | 92.67 ± 8.14 |
| Hidrolizado 1 | 10.57 ± 7.21 |
| Hidrolizado 2 | 13.43 ± 6.82 |

Tabla 4. Actividad antioxidante de los extractos y fracciones

Los resultados son mostrados como media \pm SD n=3

Se observó una buena actividad antioxidante para las fracciones las fracciones 1-7, principalmente para las fracciones 2-5 y en el extracto metanólico; así como de ambos compuestos hidrolizados, esto al comparar con la quercetina. El extracto metanólico y la fracción 2, fueron seleccionados para su posterior uso en el ensayo *in vitro*, ya que presentaron una actividad antioxidante sobresaliente.

Actividad hepatoprotectora

Se evaluó la actividad hepatoprotectora del extracto metanólico y la fracción 2 de *M. lacerata* en la línea celular HepG2, a una sola concentración; como inductor de daño se utilizó CCl_4 y como control positivo de hepatoprotección se utilizó silimarina.

A una hora del pretratamiento con el extracto metanólico y la fracción 2, con $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en la actividad enzimática de AST comparada con el grupo control a daño. Esta reducción, en la actividad de AST, es similar a

la mostrada en el grupo tratado con silimarina a la misma concentración, como se muestra en la figura 5.

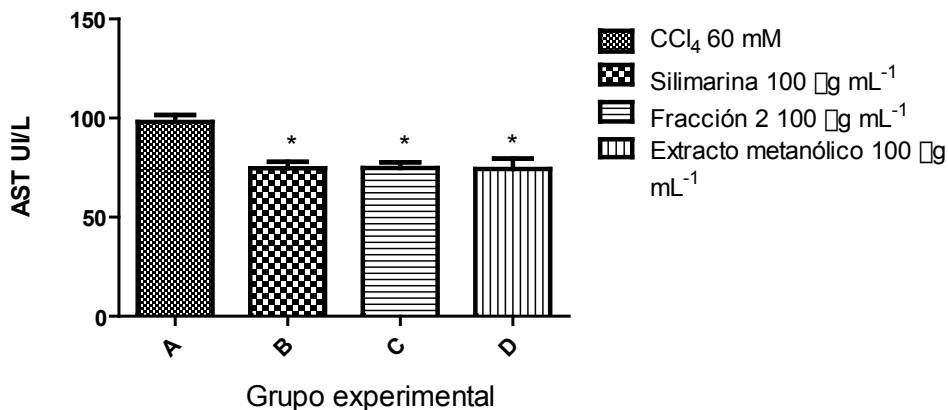


Figura 5. Efecto hepatoprotector *in vitro*. Pretratamiento a 1 hora de silimarina (B) fracción 2 (C) y el extracto metanólico (D) en células HepG2 con daño inducido por CCl₄ a 60 mM. *significativamente diferente ($p < 0.05$), comparado con el grupo control de daño (A).

Identificación por RMN

Para confirmar el tamizaje fitoquímico, el extracto metanólico fue sometido a una espectrometría por RMN para RMN-1H y RMN-13C. La selección del extracto metanólico para esta prueba fue en base a su actividad antioxidante mostrada por la técnica de DPPH en microplaca, la cual fue sobresaliente.

En la lectura correspondiente se observaron señales para carbonos aromáticos en 115.13 y 129.5 ppm, varias señales bases de oxígeno características de azúcares y una señal del carbono 4 del anillo C (CH₂) alrededor de 28.99 ppm; además, se observan correlaciones entre el CH₂ del anillo C (H-4) con un carbono aromático (C6) C-Ar y uno base de oxígeno (C3), que indica la presencia de compuestos de tipo tanino como se observa en el espectro de coherencia de enlace múltiple heteronuclear (HMCSB por sus siglas en inglés) (figura 6).

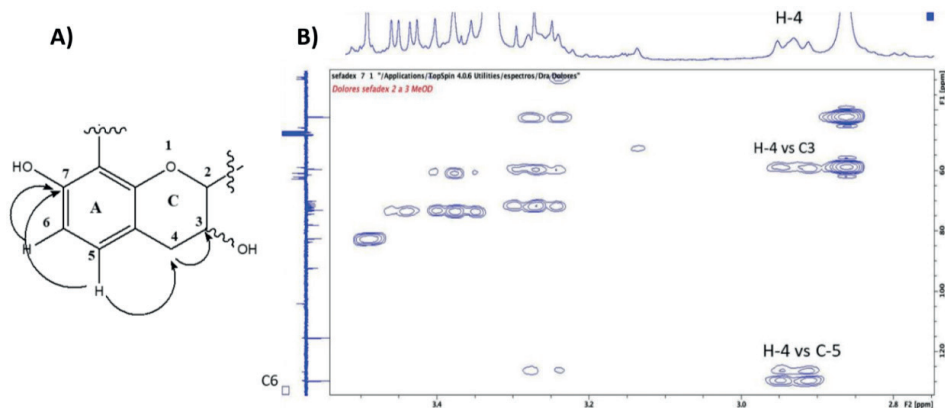


Figura 6. Espectro bidimensional de HMBC. A) molécula elucidada B) señales de relación de los núcleos ^{13}C y ^1H .

DISCUSIÓN

La hepatotoxicidad de diferentes tipos y orígenes constituye un importante problema de salud pública, por lo que la necesidad de tener nuevos esquemas de tratamiento es un factor importante para detener el progreso de estas afecciones, tal como el uso de productos naturales que han demostrado ser una excelente fuente para la obtención de compuestos antioxidantes y coadyuvar al tratamiento de estas enfermedades (Nwidi *et al.*, 2018).

Por esta razón, la fitoterapia ha llevado a la búsqueda de alternativas, orientadas a la protección del hígado de efectos originados por hepatotoxinas, aumentando el número de estudios para la evaluación de extractos herbales en distintos modelos experimentales (Torres-González *et al.*, 2014).

Para este fin la extracción, purificación y caracterización son pasos muy importantes en la preparación de muestras naturales y el estudio de sus propiedades biológicas (Revathy *et al.*, 2011). En el presente estudio el uso de estas técnicas permitió el análisis de extractos y fracciones de la corteza de *M. lacerata* a distinta polaridad, donde los extractos obtenidos a baja polaridad con acetato de etilo y hexano mostraron tener baja capacidad de reducción del radical DPPH, es decir una escasa actividad antioxidante (tabla 4); sin embargo, los compuestos con una alta polaridad obtenidos con metanol, en especial el extracto metanólico y la fracción 2, mostraron tener mejor capacidad de reducción del radical DPPH con una CE_{50} $4.58 \mu\text{g mL}^{-1}$ y CE_{50} $5.59 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente, tomando como referencia a la quercetina (tabla 4), una clase de flavonoide que tiene la capacidad de prevenir o retrasar condiciones que favorecen el estrés oxidativo en la célula, al reducir los niveles de ROS y MDA (Alía *et al.*, 2006).

En el primer estudio fitoquímico de *M. lacerata* se identificó la presencia de compuestos flavonoides, terpenos y taninos obtenidos de la corteza, además de observar

una actividad antimicrobiana y antioxidante (Mendoza-Sabino, 2016; Mayo *et al.*, 2018). En el presente estudio, se confirmaron compuestos fenólicos y flavonoides, en especial para el extracto metanólico y la fracción 5, ambos con una buena actividad antioxidante (tabla 3 y 4). En relación a esto, se han reportado grandes cantidades de flavonoides provenientes de la corteza de extractos herbales (Pereira *et al.*, 2016), junto a una buena actividad antioxidante (Dykes y Rooney, 2007); así mismo, los compuestos fenólicos como taninos son obtenidos de extractos herbales y utilizados medicinalmente por su actividad diurética (Patel, 2011), antiproliferativa (Rolim *et al.*, 2018) antimicrobiana y antioxidante (Maisetta *et al.*, 2019).

De igual manera se encontraron compuestos terpenicos y alcaloides para el extracto metanólico, este último reportado con un gran potencial antioxidante, incluso más fuerte que los fenoles (Gan *et al.*, 2017), en cuanto a los terpenos, se ha demostrado que poseen una actividad protectora hepática contra la inflamación, el estrés oxidativo y apoptosis en una lesión hepática *in vivo* (Huang *et al.*, 2019).

La presencia de compuestos fitoquímicos como alcaloides, terpenos, flavonoides y fenoles encontrados en el extracto metanólico, además de una buena actividad antioxidante, fue el motivo de su selección para realizar el estudio *in vitro* junto a la fracción 2, la cual de igual manera mostró una buena actividad antioxidante, seguida del extracto metanólico (tabla 4).

Estudios previos realizados por Gonzáles *et al.*, 2017, han demostrado que el daño hepático causado por CCl_4 a 1.5 horas de exposición en células HepG2 se encuentra asociado con un aumento significativo de AST, esto debido a la toxicidad de sus compuestos reactivos o metabolitos (Nwidu *et al.*, 2018), que provocan una disminución en la integridad estructural del hígado (Liu *et al.*, 2018). Este hecho, puede atribuirse a su localización en el citoplasma y mitocondria, pues un daño mitocondrial con acumulación de ROS tiende a aumentar el nivel de AST, conllevando a una destrucción celular (Hu *et al.*, 2014). Datos similares fueron obtenidos en este estudio en el grupo control de daño, donde las células HepG2 fueron tratadas con CCl_4 en un tiempo de 2 horas, lo que provocó un incremento en los niveles de AST, indicativo de un daño celular hepático; sin embargo, este daño fue disminuido significativamente ($p < 0.05$) con el tratamiento previo de 1 hora con el extracto metanólico y la fracción 2 a una concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (figura 5), lo que pudiera reflejar un efecto protector a la destrucción celular causada por el CCl_4 . Este efecto puede atribuirse al alto contenido antioxidante demostrado tanto para el extracto metanólico como para la fracción 2, lo que pudiera conferirle una protección considerable contra el estrés oxidativo, pues se ha demostrado que extractos derivados de plantas, que muestran una buena actividad antioxidante son buenos agentes hepatoprotectores (Torres-González *et al.*, 2011).

Cabe mencionar que, la reducción significativa de AST entre el extracto metanólico y la fracción 2 fue muy similar, de igual modo con el grupo tratado a 1 hora con silimarina a

una concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, ya que su administración previa redujo el efecto tóxico del CCl_4 a 60 mM. Este resultado es similar a lo observado en 2017 por Gonzales *et al.*, en donde el tratamiento a $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ con silimarina redujo significativamente una lesión hepática causada por CCl_4 a 40 mM, en la misma línea celular en un tiempo de 1.5 horas. Lo anterior indica que una concentración menor de silimarina puede reducir significativamente un daño celular causado por CCl_4 en un menor tiempo, por lo que aumentar la concentración del extracto metanólico o la fracción 2, así como el tiempo de exposición, podría disminuir aún más el efecto tóxico causado por el CCl_4 y por consiguiente mantener la integridad celular del hepatocito. Otros estudios *in vivo* también han demostrado que la silimarina protege contra las lesiones causadas por el CCl_4 (Li, 2012), efecto que se ha atribuido a su capacidad de eliminación de radicales libres (Anthony y Saleh, 2013), a la regulación de la apoptosis al generar cambios en la proporción Bax/Bcl-2 y a su papel en el proceso inflamatorio en la inhibición de NF κ B (Federico *et al.*, 2017).

Debido a la actividad biológica demostrada por *M. lacerata* en el ensayo *in vitro*, fue de importancia la elucidación del compuesto responsable de dicha actividad, para esto se seleccionó al extracto metanólico para ser sometido a una espectroscopía de RMN de $^{13}\text{-C}$ y $^1\text{-H}$. Gracias a esto fue posible observar la presencia de compuestos aromáticos, una estructura con una dispersión similar a lo encontrado por Pizzi y Stepahno en 1993 al estudiar el tanino de la corteza de acacia negra (*Acacia mearnsii*) perteneciente a la familia Fabaceae, donde se encontraron taninos poliméricos compuestos de unidades de fisetinidina/robonetidina, denominados polímeros de profisetinidina/prorobinetidina respectivamente. Lo anterior puede sugerir la presencia de un tipo de polímero condensado tipo profisetinidina o prorobonetidina en el extracto metanólico de *M. lacerata* muy similar al de *A. mearnsii*. El extracto crudo de la corteza de acacia negra ha demostrado una fuerte capacidad de eliminación de radicales libres por el método DPPH (Shen *et al.*, 2010). Este efecto ha sido comprobado por Huang y colaboradores en 2010 al analizar un dímero de prorobonetidina denominada robinetidinol- ($4\beta \rightarrow 8$)-epigalocatequina 3-O-galato (REO), el cual previene la activación de caspasa 3, protege contra el daño oxidativo mitocondrial, reduce la generación de ROS y aumenta la producción de GSH.

La presencia de polímeros de profisetidina o prorobonetidina presentes en el extracto metanólico podrían jugar un papel importante al contrarrestar el efecto tóxico provocado por el CCl_4 . Sin embargo, la presencia de metabolitos interferentes observados en el tamiz fitoquímico del extracto metanólico (tabla 3), podrían bien interferir o estar implicados en el efecto protector hepático, considerando que la acción biológica de una planta a veces no puede deberse a uno solo de sus principios activos, si no a la interacción sinérgica de las moléculas presentes e incluso podrían mostrar una actividad más efectiva en forma de mezcla que cuando se utilizan de forma individual (Rosales *et al.*, 2017).

Por lo anterior, es de interés seguir investigando la presencia de nuevos metabolitos presentes en *M. lacerata*, así como sus mecanismos específicos de acción.

CONCLUSIONES

- Fueron obtenidos por elucidación, dos extractos de alta y mediana polaridad, ocho fracciones y dos compuestos hidrolizados de la corteza de *M. lacerata*.
- El estudio fitoquímico del extracto metanólico de *M. lacerata* evidenció la presencia de alcaloides, terpenos, fenoles y flavonoides.
- Los extractos y fracciones que presentaron una mejor actividad antioxidante fueron el extracto metanólico (CE₅₀ de 4.58 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y la fracción 2 (5.59 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de *M. lacerata*.
- El pretratamiento a 1 hora con el extracto metanólico y la fracción 2 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mostró un efecto protector significativo contra el daño inducido por CCl₄ en la línea celular HepG2 al evaluar la concentración de AST.

REFERENCIAS

Alexandre, J., Nicco, C., Batteux, F. (2017). Oxidative Stress, in: Schwab, M. (Ed.), Encyclopedia of Cancer. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 3335–3338.

Alía, M., Mateos, R., Ramos, S., Lecumberri, E., Bravo, L., Goya, L., (2006). Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *Eur. J. Nutr.* 45: 19–28.

Almazroo, O.A., Miah, M.K., Venkataramanan, R. (2017). Drug Metabolism in the Liver. *Clin. Liver Dis.* 21: 1–20.

Anthony, K.P., Saleh, M.A. (2013). Free Radical Scavenging and Antioxidant Activities of Silymarin Components. *Antioxidants.* 2: 398–407.

Camargo, S.L., Grether, R., Martínez, A., García, V., Barrios, S. (2001). Especies Útiles del Género Mimosa (Fabaceae-Mimosoideae) en México. *Bol. Soc. Bot. México.* 68: 33–44.

Carreño-Hidalgo, P.C. (2016). La etnobotánica y su importancia como herramienta para la articulación entre conocimientos ancestrales y científicos. (Tesis de licenciatura). Universidad distrital Francisco José De Caldas. pp. 5-10

Dara, L., Liu, Z.-X., Kaplowitz, N. (2016). Mechanisms of Adaptation and Progression in Idiosyncratic Drug Induced Liver Injury, Clinical Implications. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver.* 36: 158–165.

David, S., Hamilton, J.P. (2010). Drug-induced Liver Injury. *US Gastroenterol. Hepatol. Rev.* 6: 73–80.

Delgado, C. (2013). Aislamiento biodirigido de compuesto(s) con actividad hepatoprotectora a partir de *Turnera diffusa*. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León. pp. 26-46.

Dykes, L., Rooney, L.W. (2007). Phenolic Compounds in Cereal Grains and Their Health Benefits. *Cereal Foods World.* 53: 105-111

Fathy, M., Khalifa, E.M.M.A., Fawzy, M.A. (2019). Modulation of inducible nitric oxide synthase pathway by eugenol and telmisartan in carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Life Sci.* 216: 207–214.

- Federico, A., Dallio, M., Loguercio, C. (2017). Silymarin/Silybin and Chronic Liver Disease: A Marriage of Many Years. *Molecules* 22: 191-199.
- Figuroa, M.C., Zafimahova, A., Alvarado, P.G.M., Dubreucq, E., Poncet, (2015). Grape seed and apple tannins: emulsifying and antioxidant properties. *Food chem.* 178: 38-44.
- Fox, S.I. (2013). Human physiology, 13th ed. ed. McGraw-Hill, New York, NY.pp. 486-48.
- Gan, J., Feng, Y., He, Z., Li, X., Zhang, H., (2017). Correlations between Antioxidant Activity and Alkaloids and Phenols of Maca (*Lepidium meyenii*). *J. Food Qual.* 2017: 1–10
- Gómez-Lechón, M.J. (2017). Modelos celulares hepáticos avanzados para el estudio preclínico del metabolismo y la hepatotoxicidad de fármacos. *An. Real Acad. Nac. Farm.* 83: 255–267.
- Gómez-Pompa, A. (1993). Las raíces de la etnobotánica mexicana. *Acta Biol. Panamensis* 1: 87–100.
- González, L.T., Minsky, N.W., Espinosa, L.E.M., Aranda, R.S., Meseguer, J.P., Pérez, P.C., (2017). In vitro assessment of hepatoprotective agents against damage induced by acetaminophen and CCl₄. *BMC Complement. Altern. Med.* 17: 1-10.
- Granados-Guzmán, G., Salazar-Aranda, R., Garza-Tapia, M., Castro-Ríos, R., Waksman de Torres, N. (2017). Optimization and Validation of Two High-Throughput Methods Indicating Antiradical Activity. *Curr. Anal. Chem.* 13: 499–507.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Aspects Med.* 27: 1–93.
- Hañari-Quispe, R., Arroyo, J., Herrera-Calderón, O., Herrera-Moran, H. (2015). Efecto hepatoprotector del extracto hidroetanólico atomizado del maíz morado (*Zea mays* L.) en lesiones hepáticas inducidas en ratas. *An. Fac. Med.* 76: 123–128.
- Hansen, J.T., Netter, F.H., Machado, C.A.G., Craig, J.A., Perkins, J.A. (2015). Netter: anatomía clínica, 3rd ed. Elsevier Masson, España. pp. 34-35
- Hu, J., Ramshesh, V.K., McGill, M.R., Jaeschke, H., Lemasters, J.J. (2016). Low Dose Acetaminophen Induces Reversible Mitochondrial Dysfunction Associated with Transient c-Jun N-Terminal Kinase Activation in Mouse Liver. *Toxicol. Sci.* 150: 204–215.
- Hu, Z., Lausted, C., Yoo, H., Yan, X., Brightman, A., Chen, J., et al (2014). Quantitative Liver-Specific Protein Fingerprint in Blood: A Signature for Hepatotoxicity. *Theranostics* 4: 215–228.
- Huang, W., Ding, H., Chen, L.-Y., Ni, L., Ruan, Y.-F., Zou, X.-X., et al. (2019). Protective Effect of the Total Triterpenes of *Euscaphis konishii* Hayata Pericarp on Bacillus Calmette-Guérin Plus Lipopolysaccharide-Induced Liver Injury. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* 2019: 1-15.
- Huang, W., Niu, H., Xue, X., Li, J., Li, C. (2010). Robinetinidol-(4 β →8)-epigallocatechin 3-O-gallate, A Galloyl Dimer Prorobinetinidin From *Acacia Mearnsii* De Wild, Effectively Protects Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells Against Acrolein-Induced Oxidative Damage. *J. Alzh. Dis* 21: 493-506.
- Isaza, J. (2007). Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et technica.* 1: 54-62.

- Jia, R., Cao, L.-P., Du, J.-L., Wang, J.-H., Liu, Y.-J., Jeney, G., et al (2014). Effects of carbon tetrachloride on oxidative stress, inflammatory response and hepatocyte apoptosis in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquat. Toxicol.* 152: 11–19.
- Kamalian, L., Chadwick, A.E., Bayliss, M., French, N.S., Monshouwer, M., Snoeys, J., Park, et al. (2015). The utility of HepG2 cells to identify direct mitochondrial dysfunction in the absence of cell death. *Toxicol In Vitro* 29: 732–740.
- Karamalakova, Y.D., Nikolova, G.D., Georgiev, T.K., Gadjeva, V.G., Tolekova, A.N. (2019). Hepatoprotective properties of *Curcuma longa* L. extract in bleomycin-induced chronic hepatotoxicity. *Drug Discov. Ther.* 13: 9–16.
- Li, Chia., Hsiang, Chien., Wu, Shih y Ho, Shih-Lu. (2012). Food and Chemical Toxicology. *Food Chem Toxicol.* 5: 1568-1575
- Liu, W., Wang, Z., Hou, J., Zhou, Y., He, Y., Jiang, S., et al (2018). The Liver Protection Effects of Maltol, a Flavoring Agent, on Carbon Tetrachloride-Induced Acute Liver Injury in Mice via Inhibiting Apoptosis and Inflammatory Response. *Molecules* 23: 2120.
- López, A. (2018). Revisión taxonómica del género *Mimosa* (Leguminosae-Mimosoideae) en el estado de Guerrero, México. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana, México. pp. 73-147.
- Ma, J.-Q., Ding, J., Zhang, L., Liu, C.-M. (2014). Hepatoprotective properties of sesamin against CCl_4 induced oxidative stress-mediated apoptosis in mice via JNK pathway. *Food Chem. Toxicol.* 64: 41–48.
- Maisetta, G., Batoni, G., Caboni, P., Esin, S., Rinaldi, A.C., Zucca, P., (2019). Tannin profile, antioxidant properties, and antimicrobial activity of extracts from two Mediterranean species of parasitic plant *Cytinus*. *BMC Complement. Altern. Med.* 19: 1-11.
- Marshall, W.J., Bangert, S.K., Lapsley, M. (2013). *Bioquímica clínica*. 7a ed, Elsevier, Barcelona. pp 85-103
- Mayo, R.I., Vargas, D., Herrera, N., Rios, R., Damian, A., Godinez, F., et al (2018). Plant polyextracts against *Avibacterium paragallinarum* and *Pasteurella multocida*, causal agents of respiratory syndrome in chickens. *Wild. J. Pharm. Pharm. Sci.* 7: 17-29.
- McKee, T., McKee, J.R. (2013). *Biochemistry: the molecular basis of life*, International 5. ed. ed. Oxford Univ. Press, New York. pp 309-336
- Mendoza-Sabino, G. (2016). *Etnobotánica y actividad antibacteriana de plantas medicinales de comunidades indígenas del estado de Guerrero*. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Guerrero. pp. 15-28.
- Navarro, V.J., Khan, I., Björnsson, E., Seeff, L.B., Serrano, J., Hoofnagle, J.H. (2017). Liver injury from herbal and dietary supplements. *Hepatology.* 65: 363–373.
- Nwidu, L.L., Elmorsy, E., Oboma, Y.I., Carter, W.G. (2018). Hepatoprotective and antioxidant activities of *Spondias mombin* leaf and stem extracts against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *J. Taibah Univ. Med. Sci.* 13: 262–271.
- Olsen, L., Oostenbrink, C., Jørgensen, F.S. (2015). Prediction of cytochrome P450 mediated metabolism. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 86: 61–71.

- Oriakhi, K., Uadia, P.O., Eze, I.G. (2018). Hepatoprotective potentials of methanol extract of *T. conophorum* seeds of carbon tetrachloride induced liver damage in Wistar rats. *Clin. Phytoscience*. 4: 25.
- Oroian, M., Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Res. Int.* 74: 10–36.
- Pereira, C., Barros, L., Ferreira, I.C., (2016). Extraction, identification, fractionation and isolation of phenolic compounds in plants with hepatoprotective effects: Phenolic compounds from plants with hepatoprotective effects. *J. Sci. Food Agric.* 96: 1068–1084.
- Pizzi, A., y Stephanou., A., (1993). A Comparative C13 NMR Study of Polyflavonoid Tannin Extracts for Phenolic Polycondensates. *J. Appl. Polym sci.* 50: 2105-2113
- Ramachandran, A., Duan, L., Akakpo, J.Y., Jaeschke, H. (2018). Mitochondrial dysfunction as a mechanism of drug-induced hepatotoxicity: current understanding and future perspectives. *J. Clin. Transl. Res.* 4: 1–40.
- Revathy, S., Elumalai, S., Antony, M.B. (2011). Isolation, Purification and Identification of Curcuminoids from Turmeric (*curcuma Longa L.*) by Column Chromatography. *J. Exp. Sci.* 2: 21–25.
- Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M.A., Verde-Star, M.J. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. *Omn. Sci.*1: 6-36.
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* 66: 401–436.
- Rodríguez, J.C., Rodeiro, I. (2014). El sistema citocromo P450 y el metabolismo de xenobióticos. *Rev. Cuba. Farm.* 48: 495–507.
- Rolim, P.M., Fidelis, G.P., Padilha, C.E.A., Santos, E.S., Rocha, H.A.O., Macedo, G.R., (2018). Phenolic profile and antioxidant activity from peels and seeds of melon (*Cucumis melo L. var. reticulatus*) and their antiproliferative effect in cancer cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 51: 1-14.
- Rosales, C.G., Soria, C., Pérez, M.I., Cedillo, L.Y., Huacuja, L., Miranda, M. L. (2017). Efecto hepatoprotector de una mezcla de siete plantas en cirrosis inducida con tetracloruro de carbono. *Rev. Cuba. Plts Med.* 22: 1-14.
- Saito, J., Okamura, A., Takeuchi, K., Hanioka, K., Okada, A., Ohata, T. (2016). High content analysis assay for prediction of human hepatotoxicity in HepaRG and HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro.* 33: 63–70.
- Sarangarajan, R., Meera, S., Rukkumani, R., Sankar, P., Anuradha, G. (2017). Antioxidants: Friend or foe? *Asian Pac. J. Trop. Med.* 10: 1111–1116.
- Schwab, M. (2017). *Encyclopedia of cancer*, 4th edition. ed. Springer Berlin Heidelberg, New York, NY.
- Selema, G., Martínez, J. (1999). Efecto hepatoprotector inducido por el flavonoide Astilbina frente a un modelo animal tratado con tetracloruro de carbono. *Rev. Cuba. Plts. Med.* 4: 36–39.
- Shen, X., Wang, Y., Wang, F. (2010). Characterisation and biological activities of proanthocyanidins from the barks of *Pinus massoniana* and *Acacia mearnsii*. *Nat. Prod. Res.* 4: 590-598.

- Shehab, N.G., Abu-Gharbieh, E., Bayoumi, F.A. (2015). Impact of phenolic composition on hepatoprotective and antioxidant effects of four desert medicinal plants. *BMC Complement. Altern. Med.* 15: 401–413.
- Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., Dhaka, N. (2013). Potential applications of antioxidants. *J. Pharm. Res.* 7: 828–835.
- Singal, A.K., Jampana, S.C., Weinman, S.A. (2011). Antioxidants as therapeutic agents for liver disease. *Liver Int.* 31: 1432–1448.
- Souki, A., Vargas, M.E., Gómez, A., Cano, C., García, D., Araujo, S., *et al.* (2015). Relación de la malnutrición por exceso con los niveles de óxido nítrico, malondialdehído y ácido úrico en niños y adolescentes. *Rev. Latinoam. Hipertens.* 10: 46–53.
- Teschke, R. (2018). Liver Injury by Carbon Tetrachloride Intoxication in 16 Patients Treated with Forced Ventilation to Accelerate Toxin Removal via the Lungs: A Clinical Report. *Toxics* 6: 1–32.
- Testa, B., Clement, B. (2015). Biotransformation Reactions and their Enzymes, in: *The Practice of Medicinal Chemistry. The pract of med chems*, pp. 561–584.
- Testa, B., Pedretti, A., Vistoli, G. (2012). Reactions and enzymes in the metabolism of drugs and other xenobiotics. *Drug Discov.* 17: 549–560.
- Tolosa, L., Jiménez, N., Pelechá, M., Castell, J.V., Gómez-Lechón, M.J., Donato, M.T. (2019). Long-term and mechanistic evaluation of drug-induced liver injury in Upcyte human hepatocytes. *Arch. Toxicol.* 93: 519–532.
- Tolosa, L., Jiménez, N., Pérez, G., Castell, J.V., Gómez-Lechón, M.J., Donato, M.T. (2018). Customised in vitro model to detect human metabolism-dependent idiosyncratic drug-induced liver injury. *Arch. Toxicol.* 92: 383–399.
- Torres-González, L., Elsa Muñoz-Espinosa, L., María Rivas-Estilla, A., Trujillo-Murillo, K., Salazar-Aranda, R., Waksman De Torres, N., *et al.* (2011). Protective effect of four Mexican plants against CCl₄-induced damage on the Huh7 human hepatoma cell line. *Ann. Hepatol.* 10: 73–79.
- Torres-González, L., Torres, N.W., Pérez-Meseguer, J., Muñoz-Espinosa, L., Salazar-Aranda, R., Cordero-Pérez, P. (2014). Review of plants with hepatoprotective activity evaluated in Mexico. *Medicina universitaria.* 16: 78–86
- Tortora, G.J., Derrickson, B. (2010). Principios de anatomía y fisiología. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. pp. 990–994
- Tseng, T.-H., Lin, W.-L., Chang, C.-K., Lee, K.-C., Tung, S.-Y., Kuo, H.-C. (2018). Protective Effects of Morus Root Extract (MRE) Against Lipopolysaccharide-Activated RAW264.7 Cells and CCl₄-Induced Mouse Hepatic Damage. *Cell. Physiol. Biochem.* 51: 1376–1388.
- Valencia-Avilés, E., Ignacio-Figueroa, I., Sosa-Martínez, E., Bartolomé-Camacho, M.C., Martínez-Flores, E., García-Pérez, M.-E. (2017). Polyphenols: antioxidant and toxicological properties. *Rev. Fac. Cienc. Quim.* 16: 15–29.
- Vargas, D., Soto, M., González, V.A., Engelman, E.M., Martínez, A. (2006). Cinética de acumulación y distribución de flavonoides en guayaba (*Psidium guajava* L.). *Agrociencia* 40: 109–115.

Zeashan, H., Amresh, G., Singh, S., Rao, C.V. (2008). Hepatoprotective activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals. *Food Chem. Toxicol.* 46: 3417–3421.

Zeng, B., Su, M., Chen, Q., Chang, Q., Wang, W., Li, H. (2017). Protective effect of a polysaccharide from *Anoectochilus roxburghii* against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *J. Ethnopharmacol.* 200: 124–135.

Zhu, B., Li, Y., Hu, T., Zhang, Y. (2019). The hepatoprotective effect of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* on carbon tetrachloride-induced acute liver injury rats. *Int. J. Biol. Macromol.* 131: 1–9.

SITIOS ELECTRONICOS

NCI Thesaurus, 2019. Tetracloruro de carbono. Consultado el 8 de marzo de 2019, página web: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C44350

PharmaBrand S.A. 2014. Simarín plus. Consultado el 12 de mayo de 2019, página web: <https://www.pharmabrand.com.ec/index.php/profesionales-de-la-salud/vademecum/otc/simari-n-plus>