



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS



Maestría en Ciencias en Biología Experimental

Laboratorio de Fisiología Muscular

Laboratorio de Bioquímica

Laboratorio de Función Mitocondrial

Efecto del extracto etanólico de *Eryngium carlinae* en la enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) inducida por el consumo de una dieta alta en grasas y carbohidratos

Autora de tesis:

Q.F.B. Dulce Yareli Guerra Quezada **para obtener el
grado de Maestra en Ciencias en Biología Experimental**

Directora de tesis:

D.C. Rocío del Carmen Montoya Pérez

Co-directora de tesis:

D.C. Claudia Isabel García Berumen

Morelia, Mich., octubre 2025

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

Índice Página

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMEN

ABSTRACT

1. Introducción	1
1. 2 Funciones del hígado	1
1.3 Padecimientos del hígado	2
1.3.1. Enfermedad del hígado graso no alcohólico	3
1.3.1.1. Causas	4
1.3.1.2. Prevalencia	4
2. Antecedentes	5
1.1.5. Mitocondria	5
1.2. Estrés oxidativo	5
1.3 Antioxidantes	6
1.4. Estrés oxidativo en el hígado	8
1.5 Tratamiento para la EHGNA	8
1.5. <i>Eryngium spp.</i>	9
1.5.1 <i>Eryngium carlinae</i>	10
3. Justificación	13
4. Hipótesis	14
5. Objetivos	14

5.1 Objetivo general	14
5.1 Objetivo específico	14
6. Materiales y métodos	15
6.1 Identificación y recolección de <i>Eryngium carlinae</i>	15
6.2 Preparación del extracto etanólico de <i>E. carlinae</i>	15
6.3 Prueba de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	15
6.4 Prueba de ABTS (ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico))	16
6.5 Material biológico	16
6.6 Diseño experimental de los estudios <i>in vivo</i>	17
6.7 Determinación de parámetros bioquímicos	17
6.8 Cuantificación de triacilglicéridos hepáticos	17
6.9 Aislamiento de mitocondrias	18
6.10 Determinación de la concentración de proteína	18
6.11 Determinación del consumo de oxígeno	18
6.12 Actividad de los complejos de la cadena de transporte de electrones	19
6.12.1 Actividad del complejo I	19
6.12.2 Actividad del complejo II	19
6.12.3 Actividad del complejo III	20
6.13 Niveles de peroxidación de lípidos	20
6.14 Producción de especies reactivas de oxígeno	21
6.15 potencial de membrana	21
6.16 Determinación de la actividad enzimática	21
6.18 Análisis estadístico	22

7. Resultados	23
7.1 Actividad antioxidante del extracto etanólico de <i>E. carlinae</i> <i>in vitro</i>	23
7.2 Efecto del extracto etanólico de <i>E. carlinae</i> la ganancia de peso <i>in vivo</i>	24
7.3 Efecto del extracto etanólico de <i>E. carlinae</i> sobre parámetros bioquímicos y de daño hepático	24
7.4 Influencia del extracto etanólico de <i>E. carlinae</i> sobre el contenido de TAG en hígado	26
7.5 Efecto del extracto etanólico de <i>E. carlinae</i> en la respiración mitocondrial	26
7.6 Efecto del extracto etanólico de <i>E. carlinae</i> en la función de los complejos de la CTE.	28
7.7 Efecto del extracto etanólico de <i>E. carlinae</i> en los niveles lipoperoxidación y producción de especies reactivas de oxígeno.	29
7.8 Efecto del extracto etanólico de <i>E. carlinae</i> en la actividad de las enzimas antioxidantes	30
8. Discusión	31
9. Conclusión	37
10. Referencias	38

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
·OH	Radical hidroxilo
AG	Ácidos grasos
AGL	Ácidos grasos libres
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
CEH	Células estrelladas hepáticas
CK	Células de Kupffer
CTE	Cadena transportadora de electrones
DM	Diabetes mellitus
DME	Diabetes mellitus experimental
DNL	Lipogénesis <i>de novo</i>
EHNA	Esteatohepatitis no alcohólica
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FA	Fosfatasa alcalina
GLUT	Transportador de glucosa
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno

HGNA	Hígado graso no alcohólico
IC50	Concentración inhibitoria 50
IL	Interleucina
MDA	Malondialdehído
MS	Metabolitos secundarios
NAC	Norte América y El Caribe
NF-κB	Factor nuclear κB
NO·	Óxido nítrico sintasa inducible
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización mundial de la salud
PGA	Productos finales de glicación avanzada
PPAR-γ	Receptor activado por el proliferador de peroxisomas-γ
SOD	Superóxido dismutasa
SREBP-1c	Proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1c
STZ	Estreptozotocina
TAG	Triacilglicerol
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
ΔΨ	Potencial de membrana

RESUMEN

La Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico (EHGNA) ocurre por un incremento de lípidos ($\geq 5\%$) en los hepatocitos, lo que genera un ambiente lipotóxico y facilita la muerte celular, impulsada por el aumento de triacilglicéridos (TAG) y el estrés oxidante. Este último, junto con la mitocondria, es un potencial blanco terapéutico. El presente estudio buscó determinar el efecto antioxidante e hipolipemiante del extracto etanólico de *Eryngium carlinae* en un modelo de ratas con EHGNA inducida por una dieta alta en grasas y carbohidratos. Para esto, se realizaron pruebas in vitro que confirmaron la actividad antioxidante del extracto (ensayos ABTS• y capacidad reductora) de forma dosis-dependiente. Luego, se llevaron a cabo estudios in vivo en ratas Wistar, divididas en cinco grupos experimentales (control, control + extracto, EHGNA, EHGNA + extracto, EHGNA3 + extracto). El tratamiento fue administrado oralmente con una dosis de 30 {mg/kg} durante 90 días. Al finalizar, se midieron el peso corporal y hepático, glucosa, TAG séricos y hepáticos, marcadores de daño hepático (ALT, AST, FA) y de estrés oxidante (peroxidación lipídica, actividad de catalasa y superóxido dismutasa). También se evaluó la función mitocondrial, incluyendo el consumo de oxígeno, potencial de membrana, producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y actividad de la cadena de transporte de electrones (CTE). Los resultados mostraron que el extracto de *E. carlinae* disminuyó los niveles de TAG séricos y hepáticos, redujo los marcadores de estrés oxidante y promovió la actividad de las enzimas antioxidantes. Se concluye que el extracto posee actividad antioxidante e hipolipidémica en el modelo de la enfermedad. Sin embargo, se advierte que, en individuos sanos, el extracto actuó como un prooxidante, indicando que la dosis empleada en el modelo enfermo no es la adecuada para un individuo sano.

(Hígado, graso, *Eryngium*, mitocondrias, antioxidante).

SUMMARY

The core issue in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is an accumulation of lipids ($\geq 5\%$) in hepatocytes, creating a lipotoxic state that drives cell death through increased hepatic triglycerides (TAG) and oxidative stress. Given this, oxidative stress and the mitochondria (a source of reactive oxygen species, or ROS) represent key therapeutic targets for NAFLD treatment. This study investigated the antioxidant and hypolipidemic effects of the ethanolic extract of *Eryngium carlinae* in a rat model of diet-induced NAFLD.

Initial in vitro assays confirmed the extract's antioxidant potential, showing dose-dependent activity in radical scavenging (ABTS• assay) and reducing capacity. Following this, an in vivo study was conducted over 90 days on male Wistar rats, which were separated into five groups: control, control + extract, NAFLD, and two NAFLD groups treated with the extract at 30 {mg/kg} orally.

Key measurements taken after the treatment included body and liver weight, serum glucose and TAG, and markers of liver injury (ALT, AST, ALP). Researchers also assessed oxidative stress markers, including lipid peroxidation and the activity of antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase). Mitochondrial function was also analyzed, focusing on oxygen consumption, membrane potential, ROS production, and the Electron Transport Chain (ETC) complex activity.

The results demonstrated that *E. carlinae* extract administration successfully decreased serum and hepatic TAG levels, reduced oxidative stress markers, and promoted the activity of the body's antioxidant enzymes. The study concludes that the extract possesses significant antioxidant and hypolipidemic activity against NAFLD. However, an important caveat was found: the extract acted as a pro-oxidant in the healthy control rats, suggesting the effective dose used to treat the diseased model is not safe or recommended for healthy individuals.

(Liver, fatty, *Eryngium*, mitochondria, antioxidant).

1. Introducción

1.1 Hígado

El hígado es un órgano compuesto de una masa parenquimatosa continua que se encuentra penetrada de redes de vasos sanguíneos. La irrigación sanguínea que recibe proviene de dos fuentes: el 25 % proviene de la arteria hepática, la cual es rica en oxígeno, y el 75 % restante proviene del intestino a través de la vena porta hepática. El peso del hígado de un humano adulto es de entre 1300 y 1700 g dependiendo del peso del cuerpo y del sexo (2 % del peso del cuerpo), mientras que el hígado de los roedores es relativamente grande comprendiendo del 4-5 % del peso del cuerpo (Lammert y Zeeb, 2014; Arias et al., 2020).

De acuerdo a la apariencia externa, el hígado está dividido en la superficie anterior en 2 lóbulos anatómicos izquierdo y derecho (divididos por el ligamento falciforme); en cambio en la superficie posterior el hilio hepático delimita 2 lóbulos adicionales, en la parte media superior se encuentra el lóbulo caudado y en la parte media inferior el lóbulo cuadrado (Trefts et al., 2017)

Histológicamente, el 70 % de la masa celular hepática está constituido por células del parénquima hepático (hepatocitos), mientras que el 30 % está comprendido por células no parenquimatosas, las cuales incluyen macrófagos residentes denominados células de Kupffer (CK), células estrelladas hepáticas (CEH), células endoteliales y células granulares (Trefts et al., 2017).

1.2 Funciones del hígado

Los diferentes tipos celulares conforman la placa celular hepática, la cual es la unidad funcional y estructural del hígado. A lo largo de la placa se encuentran entre 20 y 30 hepatocitos, los cuales, debido a la formación de un gradiente de metabolitos, hormonas y oxígeno y a las señales celulares de células vecinas, dan

lugar a una zonación metabólica, haciendo que los hepatocitos lleven a cabo diferentes funciones dependiendo de su ubicación (Lammert y Zeeb, 2014).

Las principales funciones del hígado son: procesar y almacenar nutrientes, y garantizar el suplemento de nutrientes hacia otros órganos; detoxificar y excretar xeno- y endobióticos a la vesícula biliar; participar en la respuesta inmune y disparar la respuesta de la fase aguda de la inflamación; y llevar a cabo funciones de homeostasis como el de la glucosa, el metabolismo y transporte de lípidos (TAG y colesterol), el procesamiento y secreción de hormonas y la síntesis de ácidos biliares y de proteínas plasmáticas, y el metabolismo del amonio y la regulación metabólica del pH sistémica a través de la síntesis de urea (Trefts et al., 2017; Lammert y Zeeb, 2014).

1.3 Padecimientos del hígado

El hígado es esencial para poder digerir los alimentos y eliminar algunas sustancias tóxicas que hay en el organismo. Pero, al igual que cada parte del cuerpo, existen diferentes padecimientos que lo pueden afectar, así, las enfermedades del hígado más comunes pueden generarse por herencia o daño al órgano (Trefts et al., 2017; Lammert y Zeeb, 2014).

Las enfermedades del hígado se dividen en función a su origen y pueden ser por:

Infecciones: los parásitos o virus pueden infectar el hígado, lo que provoca inflamación y disminuye su funcionamiento. En esta categoría, la hepatitis A, B y C son las más frecuentes (Trefts et al., 2017; Lammert y Zeeb, 2014).

Sistema inmunitario: se puede presentar alguna anomalía en el sistema inmunitario, que ataca alguna parte del cuerpo, si esto sucede en el hígado, se puede presentar hepatitis autoinmune, colangitis biliar primaria o esclerosante primaria.

Genética: la presencia de algún gen anormal, heredado por uno o ambos padres, puede resultar en daño hepático debido a hemocromatosis, enfermedad de

Wilson o deficiencia de alfa-1 antitripsina (Trefts et al., 2017; Lammert y Zeeb, 2014).

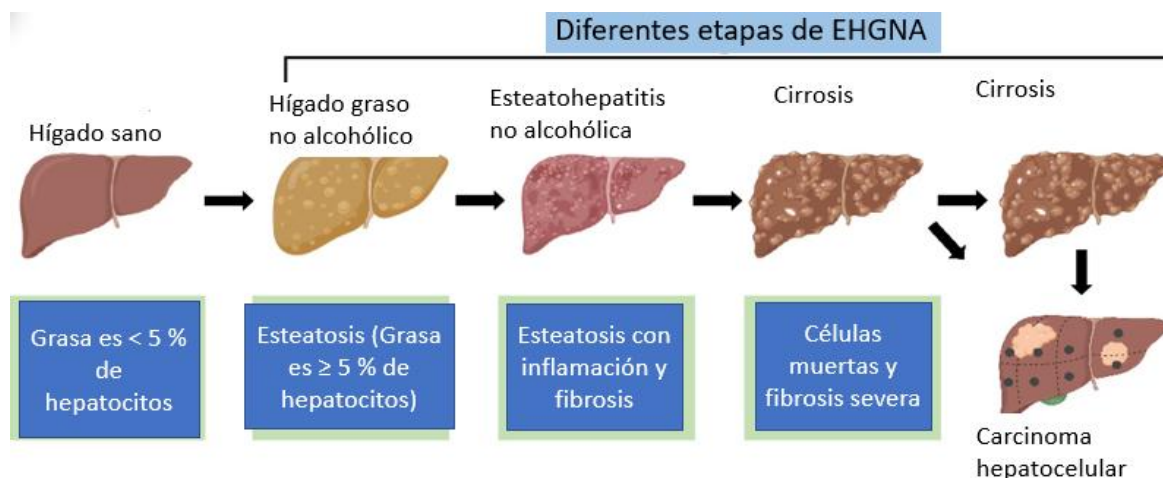
Tumores: la presencia de cáncer o tumores en el hígado afecta su funcionamiento y la salud de la persona.

Otros: existen otras acciones o situaciones que pueden generar algún tipo de enfermedad hepática como: consumo prolongado de alcohol, consumo de algún tipo de medicamentos y acumulación de grasa en el hígado sin causa alcohólica.

1.3.1 Enfermedad del hígado graso no alcohólico

La enfermedad del hígado graso no alcohólica (EHGNA) con el tiempo ha pasado de ser una enfermedad raramente conocida a la causa más común de enfermedad hepática crónica en el mundo (Guo et al., 2022).

Actualmente, se define EHGNA como un término general para una variedad de enfermedades en las que la esteatosis está presente en más del 5 % de los hepatocitos con factores de riesgo metabólico, excluyendo el consumo excesivo de alcohol u otra enfermedad hepática crónica. EHGNA se divide en hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis no alcohólica (ENA) según las características histológicas. La EHGNA se define como todos los casos caracterizados por esteatosis, con o sin inflamación lobulillar leve. Por el contrario, la ENA se caracteriza además por la presencia de daño hepatocelular. Aunque la esteatosis simple se considera una enfermedad “benigna”, su asociación con fibrosis hepática



puede conducir al desarrollo de cirrosis y carcinoma hepatocelular (Guo et al., 2022) (Véase Figura 1).

Figura 1. Etapas de la EHGNA. El hígado sano desarrolla hígado graso no alcohólico con esteatosis hepatocelular como característica principal, si esta no es tratada puede progresar a esteatohepatitis no alcohólica que es una forma grave de la enfermedad definida como inflamación y fibrosis y a medida que el daño progresa se convierte a cirrosis e incluso a carcinoma hepatocelular (Modificado de Guo et al., 2022).

1.3.1.1 Causas

El aumento global del síndrome metabólico es una entidad clínica crónica, caracterizada por un grupo de factores de riesgo que implican un problema mundial en la salud pública; es un trastorno metabólico con incidencia importante, directamente relacionado con enfermedades crónicas no transmisibles que causan gran morbilidad y que incluye obesidad de distribución central, elevación de los triglicéridos, dislipidemia aterogénica, hiperglucemia e hipertensión arterial, acompañado de estados protrombóticos y periodos proinflamatorios que favorecen la aparición de diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular que promueven la aparición de la EHGNA (Ramírez et al., 2021)

1.3.1.2 Prevalencia

Un análisis global en el año 2020 mostró que la EHGNA tiene una alta prevalencia en los continentes. Esto se ha asociado a las altas ingestas calóricas, la actividad física, la distribución de la grasa corporal, la genética de cada individuo y el nivel socioeconómico (Guo et al., 2022).

En la encuesta de examen nacional de salud y nutrición 2019-2020 se incluyeron más de 11.000 individuos con EHGNA, los cuales fueron seguidos por una media de 14,5 años, donde la principal causa de muerte fue enfermedad cardiovascular (9.3 %) y malignidad (5 %), mientras que las complicaciones relacionadas con la enfermedad hepática solo fueron reportadas como causa de muerte en el 0,4 %. Hasta la fecha, la evidencia ha indicado que la enfermedad coronaria es la principal causa de morbilidad en pacientes con EHGNA, así

como un vínculo con alteraciones funcionales y estructurales del miocardio, con o sin características coexistentes del síndrome metabólico (Verlarde et al., 2019).

Es preocupante que la prevalencia de EHGNA esté aumentando en todo el mundo, incluyendo países como México, donde existen varios factores de riesgo como la obesidad, la diabetes tipo 2 y la resistencia a la insulina. Es importante tomar medidas inmediatas para abordar este problema de salud nacional, como promover hábitos de vida saludables, fomentar la actividad física, mejorar la alimentación y brindar acceso a servicios de salud para el diagnóstico y tratamiento oportuno de esta enfermedad (Bernal et al., 2019).

2. Antecedentes

2.1 Mitochondria

Se conoce a la mitocondria como la central de energía de la célula. Su principal función es generar un suministro constante de trifosfato de adenosina (ATP), que es la molécula energética fundamental para la célula. El proceso mediante el cual se produce ATP a partir de moléculas de combustible como los azúcares se conoce como respiración celular, y gran parte de este proceso tiene lugar dentro de las mitocondrias. Estos orgánulos están suspendidos en el citosol gelatinoso de la célula, tienen una forma ovalada y están compuestos por dos membranas: una externa que rodea todo el orgánulo, y una interna que presenta numerosos pliegues hacia el interior conocidos como crestas, las cuales aumentan su superficie. El espacio entre las membranas se conoce como espacio intermembranoso, y el compartimento encerrado por la membrana interna se llama la matriz mitocondrial. La matriz contiene ADN mitocondrial y ribosomas (Lehninger et al., 2002).

2.2 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se caracteriza por un desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes, lo que resulta en una alteración de la señalización y el control redox, así como en el daño molecular (Sies y Jones, 2007). A pesar de que el oxígeno es esencial para la vida, también puede actuar como una especie altamente reactiva que genera ERO y radicales libres, lo que puede ser

perjudicial. Los radicales libres son átomos o moléculas con electrones desaparecidos que, al emparejar su electrón desapareado con el de otras moléculas, provocan la oxidación de dichas moléculas. Entre los radicales libres derivados del oxígeno se encuentran el anión superóxido ($O_2\bullet^-$) y el radical hidroxilo ($\bullet OH$). Además, las ERO también incluyen moléculas no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Ďuračková, 2008; Rains y Jain 2011; Jebur et al., 2016; Ullah et al., 2016).

Las ERO en cantidades moderadas desempeñan un papel importante como moléculas señalizadoras y como productos bioquímicos de diversas reacciones enzimáticas que ocurren en diferentes compartimentos celulares como parte del metabolismo normal. Sin embargo, cuando las ERO se encuentran en grandes cantidades, dependiendo de la fuente, el tipo celular y el tejido, pueden causar daño celular, disfunción metabólica y activar una respuesta inflamatoria, lo que contribuye a la fisiopatología de la diabetes mellitus (Forrester et al., 2018).

2.3 Antioxidantes

Los antioxidantes se definen como sustancias que pueden neutralizar directamente las ERO o actuar indirectamente regulando las defensas antioxidantes o inhibiendo la producción de ERO (Khlebnikov et al., 2007). La actividad antioxidante puede llevarse a cabo a través de diferentes mecanismos, como la inhibición de reacciones de oxidación, la interrupción de cadenas de autooxidación y enzimas prooxidativas, la quelación de metales, entre otros (Carocho y Ferreira, 2013).

El sistema endógeno antioxidante se divide principalmente en dos categorías: enzimática y no enzimática. El sistema enzimático está compuesto por enzimas que previenen la formación o neutralizan los radicales libres. Estas enzimas incluyen:

Glutación peroxidasa (GPx): Dona dos electrones para reducir el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a agua mediante la oxidación del glutatión.

Catalasa: Convierte el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno molecular.

Superóxido dismutasa (SOD): Dismuta el anión superóxido ($O_2\bullet^-$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Además, hay dos enzimas que apoyan a otros antioxidantes:

Glutación reductasa (GR): Reduce el glutatión oxidado (GSSG) a su forma reducida GSH mediante la oxidación de NADPH a $NADP^+$, lo que ayuda a reciclar el glutatión para neutralizar más radicales libres.

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa: Regenera NADPH, un cofactor necesario para la enzima GR, a partir de la reducción de $NADP^+$, lo que es crucial para mantener el equilibrio del glutatión GSH (GSH/GSSG).

El sistema antioxidante no enzimático está conformado por compuestos de bajo peso molecular, que incluyen:

Vitamina A (ácido retinoico): Ayuda a prevenir la propagación de la peroxidación de lípidos al combinarse con radicales peroxilo (HO_2).

Carotenoides: Tienen la capacidad de unirse a radicales peroxilo (HO_2) para evitar la peroxidación de lípidos.

Vitamina C (ácido ascórbico): Neutraliza radicales libres en el agua e hidroperóxidos de alcohol.

Vitamina E (α -tocoferol): Estabiliza los radicales lipídicos para prevenir la propagación de la peroxidación lipídica.

Coenzima Q_{10} : Previene o neutraliza los radicales peroxilo (HO_2) en los lípidos y participa en la regeneración de la vitamina E.

Ácido úrico: Un potente secuestrador del radical hidroxilo ($\bullet OH$).

Glutación (GSH): Un tripéptido que desempeña múltiples funciones, como participar en la detoxificación de H_2O_2 y HO_2 de los lípidos a través del glutatión peroxidasa, reducir H_2O_2 a agua y oxígeno, proteger los lípidos de la membrana contra el estrés oxidativo, actuar como cofactor de enzimas detoxificantes,

regenerar las vitaminas C y E, y proteger las células contra la apoptosis al interactuar con vías de señalización pro y antiapoptóticas.

Estos compuestos juegan un papel crucial en la protección celular contra el estrés oxidativo al neutralizar los radicales libres y prevenir el daño oxidativo en las células.

2.4 Estrés oxidativo en el hígado

El incremento de ácidos grasos libres en el hígado promueve el daño a la β -oxidación y a la disfunción mitocondrial, como consecuencia, una inflamación, lo que induce al estrés oxidativo (Montes Teves 2016).

Las mitocondrias realizan un papel sumamente importante en la oxidación de ácidos grasos y el aporte de energía (Guo et al., 2022).

Los individuos con EHGNA presentan daño mitocondrial ultraestructural, menor actividad del complejo de la cadena respiratoria y alteración de la síntesis de ATP. En el hepatocito la glucosa mejora la glucólisis lo que conduce a un aumento en el contenido de piruvato a través de la vía de la lipogénesis *de novo* (DNL) así el piruvato llega a las mitocondrias y se convierte en acetil-CoA por otro lado los AGL provenientes del plasma a través de la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1) pasan a convertirse en acil-CoA que mediante la β -oxidación se convierte en acetil-CoA que junto con el porcentaje de acetil-CoA de la glucólisis ingresan al ciclo de ácido tricarboxílico (TCA) para generar energía. Cuando los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial se encuentran reducidos anormalmente por los electrones reaccionando con el oxígeno, producen una cantidad elevada de ERO. Las ERO se continúan oxidando hasta formar peróxidos de lípidos, lo que provoca una reacción inflamatoria (Wang et al., 2023).

2.5 Tratamiento para la EHGNA

En la práctica clínica, los pacientes con EHGNA muestran triglicéridos elevados, LDL elevado y HDL reducido en las pruebas bioquímicas, síntomas que suelen estar asociados con características del síndrome metabólico, como la obesidad, la dislipidemia, la diabetes tipo 2 y la hipertensión. Sin embargo, se desconoce la

patogénesis de la EHGNA y esto se ha convertido en un obstáculo para el tratamiento de la EHGNA. Los primeros estudios sugieren que la resistencia a la insulina (IR) y la esteatosis hepática debido al exceso de ácidos grasos son el "primer golpe", mientras que los hepatocitos eventualmente sufren daño, inflamación, fibrosis y otros cambios patológicos debido al estrés oxidativo y la peroxidación lipídica para formar el "segundo golpe". Hoy en día, está ampliamente aceptado que la teoría del "impacto múltiple" se basa en la teoría del "segundo impacto", que incluye varios factores como el estrés oxidativo, el estrés del retículo endoplásmico (RE) y la lipotoxicidad. Esta teoría también proporciona una explicación más precisa de la patogénesis de la EHGNA (Guo et al., 2022).

El tratamiento de la EHNA es problemático debido a la falta de fármacos aceptados por la Food and Drug Administration (FDA). Si bien las directrices recomiendan un rango limitado de medidas, incluyendo cambios en el estilo de vida y la dieta, el uso de terapia hepatoprotectora es limitado en la EHGNA (Kosmalski et al., 2023).

Sin embargo, los pacientes con EHGNA suelen tener dificultades para mantener un estilo de vida mejorado. Se ha descrito que los efectos de los productos naturales generalmente se evaluaban en diversas vías de señalización relacionadas con el metabolismo de los lípidos, el estrés oxidativo, el estrés del retículo endoplásmico (RE) y la lipotoxicidad, y mostraban excelentes efectos terapéuticos (Arab et al., 2021).

2.6 *Eryngium spp.*

En México se han registrado al menos 300 especies de plantas con propiedades hipoglucémicas, pertenecientes a 93 familias diferentes. Entre estas familias se encuentran Asteraceae, Fabaceae, Cactaceae, Solanaceae, Agavaceae, Lamiaceae y Apiaceae, entre otras (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). El género *Eryngium spp.* L., es el que cuenta con la mayor cantidad de especies (230-250) distribuidas en regiones templadas y tropicales de Euroasia, África, América (específicamente en la zona centro occidental de México y en el centro oriental de Sudamérica) y Australia. Algunas especies de *Eryngium spp.* L. se han utilizado con

propósitos ornamentales, alimenticios y medicinales. Se les atribuyen diversas actividades biológicas como antimicrobiana, citotóxica, anticancerígena, antifúngica, hipoglucémica, antiinflamatoria, analgésica, antioxidante, antidiabética y efectos contra el veneno de serpientes y escorpiones (Wang, 2012; Sepanlou et al., 2019).

Los estudios en la literatura de la composición fitoquímica de las diversas especies de *Eryngium spp.* L. indican que su actividad biológica se debe a la presencia de una amplia gama de metabolitos secundarios. Estos incluyen principalmente flavonoides, saponinas y aceites esenciales, así como compuestos fenólicos y terpenoides, como saponinas triterpenoides, sesquiterpenos, cumarinas, esteroides, lactonas, acetilenos y oligosacáridos, entre otros. Sin embargo, la mayoría de las especies de *Eryngium* L. no han sido investigadas a fondo en cuanto a su composición fitoquímica y su actividad biológica. Entre estas especies se encuentra *Eryngium carlinae* (Wang, 2012; Erdem et al., 2015).

2.6.1 *Eryngium carlinae*

Eryngium carlinae, conocida comúnmente como hierba del sapo o cabezona, es una planta herbácea perenne que pertenece a la familia *Apiaceae* Lindley. Presenta un tallo ramificado y hojas basales dispuestas en una roseta densa con márgenes espinosos. Las hojas tienen una lámina de color verde con nervios blancos marcados. Sus inflorescencias están formadas por cabezuelas ovoides de color azul-violeta, que miden entre 5-12 mm de largo y 5-10 mm de ancho, y están rodeadas por brácteas generalmente espinosas con el envés verde y el haz blanquecino. Esta planta se encuentra ampliamente distribuida en praderas, pastizales y bosques de encino, pino, pino-encino y coníferas en varios estados de México, incluyendo Aguascalientes, Chiapas, Chihuahua, Ciudad de México, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas. En el estado de Michoacán, específicamente se puede encontrar a lo largo de la sierra central y en la región de los Valles y Ciénegas, que incluye al municipio de Morelia (Bello-González, 2006; García-Ruiz, 2015).

En la medicina tradicional se han empleado infusiones de *E. carlinae* para tratar diferentes afecciones tales como la tos, indigestión, enfermedades de la próstata, trastornos de los lípidos y diabetes (Bello-González, 2006; Saavedra-Molina et al., 2014).

Estudios previos sobre la planta, han demostrado la actividad hipolipidémica de un extracto etanólico de la parte aérea de *E. carlinae* (a una concentración de 30 mg/kg) en ratas con diabetes mellitus inducida con estreptozotocina esto al reducir la hiperlipidemia relacionada con el desarrollo de una enfermedad cardiovascular sin alterar niveles de colesterol HDL (Noriega-Cisneros et al., 2012; 2019); la actividad hipoglucémica en un extracto acuoso de inflorescencias (0.6 g/día) en ratas con obesidad, además disminuyó el daño oxidativo, las proteínas inflamatorias (incluyendo TNF- α e IL-6) y la acumulación de lípidos en riñón (Pérez-Ramírez et al., 2016); la actividad hipocolesterolémica e hipolipidémica de un extracto hidroalcohólico (70 %) de la parte aérea (100 mg/kg) en ratones hipercolesterolémicos, al disminuir el colesterol total sin alterar los niveles de colesterol HDL (Castro-Torres et al., 2017); la actividad antioxidante (*in vitro* e *in vivo*), hipoglucémica e hipolipidémica del extracto hexánico de inflorescencias (10 mg/mL *in vitro* y 30 mg/kg *in vivo*) en ratas con diabetes mellitus experimental (DME) inducida con estreptozotocina (STZ) al reducir significativamente el daño oxidativo a lípidos y proteínas, reducir los niveles de ERO, restaurar la actividad de enzimas antioxidantes y disminuir los niveles de glucosa en sangre y el contenido de TAG en suero (García-Cerrillo et al., 2018; Peña-Montes et al., 2019); y la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de tallos y hojas de *E. carlinae* en un modelo inflamación aguda al disminuir de forma dosis dependiente los niveles de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF α y promoviendo el aumento de la dosis dependiente de la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10 (Arana-Argáez et al., 2021).

Estas actividades biológicas se les atribuyen a su contenido de metabolitos secundarios extraídos, los cuales incluyen: sesquiterpenos, fitoesteroles, polifenoles, saponinas, flavonoides, terpenos, taninos y terpenoides (Pérez-

Ramírez et al., 2016; Castro-Torres et al., 2017; Knauth et al., 2018; Noriega-Cisneros et al., 2019).

Sin embargo, en la literatura no se han encontrado informes sobre la actividad antioxidante atribuida al extracto etanólico ni sobre su actividad antiinflamatoria en un modelo experimental de EHNA, lo que hace que sea interesante investigar este aspecto.

3. JUSTIFICACIÓN

La prevalencia e incidencia mundial en los últimos años de la EHGNA han ido en aumento, esto debido al cambio de alimentación y estilo de vida. Los síntomas de esta enfermedad, se presentan en etapas avanzadas cuando ya no es posible revertirla. Hoy en día no se ha descrito un tratamiento farmacológico único y específico para tratar esta patología. Sin embargo, estudios han demostrado que productos naturales pueden coadyuvar en el desarrollo y progreso de la EHGNA. Se ha demostrado que *E. carlinae* posee una alta cantidad de antioxidantes los cuales tienen un efecto hipolipemiante antiinflamatorio, hipoglucémico. Por lo que este trabajo pretende demostrar el efecto del extracto etanólico de *E. carlinae* en el desarrollo y progresión de la EHGNA en ratas.

4 HIPÓTESIS

El extracto etanólico de *E. carlinae* inhibe el desarrollo de EHGNA al disminuir el estrés oxidativo provocado por el aumento de los lípidos intrahepáticos, generados por el consumo de una dieta alta en grasas y carbohidratos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del extracto etanólico de *E. carlinae* en hígado de ratas con enfermedad hepática grasa no alcohólica.

5.2 Objetivos específicos

1. Describir la actividad antioxidante del extracto etanólico de *E. carlinae in vitro*
2. Determinar el efecto del extracto etanólico de *E. carlinae* en la función mitocondrial de hígado de ratas con EHGNA
3. Evaluar el efecto del extracto etanólico de *E. carlinae* en el estrés oxidante de hígado de ratas con EHGNA

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Identificación y recolección de *Eryngium carlinae*

Las plantas de *Eryngium carlinae* se recolectaron en la localidad de Charo, Michoacán, México (19°38'2" Norte, 101°16'14" Oeste) a una altitud de 2030 msnm, durante el periodo de septiembre-noviembre de 2022.

6.2 Preparación del extracto etanólico de *E. carlinae*

Tallo, hojas e inflorescencias de *Eryngium carlinae* se secaron a temperatura ambiente y fueron trituradas hasta obtener fragmentos pequeños. El extracto se obtuvo mediante la maceración con etanol en relación 1:10 (p/v). Se almacenó durante 20 días en oscuridad a temperatura ambiente. El extracto posteriormente, fue filtrado y concentrado en un rotavapor a 55 ± 5 °C. Posteriormente se resuspendió 1:1 con etanol – agua y se almacenó en oscuridad a 4 °C a una concentración de 100 mg/mL.

6.3 Prueba de FRAP

La actividad antioxidante total se midió mediante el ensayo de poder antioxidante reductor férrico (Vijayalakshmi y Ruckmani, 2016). El extracto de acetato de etilo a diferentes concentraciones (7.5, 15, 30 y 60 mg/mL) se añadió a 1 mL de agua desionizada, 2.5 mL de un buffer de fosfatos 0.2 M (pH 6.6) y 2.5 mL de una solución de ferrocianuro de potasio al 1 %. La solución fue mezclada e incubada a 50 °C por 20 min. Al finalizar, a la incubación se le agregó 1.5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % y se centrifugó a 3000 rpm 10 min. El sobrenadante (2.5 mL) se mezcló con 2.5 mL de agua desionizada y 0.5 mL de cloruro férrico al 0.1 %. La absorbancia de la mezcla se midió a 700 nm en un espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 18 UV-VIS. La capacidad reductora se expresó como la concentración

requerida para reducir el hierro férrico a su forma ferrosa presente en la solución al 50 %.

6.4 Radical ABTS

La actividad del extracto para la eliminación de radicales libres se evaluó utilizando un radical libre estable, el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) ABTS. Brevemente, se mezclaron el extracto (0.0625, 0.125, 0.250 y 0.500 mg/mL) y la solución de ABTS posteriormente se diluyó en buffer ácido acético-acetato de sodio (pH 5). Las muestras se incubaron durante 3 min a temperatura ambiente en ausencia de luz. Posteriormente, se midió la absorbancia a 734 nm con un espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 18. Se utilizó Trolox (200 µg/mL) como estándar de referencia (Peñarrieta, J. et al., 2008).

6.5 Material biológico

Se emplearon ratas Wistar macho de 3 meses y medio de edad, con peso entre 300-350 g, las cuales fueron obtenidas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Fueron mantenidas en un bioterio bajo condiciones de temperatura controlada y ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas. Para su estudio se dividieron en cuatro grupos experimentales; el grupo control, fue alimentado con comida estándar para roedores (Laboratory Rodent Diet 5001, LabDiet, St.Louis, MO, USA) y agua *ad libitum*, los tres grupos restantes fueron alimentadas con una dieta alta en grasa y alta en carbohidratos compuesta por 2.5 % manteca de puerco, 10 % sacarosa, 10 % aceite vegetal hidrogenado, 1 % colato de sodio, 10 % lactosa, 0.2 % cloruro de colina, 0.075 % tiouracilo, 66.225% alimento. Se incluyó 25 % de fructosa en el agua potable (AGAC+F) (García-Berumen, 2022). Los animales fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana, al finalizar los tratamientos fueron sacrificados para la extracción del material biológico. Para el manejo de los animales se siguieron las recomendaciones de la norma para el uso de animales expedida por la Secretaría

de Agricultura en el párrafo de Regulaciones Federales para el Uso de Animales (NOM-062-ZOO-1999). Esta investigación también fue aprobada por el Comité Institucional para el Uso de Animales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

6.6 Diseño experimental de los estudios *in vivo*

Para el estudio las ratas fueron divididas al azar en cuatro grupos de 5 ratas por grupo: 1) grupo control (Control), alimentado con comida estándar para roedores por doce semanas; 2) control + *E. carlinae* (grupo alimentado durante 12 semanas con dieta estándar y administrado con extracto etanólico); 3) EHGNA (grupo alimentado durante 12 semanas con dieta alta en grasas y fructosa); 4) EHGNA + *E. carlinae* (grupo alimentado durante 12 semanas con dieta alta en grasas y fructosa y administrado con extracto etanólico), 5) EHGNA + *E. carlinae* (grupo alimentado durante 12 semanas con dieta alta en grasas y fructosa por 12 semanas al concluir se administraron con el extracto etanólico de *Eryngium carlinae* durante ocho semanas además de que fue cambiada al mismo tiempo la dieta por alimentación estándar). El extracto de *Eryngium carlinae* se administró vía oral diariamente en dosis de 30 mg/kg de peso de la rata, empleando una cánula intragástrica.

6.7 Determinación de parámetros bioquímicos

La cuantificación de glucosa, triacilglicéridos, fosfatasa alcalina, alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa (parámetros de función hepática) se determinó en suero sanguíneo mediante química seca con doble ciego en el hospital veterinario COCAN en Morelia, Michoacán.

6.8 Cuantificación de triacilglicéridos hepáticos

La determinación de triacilglicerol en el hígado se llevó a cabo mediante la metodología reportada por Aguilera-Méndez y Fernández-Mejía (2012) con algunas modificaciones en el homogeneado de hígado. Brevemente, 10 µg/µL de proteína se resuspendieron en una solución de PBS y se le añadió 25 µL de tritón-X100 al 5

%. Las muestras se sometieron a un baño ultrasónico a 55 °C por 5 min y se dejaron atemperar. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 13,300 rpm durante 15 min. A partir del sobrenadante obtenido se determinó la concentración de triacilglicerol de acuerdo con el kit de ensayo comercial Spinreact (Sant Esteve de Bas, España).

6.9 Aislamiento de mitocondrias

Al finalizar los tratamientos, las ratas fueron sacrificadas por decapitación, y el hígado fue extraído, se colocó en un medio de aislamiento (220 mM manitol, sacarosa 70 mM, EGTA 1 mM y MOPS 2 mM, pH 7.4). Las mitocondrias se aislaron mediante centrifugación diferencial con el método descrito por Saavedra-Molina y cols., 1997. Para obtener las mitocondrias, el hígado fue triturado y lavado con medio 1 (220 mM manitol, 70 mM sacarosa, 2 mM MOPS y 1 mM EGTA, a pH 7.4). Los fragmentos fueron homogeneizados con un homogeneizador Potter Elvehjem y centrifugados a 2000 rpm, el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 7500 rpm y la pastilla resultante fue lavada con medio 2 (220 mM manitol, 70 mM sacarosa y 2 mM MOPS, a pH 7.4) y centrifugada a 9000 rpm. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 500 µL de medio 2. Cada centrifugación se realizó durante 10 minutos a 4 °C.

6.10 Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína mitocondrial se determinó por el método de Biuret (Gornall, 1949). Posteriormente, se realizaron los cálculos correspondientes para ajustar el volumen de acuerdo del experimento a realizar (0.5 mg/mL, 0.3 mg/mL y 0.1 mg/mL).

6.11 Determinación del consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno se midió empleando un electrodo tipo Clark acoplado a un monitor de oxígeno YSI 5300 y a un graficador. La cámara del electrodo fue lavada una vez con etanol al 70 %, seguido de tres lavados con agua desionizada. Se utilizaron mitocondrias a una concentración de 0.5 mg/mL, las cuales fueron adicionadas a la cámara, la cual previamente contenía el medio de respiración (100

mM KCl, 75 mM manitol, 25 mM sacarosa, 0.05 mM EDTA, pH 7.4). La cámara se dejó equilibrar en agitación constante para permitir la saturación de aire del medio de respiración. Inmediatamente fue inducida la respiración basal (estado 4), la cual es estimulada por la adición de 10 mM de glutamato/malato. Una vez transcurridos 3 min, se adicionó ADP (0.2 mM) para estimular al máximo la respiración (estado 3) y finalmente después de 3 min se agregó KCN (0.4M) para detener el consumo de oxígeno. A partir de los valores obtenidos en los estados de respiración 4 y 3 se calculó el cociente respiratorio (CR), el cual representa la cantidad de oxígeno que consumen las mitocondrias y el acoplamiento que existe entre la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa. El CR fue determinado mediante la siguiente relación:

$$\text{CR} = \text{Consumo de oxígeno en el estado 3} / \text{Consumo de oxígeno en el estado 4}$$

6.12 Actividad de los complejos de la cadena de transporte de electrones.

Las actividades de los complejos mitocondriales fueron determinadas en un espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 18 UV/vis a temperatura ambiente utilizando sustratos e inhibidores específicos para cada complejo mitocondrial.

6.12.1 Actividad de NADH: quinona oxidorreductasa (complejo I). Se agregaron 0.3 mg/mL de proteína para un volumen final de 1600 μL de agua desionizada, se mezcló e incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. Pasados los dos minutos, se agregaron 400 μL de buffer de fosfatos 250 mM (para obtener una concentración final de 50 mM), 10 μL de antimicina A, 10 μL de KCN, se mezcló e incubó durante 4 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron 10 μL de ferrocianuro de potasio 5 mM. Se inició el trazo en el espectrofluorómetro, transcurrido el primer minuto, se agregaron 20 μL de NADH y el trazo se mantuvo por dos minutos más.

6.12.2 Actividad de succinato deshidrogenasa (complejo II)

Se agregó 0.3 mg/mL de mitocondrias aisladas y buffer de fosfatos (50 mM KH_2PO_4 , pH 7.6) para un volumen final de 1 mL, seguido de 1 mM de rotenona, 1 mM de KCN, y 1 mM de antimicina A, se mezcló y se incubó durante 5 minutos, transcurrido

el tiempo de incubación se agregaron 80 mM de DCIP, 10 mM de succinato, se mezcló y se comenzó a leer el trazo en el espectrofluorómetro a una longitud de onda de 591 nm durante 5 minutos, durante los cuales se medirá la reducción del DCIP el cual actúa como un aceptor artificial de electrones.

6.12.3 Actividad de succinato-citocromo c oxidorreductasa (complejo III)

Se utilizaron 0.1 mg/mL de mitocondrias en un volumen de 1 mL de buffer de fosfato (50 mM KH_2PO_4 , pH 7.6). Se incubaron cinco minutos con 1 mM de rotenona y 1 mM de KCN. Al término de la incubación se agregaron 1.5 mM de citocromo c y se comenzó la lectura que se registró en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm. Transcurrido un minuto, se agregó 10 mM de succinato y se continuó el trazo durante dos minutos más, durante los cuales se midió la reducción del citocromo c. La reacción se detuvo al agregar 1 μg de antimicina A, la cual es un inhibidor del complejo III. La reducción del citocromo c sensible a antimicina se calculó restando la actividad en presencia de succinato de la actividad en presencia de succinato + antimicina A.

6.13 Niveles de peroxidación de lípidos

Se inició preparando un stock de FeSO_4 , se pesó en un tubo Eppendorf 0.0035 g de FeSO_4 y se agregó 1 mL de agua desionizada y tres gotas de ácido sulfúrico. Se comenzó la primera etapa en tubos Eppendorf agregando 1 mL de buffer de fosfatos 50 mM, las mitocondrias a una concentración de 0.5 mg/mL, se realizaron duplicados y a la mitad de las muestras se les agregó 4 μL FeSO_4 , posteriormente se incubaron 30 min en hielo. Cabe destacar que el FeSO_4 se agrega para aumentar la oxidación de ácidos grasos y confirmar que la técnica funciona; la absorbancia de las muestras que lo contienen es mayor. Terminada la incubación se comenzó con la segunda etapa tomando 400 μL de la muestra (etapa 1), se agregó 1300 μL de Metilfenilindol (MF1) 10 mM, 300 μL de metano sulfúrico y se agregó 20 μL de FeCl_3 0.5 mM a cada tubo, se agitó en vórtex y se incubaron a baño maría a 45 °C durante 30 min, se sacaron y dejaron atemperar durante 5 min. Transcurrida la

incubación, se tomó el sobrenadante, se colocó en la celda y se procedió a leer a 586 nm. Se llevó a cabo la detección del malondialdehdo, producto primario de la oxidación de lípidos. A mayor absorbencia, mayor cantidad de malondialdehido y a mayor cantidad de malondialdehido, mayor oxidación de lípidos.

6.14 Producción de especies reactivas de oxígeno

Esta determinación se realizó evaluando la oxidación de la sonda fluorescente 2'7'-diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína (DCDHF-DA). En la celda se añadió 0.5 mg/mL de suspensión de mitocondrias aisladas y 5 μ L de DCDHF-DA (500 mM) para obtener un volumen final de 2 mL de medio, se incubaron en hielo y agitación durante 20 minutos protegidos de la luz. La lectura de la fluorescencia se realizó a una λ de excitación de 485 nm y una λ de emisión a 520 nm. Después de 1 min se añadió una concentración de 10 mM de glutamato/malato y se midió el incremento en la fluorescencia, el trazo se detuvo a los 15 minutos. Los resultados son presentados como unidades arbitrarias de fluorescencia.

6.15 Potencial de membrana

El potencial de membrana ($\Delta\Psi$) se determinó mediante espectrofotometría, empleando el indicador safranina O (Colonna, 1973). A un medio de oximetría (100 mM KCl, 75 mM manitol, 25 mM sacarosa, 0.05 mM EDTA, pH 7.4), se agregó la cantidad correspondiente de mitocondrias 0.5 mg/mL y safranina 6 mM. Se comenzó la lectura en un espectrofluorómetro "Shimadzu RF-5301PC" a una λ_{em} 586 y una λ_{ex} 495. Transcurridos 1 min de iniciada la lectura, se añadió una concentración de 10 mM de glutamato/malato y a los 4 min se añadió CCCP (carbonilcianuroclorofenilhidrazina) para abatir el potencial de membrana mitocondrial.

6.16 Determinación de la actividad de la enzima Catalasa

La actividad de la catalasa se determinó midiendo la conversión de peróxido de hidrógeno en oxígeno disuelto empleando un electrodo de oxígeno tipo Clark conectado a un monitor biológico de oxígeno (Jeulin et al., 1989). 0.1 mg/mL de

proteína de homogeneado de hígado se resuspendió en buffer de fosfatos 0.1 M y EDTA 5 mM (pH 7.6) a 25 °C y se monitoreó por 1 min. Posteriormente, se agregó a la cámara una solución de H₂O₂ 5 mM y se monitorea la conversión de H₂O₂ a O₂ por 3 min.

6.17 Determinación de superóxido dismutasa

La actividad de la SOD se evaluó empleando un kit de análisis comercial (Sigma-Aldrich, kit de determinación 19160 SOD), el cual permite analizar la actividad de la enzima mediante un método colorimétrico. Posterior a la incubación de 0,2 mg de mitocondria de hígado a 37 °C por 20 min, las lecturas se tomaron a 450 nm empleando un lector de microplaca Multiskan Go (Thermo Scientific).

6.18 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los ensayos *in vitro* se expresaron como la media desviación estándar (DE) de 3 experimentos independientes. Los resultados de los ensayos *in vivo* se expresan como la media $\pm$ error estándar (EE) de una n=5. El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de varianza ANOVA de una sola vía, seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

7 Resultados

7.1 Actividad antioxidante del extracto etanólico de *E. carlinae* *in vitro*

La actividad antioxidante *in vitro* del extracto de etanol de *E. carlinae*, se determinó a través de la estabilización y reducción de una molécula oxidante. En donde podemos observar que hay aumento de la inhibición del radical al aumentar la concentración de 0.5 mg/mL del extracto (figura 1A) y un incremento en el porcentaje de reducción férrica al aumentar la concentración de 20 mg/mL (figura 1B).

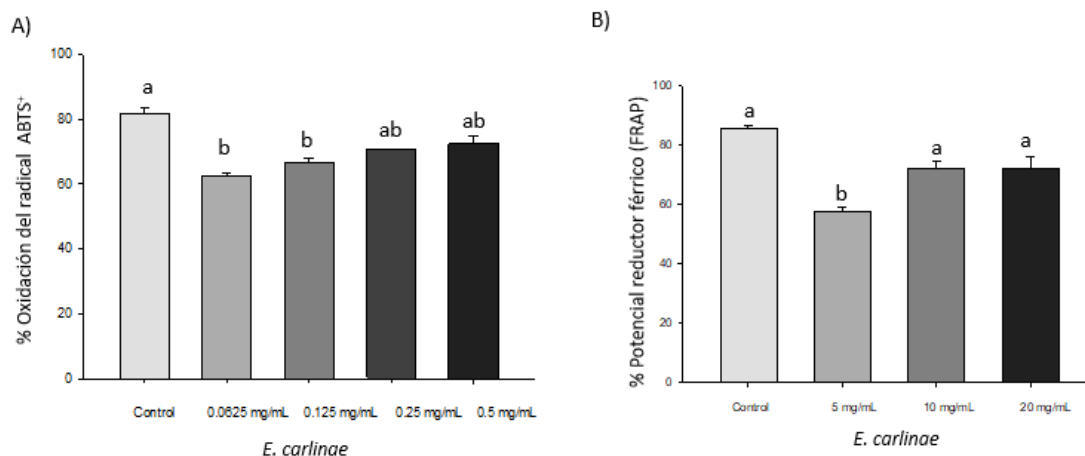


Figura 1. A) Porcentaje de oxidación del radical ABTS y B) Porcentaje de potencial reductor férrico (FRAP). En las diferentes concentraciones del extracto de *E. carlinae*. Los valores se representan con media $\pm$ error estándar (ANOVA de una sola vía, Tukey $p \leq 0.05$, $n=5$).

7.2 Efecto del extracto etanólico de *E. carlinae* la ganancia de peso *in vivo*

Uno de los síntomas principales que se experimenta en la EHGNA es la hepatomegalia. Es por ello que se decidió analizar el peso del hígado, así como el peso corporal, observando que el peso del hígado se encuentra aumentado en el grupo EHGNA alrededor de 8 g más en comparación con el grupo sano, el peso del hígado para el grupo EHGNA + *E. carlinae* fue alrededor de 4 g más que el grupo sano (figura2).

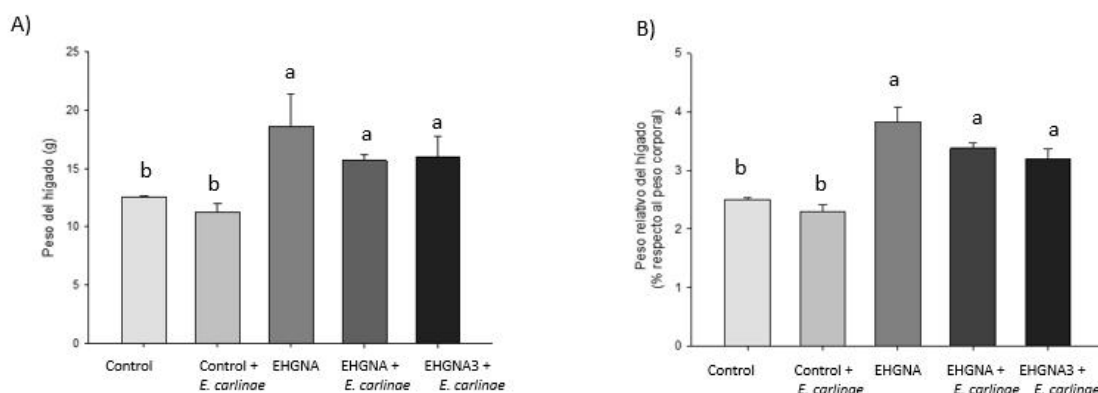


Figura 2. A) Peso del hígado (g), B) peso relativo del hígado en porcentaje respecto al peso corporal en los diferentes tratamientos experimentales. Los valores se representan con media $\pm$ error estándar (ANOVA de una sola vía, Tukey $p \leq 0.05$, $n=5$).

7.3 Efecto del extracto etanólico de *E. carlinae* sobre parámetros bioquímicos y de daño hepático

Para determinar la actividad antioxidante del extracto se evaluó la actividad enzimática en suero sanguíneo de los animales tratados de fosfatasa alcalina (FA), alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) para determinar el daño hepático. La glucosa y los TAG también fueron medidos debido a que el aumento de ambos es de los principales marcadores de daño hepático. Los niveles de glucosa se encuentran elevados en el grupo EHGNA, pero hay una diferencia significativamente menor en los grupos enfermos tratados con el extracto (figura 3A). Los niveles de TAG están aumentados al doble en el grupo enfermo en comparación con los grupos control y el grupo EHGNA + *E. carlinae* también hay una diferencia significativa con el grupo EHGNA + *E. carlinae* (figura 3B). Los niveles

de FA se encuentran elevados en el grupo EHGNA, pero en el grupo EHGNA + *E. carlinae* hay una disminución de este marcador (figura 3C). En el caso de la ALT los niveles en los grupos enfermos se encuentran elevados en comparación con el grupo control (figura 3D). Por último, los niveles de la AST se encuentran elevados del grupo con EHGNA Y EHGNA3 + *E. carlinae* pero estos disminuyen 2.5 veces en el grupo EHGNA + *E. carlinae* (figura 3E).

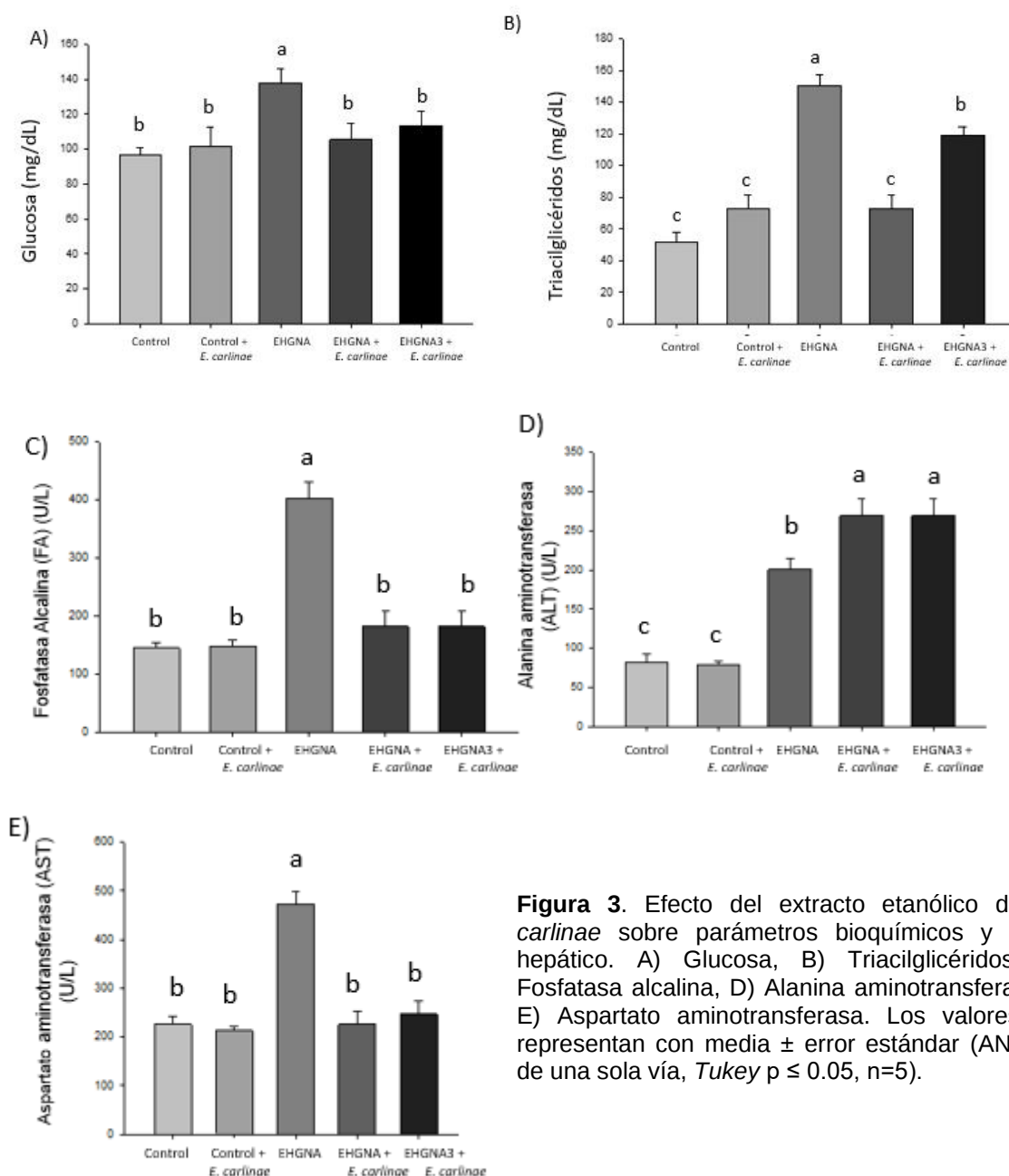


Figura 3. Efecto del extracto etanólico de *E. carlinae* sobre parámetros bioquímicos y perfil hepático. A) Glucosa, B) Triacilglicéridos C) Fosfatasa alcalina, D) Alanina aminotransferasa y E) Aspartato aminotransferasa. Los valores se representan con media $\pm$ error estándar (ANOVA de una sola vía, Tukey $p \leq 0.05$, $n=5$).

7.4 Influencia del extracto etanólico de *E. carlinae* sobre el contenido de TAG en hígado

Para conocer el efecto del extracto sobre la acumulación de triacilglicerol en el hígado, se determinó su contenido en homogenado de hígado de ratas en los diferentes tratamientos (figura 4). El contenido de TAG en el grupo EHGNA se incrementó un 30 % más que en los grupos controles, sin embargo, la administración del extracto de *E. carlinae* logró movilizar el contenido de TAG a niveles estadísticamente iguales a los del grupo control.

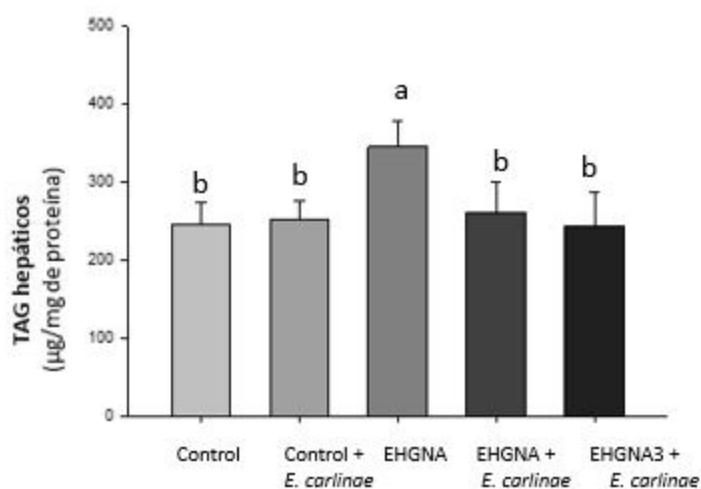


Figura 4. Influencia del extracto de etanólico de *E. carlinae* sobre el contenido de TAG en hígado. Los valores se representan con media $\pm$ error estándar (ANOVA de una sola vía, Tukey $p \leq 0.05$, $n=5$).

7.5 Efecto del extracto etanólico de *E. carlinae* en la respiración mitocondrial

En cuanto a la función mitocondrial, inicialmente se midió el consumo de oxígeno. Los resultados muestran una disminución en el estado tres del consumo de oxígeno en el grupo enfermo EHGNA en comparación con el resto de los grupos, mostrando en los grupos enfermos administrados con extracto (EHGNA + *E. carlinae* y EHGNA3 + *E. carlinae*), restableciendo el consumo de oxígeno de igual manera que los grupos controles (figura 5A). Para el estado cuatro no se observó una diferencia significativa entre los tratamientos (figura 5B). Se observa en el cociente respiratorio una disminución en el estado tres en el grupo enfermo EHGNA en comparación con

el resto de los grupos, mostrando en los grupos enfermos administrados con extracto que restableció el consumo de oxígeno de igual manera que los grupos controles (figura 5C). Posteriormente, se evaluó el potencial de membrana en donde se observó una disminución en el grupo enfermo en comparación con el resto de los grupos y el extracto restableció este potencial en los grupos enfermos (figura 5D).

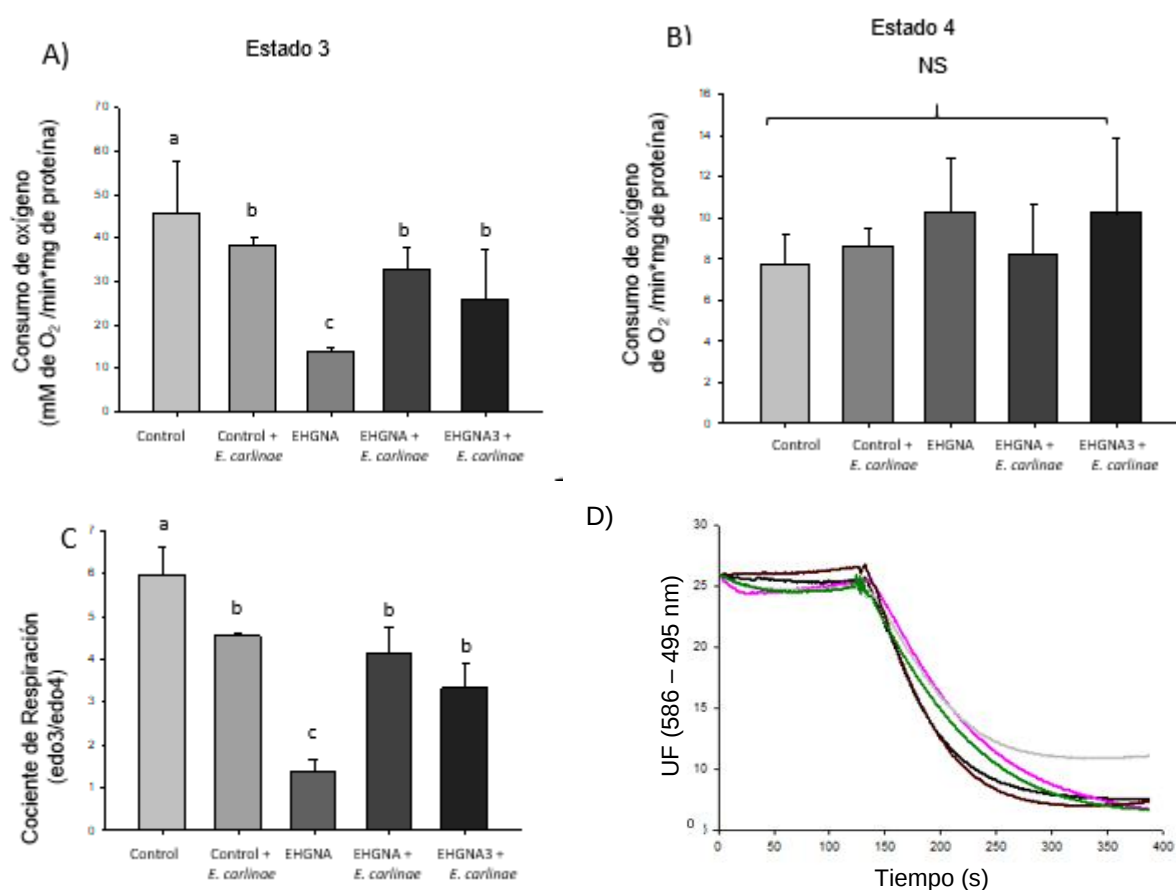


Figura 5. Estado 3 (A), Estado 4 (B), Cociente Respiratorio (C) y en los diferentes tratamientos experimentales. Panel D Trazos representativos del potencial de membrana (expresado en unidades de fluorescencia), (control) trazo de color café, (control + *E. carlinae*) trazo de color negro, (EHGNA) trazo de color gris, (EHGNA + *E. carlinae*) trazo de color verde, (EHGNA3 + *E. carlinae*) trazo de color rosa. Los valores se representan con media $\pm$ error estándar (ANOVA de una sola vía, Tukey, $p \leq 0.05$, $n=5$).

7.6 Efecto del extracto etanólico de *E. carlinae* en la función de los complejos de la CTE.

Para conocer el grado de funcionalidad de los complejos de la CTE y el efecto que posee el extracto sobre los complejos mitocondriales, se llevó a cabo la determinación de la actividad de los mismos (figura 6). Las ratas del grupo EHGNA mostraron un incremento significativo en la actividad de los complejos II y III (figura 6B, 6C), en comparación con las ratas de los grupos controles y los enfermos tratados con el extracto de alrededor del 40 y 50 % respectivamente. Por otro lado, la actividad del complejo I, disminuyó en el grupo EHGNA cerca del 70 % (figura 6A), en comparación con los grupos controles. Sin embargo, hay una tendencia a restablecer la actividad del complejo I con la administración del extracto a los grupos enfermos (figura 6A). En cambio, la actividad del complejo IV, no mostró cambios significativos entre los grupos (figura 6D).

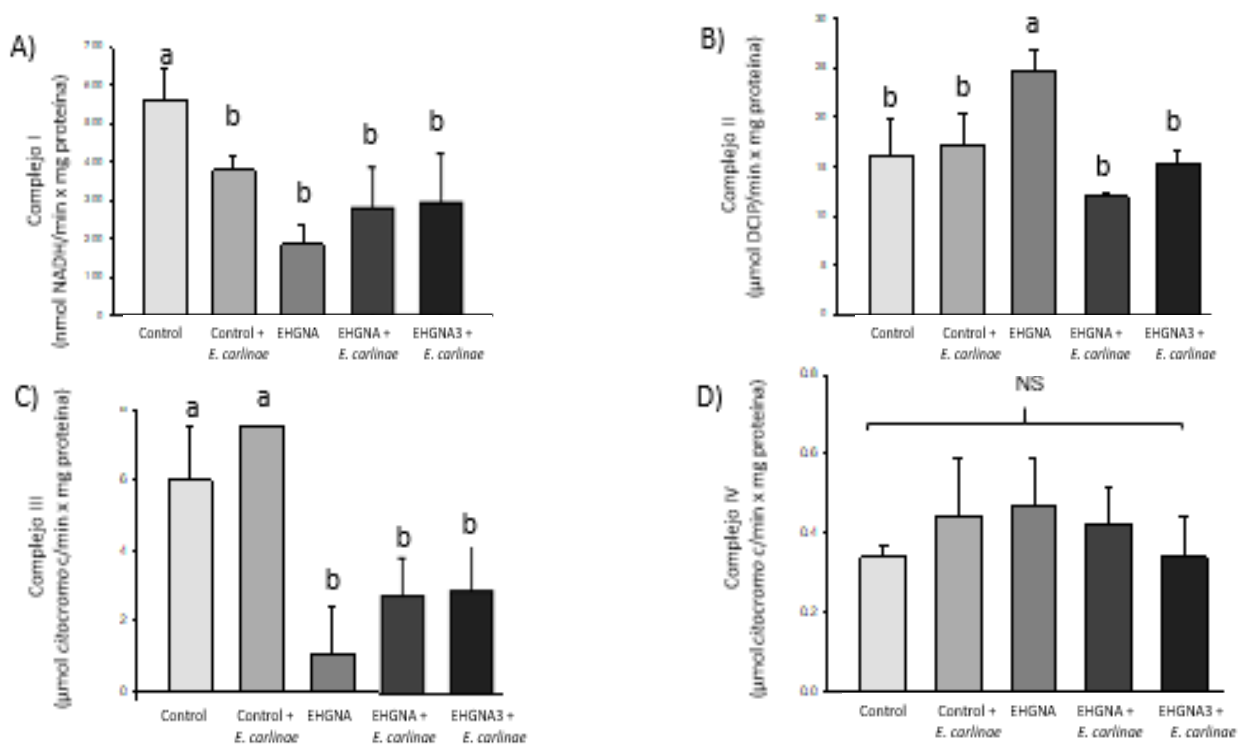


Figura 6. Actividad del complejo I (A), complejo II (B), complejo II+III (C) y complejo IV (D) en los diferentes tratamientos experimentales. Los valores se representan con media $\pm$ error estándar ANOVA de una sola vía, Tukey, $p \leq 0.05$, $n=5$).

7.7 Efecto del extracto etanólico de *E. carlinae* en los niveles lipoperoxidación y producción de especies reactivas de oxígeno.

Las mitocondrias de los grupos control *E. carlinae*, EHGNA y EHGNA 3 + *E. carlinae* mostraron un incremento significativo en los niveles del residuo primario de lipoperoxidación (malondialdehído) comparado con el grupo control. Por otro lado, la administración del extracto previno la peroxidación de lípidos en el grupo EHGNA + *E. carlinae* (Figura 7A). Para conocer si el extracto posee actividad antioxidante a través del secuestro directo de las ERO por parte de los metabolitos secundarios presentes, se determinó la producción de ERO, (figura 7B). Las ERO en mitocondrias del grupo EHGNA, fueron 2.2 veces en los grupos controles. En cambio, la administración del extracto, disminuyó la producción de ERO en el grupo EHGNA + *E. carlinae* a niveles similares a los observados en el grupo control (figura 7).

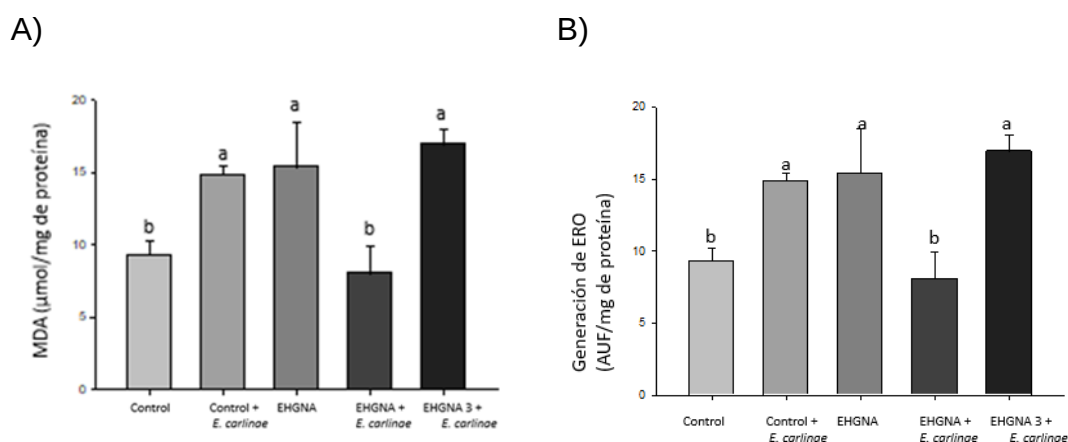


Figura 7. Producción de malonaldehído (MDA) en los diferentes tratamientos experimentales y el efecto de *E. carlinae* (A) así como el efecto del extracto sobre la producción de ERO (B). Los valores se representan con media $\pm$ error estándar (ANOVA de una sola vía, Tukey, $p \leq 0.05$, $n=5$).

7.8 Efecto del extracto etanólico de *E. carlinae* en la actividad de las enzimas antioxidantes

Para conocer la actividad antioxidante del extracto, se evaluó su efecto sobre la actividad de dos enzimas antioxidantes importantes en la detoxificación de ERO, la catalasa y la enzima superóxido dismutasa (SOD). Los niveles de la actividad de la catalasa del grupo EHGNA son significativamente menores que en los grupos controles y los tratados con el extracto (figura 8A).

Asimismo, la actividad de la enzima SOD del grupo EHGNA mostró una disminución significativa de alrededor del 54 %, en comparación con el grupo control (figura 8B). Los resultados muestran un efecto antioxidante y protector en los grupos EHGNA + *E. carlinae*, el cual tuvo un incremento significativo de 1.3 veces más que el grupo EHGNA, respectivamente.

A)

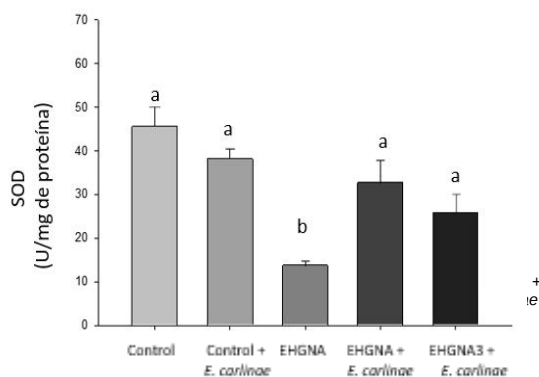
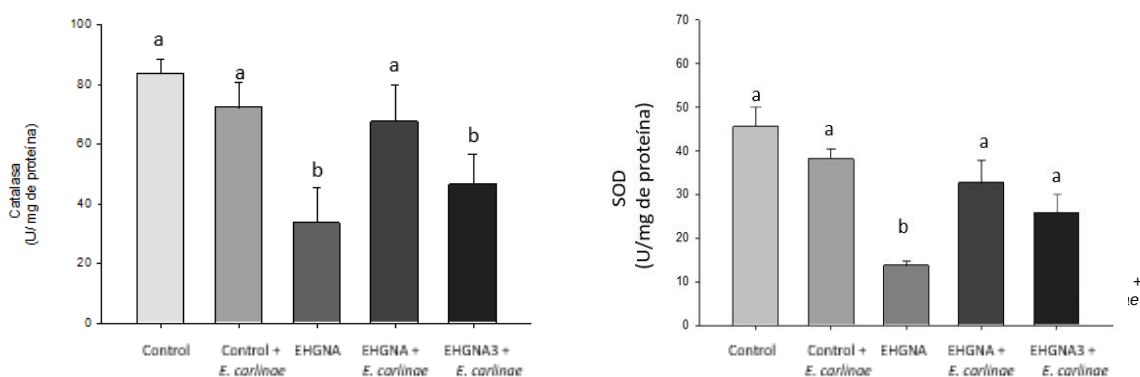


Figura 8. Actividad de enzimas antioxidantes. Efecto del extracto etanólico de *E. carlinae* en la actividad de las enzimas catalasa (A) y SOD (B). Los valores se representan con media $\pm$ error estándar (ANOVA de una sola vía, Tukey, $p \leq 0.05$, $n=5$).

8. Discusión

Con los resultados de diversas investigaciones, se ha demostrado que algunas plantas del género *Eryngium* L. poseen diferentes actividades biológicas. Dentro de ellas, se encuentra la actividad antioxidante e hipolipemiante (Wang et al., 2012; Sepanlou et al., 2019). Además, este tipo de actividad se ha relacionado con el contenido de metabolito secundario (MS) presentes en la planta, principalmente de polifenoles (ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, lignanos y estilbenos) y carotenoides (xantofilas y carotenos), en el caso de la actividad antioxidante. De forma que el presente estudio, se diseñó para conocer la actividad antioxidante e hipolipemiante del extracto etanólico de *E. carlinae* en hígado de ratas con EHGNA.

La actividad antioxidante se debe a sus grupos funcionales, principalmente de los grupos hidroxilo, los cuales llevan a cabo el secuestro de radicales libres o la quelación de iones metálicos. Para comprobar esto, se determinó la actividad antioxidante del extracto etanólico de *E. carlinae in vitro*. Existen numerosos ensayos para la determinación del mecanismo por el cual los MS contenidos en un extracto, ejercen su actividad antioxidante, dentro de los cuales se encuentra el ensayo *in vitro* ABTS•, el cual se determinó para evaluar la capacidad del extracto para donar un átomo de H⁺, ya que previenen o retrasan la producción de radicales libres o terminan con procesos oxidativos (Xu et al., 2017). Con base en los resultados obtenidos, el potencial del extracto para estabilizar los agentes oxidantes, al donar un electrón o bien el poder reductor que posee el extracto, fue aumentando de manera dosis-dependiente de la concentración, comenzando con 5 mg/mL estabilizando alrededor de 60 % (Figura 3), concentración similar a la cual se reportó la mayor actividad antioxidante *in vitro* de un extracto hexánico de inflorescencia de *E. carlinae* (García-Cerrillo et al., 2018).

Durante la EHGNA, un síntoma característico de la enfermedad es la hepatomegalia, que al existir inflamación y fibrosis aumenta su tamaño. Resultados provenientes de esta investigación, mostraron que los grupos enfermos tratados con el extracto presentaron un aumento del peso del hígado en relación al peso corporal (Figura 3); estos resultados son consistentes con los obtenidos por Murillo-Villicaña

et al., 2022, sugiriendo que un aumento en el tamaño del hígado puede ser atribuible a que el extracto administrado actúa a nivel hepático sobre el almacenamiento de lípidos.

Durante la EHGNA, además de la hepatomegalia, la hiperglucemia es un parámetro importante, ya que al no poderse metabolizar los carbohidratos se busca otra fuente de energía, como los lípidos del tejido adiposo o las proteínas del músculo esquelético principalmente (Lal, 2016). Resultados provenientes de esta investigación, demostraron que el extracto posee actividad hipoglucémica (figura 5C) lo que concuerda con lo reportado para extractos polares de la parte aérea de *E. carlinae* (Noriega-Cisneros et al., 2012; 2019). Esto podría deberse a que el extracto posee el monoterpene α -pineno reportado por poseer actividad hipoglucémica en ratones diabéticos inducidos con aloxano (Özbek y Yilmaz, 2017).

Por otro lado, la deficiencia o resistencia a la insulina promueve un estado de dislipidemia, en la cual, debido a la activación de lipasas (lipoproteína lipasa, lipasa sensible a hormonas y triacilglicerol lipasa), se promueve un aumento en la acumulación de TAG en suero y en hígado, debido a la acumulación de ácidos grasos provenientes del aumento de la lipólisis del tejido adiposo (Alexopoulos et al., 2019). En el presente estudio, las ratas del grupo EHGNA mostraron un incremento en los niveles de TAG séricos (Figura 3B) y hepáticos (Figura 4), debido a la EHGNA, mientras que la administración del extracto al grupo EHGNA + *E. carlinae*, mostró una disminución significativa, al mostrar un efecto hipolipidémico en suero y en hígado. El contenido de TAG séricos en los grupos enfermos tratados con el extracto está en concordancia con lo obtenido por Noriega-Cisneros et al., (2012), quienes demostraron que al administrar un extracto etanólico de *E. carlinae* existe una disminución significativa en el contenido de TAG séricos en comparación con el control diabético. Mientras que el contenido de TAG hepáticos muestra una disminución similar a lo obtenido por Murillo-Villicaña (2020), a través de la administración de un extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera*. Este efecto hipolipidémico podría estar relacionado al contenido de fitoesteroles como el β -sitosterol y el estigmasterol, los cuales se han reportado actuar modulando la

lipogénesis *de novo* y la absorción de lípidos (Feng et al., 2018; 2020). Se ha demostrado que el estrés oxidante derivado de la acumulación de lípidos conduce a una desregulación en la señalización y metabolismo del hígado, lo que predispone el desarrollo de una enfermedad hepática (Højland Ipsen et al., 2018; Jiang et al., 2020). Con base en lo anterior, se determinó la actividad del extracto etanólico de *E. carlinae* sobre los efectos que desencadena la acumulación de lípidos.

Existe evidencia clínica y experimental en la cual, hacen uso de diferentes métodos para el diagnóstico de la EHGNA. La medición de los marcadores de daño hepático como la ALT, la AST y la FA, pueden ser tomados en cuenta para un primer diagnóstico de la enfermedad (Aguilera-Méndez, 2018). Las transaminasas son consideradas indicadores de necrosis hepática ya que, al ser enzimas intracelulares en condiciones fisiológicas, no se encuentran en la circulación, por lo que, al encontrarse elevadas, en especial la ALT, es evidencia de daño en la membrana del hepatocito. En cambio, la medición de la FA durante la esteatohepatitis, puede ser considerada como marcador de fibrosis (Fernández Daza et al., 2008; Kocabay et al., 2011; McGill, 2016; Hadizadeh et al., 2017). En este estudio, estos marcadores se encontraron elevados en los grupos EHGNA y EHGNA3 + *E. carlinae*, en comparación con los controles (Figuras 3A, 3B y 3C); resultados que concuerdan con lo observado por Yazdi y cols. (2019) y Murillo-Villicaña y cols. (2020). Este incremento de las enzimas, se correlaciona con los eventos de necrosis y fibrosis que ocurren durante la progresión del EHGNA (Wang et al., 2021). Mientras que la disminución de estos marcadores, al administrarse el extracto, podría estar relacionado con el contenido de flavanonas como la naringina, la cual mostró un efecto hepatoprotector al disminuir los niveles de la ATL y la AST a valores estadísticamente similares a los del control; esto al mitigar los cambios morfológicos y bioquímicos causados por la patología (Rodríguez et al., 2018; Shi et al., 2020). Por lo tanto, el extracto podría estar brindando protección al hígado; sin embargo, es necesario realizar un análisis histopatológico, ya que para determinar la presencia, severidad y el estadio del HGNA se necesita de una técnica más precisa y confiable como la biopsia de hígado (Arab et al., 2018).

El consumo de oxígeno se vio gravemente afectado en el grupo EHGNA en las mitocondrias de hígado, como se refleja en una disminución de la respiración en los estados 3 (Figura 5A) y RCR (Figura 5C). Por el contrario, el estado respiratorio 3 y el RCR fueron similares entre los grupos administrados con el extracto y el grupo control en las mitocondrias del hígado (Figura 5A y Figura 5C), lo que sugiere una mejora en la función mitocondrial en las ratas enfermas administradas con el extracto. Esto podría ser el resultado de una mayor transferencia de electrones en la cadena de transporte de electrones, concordando así con lo reportado por García-Berumen et al. (2022) en un modelo de ratas alimentadas con dieta alta en grasas y carbohidratos.

Con respecto al potencial de membrana ($\Delta\Psi$) (Figura 5D), la energización de las mitocondrias en los grupos controles con glutamato/malato provocó una disminución instantánea y significativa en la fluorescencia de safranina O (líneas rojas y negras), que refleja el establecimiento de $\Delta\Psi$ en las mitocondrias del hígado. Se observó una disminución de $\Delta\Psi$ en el grupo EHGNA como se reflejó por una menor caída en la fluorescencia en respuesta al sustrato (línea gris). $\Delta\Psi$ mejoró en los grupos enfermos administrados con el extracto (línea verde y rosa), reflejada como una caída más significativa en la fluorescencia de safranina-O que en el grupo EHGNA. En conjunto, estos resultados sugieren que el extracto previene un deterioro de la función mitocondrial en ratas con EHGNA. Esto concuerda con lo reportado por García-Berumen et al. (2022) en un modelo de ratas alimentadas con dieta alta en grasas y carbohidratos.

De acuerdo con la teoría del doble impacto, la acumulación de lípidos conduce a un aumento en la producción de ERO por parte de la mitocondria, en un intento por disminuir la carga de lípidos mediante la β -oxidación (Martín Domínguez et al., 2013; Højland et al., 2018). De acuerdo con lo anterior, en el grupo de ratas EHGNA, se observó un incremento en la producción de las ERO, en comparación con el grupo control (Figura 7B). Este efecto disminuyó con la administración del extracto en el grupo EHGNA + *E.carlinae*, lo cual sugiere que los MS poseen la capacidad de secuestrar y neutralizar ERO generadas en las mitocondrias a través

de la donación de un átomo de H^+ o un electrón, como se ha reportado para los flavonoides como la naringenina (Carocho y Ferreira, 2013; Rashmi et al., 2017). Esta tendencia de disminuir alrededor del 50 % de la producción de ERO al administrarse un extracto etanólico de *E. carlinae* es similar a lo reportado por Peña-Montes y cols. (2019). Al mantenerse la sobrecarga de lípidos, la oxidación es mediada a través de los citocromos y peroxisomas, exacerbándose la producción de ERO, lo cual causa un desbalance entre el sistema antioxidante y las ERO (Højland et al., 2018), por otra parte, el grupo control + *E. carlinae* mostró un aumento en la generación de ERO lo cual podría deberse a los flavonoides que contiene el extracto. Algunos de los mecanismos a través de los cuales ejercen sus acciones prooxidantes incluyen la reducción temporal de la generación de ERO, así como la afectación de las funciones de los componentes del sistema de defensa antioxidante nuclear: glutatión y glutatión-S transferasa (Baldim et al., 2017).

En este estudio, el grupo mostró una disminución en la actividad de la enzima catalasa y SOD mitocondrial en el grupo enfermo EHGNA y EHGNA3 + *E. carlinae* (Figura 8), lo cual puede deberse a una modificación postraducciona, como la nitración, s-nitrosilación o glicación (Yamakura y Kawasaki, 2010; Banerjee y Vats, 2014; Begara-Morales et al., 2016). Lo cual concuerda con otros estudios que se han reportado, en los que, durante un estado de hiperglucemia y esteatosis, la catalasa y la SOD mostraron una disminución en su actividad (Schmatz et al., 2012; Chen et al., 2020). Sin embargo, la administración del extracto en el grupo EHGNA + *E. carlinae* aumentó significativamente la actividad enzimática, estos resultados están en relación con lo reportado por Schmatz et al. (2012) y Junejo y et al. (2020), quienes reportan que, al administrar resveratrol y un flavonoide aislado de un extracto de hojas de *T. angustifolia* respectivamente, se restaura la actividad de ambas enzimas antioxidantes a niveles estadísticamente similares al del control. De forma que es posible que los flavonoides presentes podrían estar interactuando con las enzimas, de modo que se incrementa la función antioxidante o bien como en el caso del kaempferol y la naringenina potenciando el sistema antioxidante (Nijveldt et al., 2001; Li et al., 2018; Ooi et al., 2018; Zhang et al., 2020).

Las grandes cantidades de ERO generadas dentro de la mitocondria conducen a la peroxidación lipídica de las membranas, causando la formación de subproductos como el malondialdehído (MDA), lo cual contribuye a la disfunción mitocondrial. Esta es una característica importante del EHGNA, que compromete la función del hígado a través del daño celular (Højland et al., 2018; Chen et al., 2020). Los niveles de peroxidación lipídica de las membranas mitocondriales del grupo EHGNA + *E. carlinae* mostraron una disminución de aproximadamente el doble respecto de la peroxidación lipídica en las del grupo EHGNA (Figura 7A). Lo anterior coincide con la disminución de los niveles de TBARS obtenida por Chandramohan et al. (2015) al administrarse kaempferol a una dosis de 100 mg/kg, misma tendencia reportada por Schmatz et al. (2012) al emplear resveratrol a una dosis de 20 mg/kg. Esta prevención al daño oxidativo de lípidos por parte del extracto, se correlaciona con la actividad antioxidante de los flavonoides, al ser capaces de reducir al radical hidroxilo (principal oxidante de los lípidos de membrana) directamente a través de la donación de un átomo de H^+ o bien inhibiendo su formación a través de la quelación de metales como el hierro, terminando así la propagación del daño a esta biomolécula, como el caso de la quercetina (Kumar y Pandey, 2013).

La peroxidación lipídica, al causar alteraciones en la membrana mitocondrial, conduce a un mal funcionamiento de la CTE (Paradies et al., 2014; Chen et al., 2020). Estas alteraciones incluyen la oxidación del fosfolípido de membrana cardiolipina, el cual posee un papel muy importante en la estructura y función de proteínas mitocondriales, como en el caso del complejo multiprotéico que conforma al complejo I y III (Petrosillo et al., 2007). Este evento podría estar presente en las mitocondrias de ratas con EHGNA, ya que mostraron inhibición en su actividad de alrededor de un 50 %, en comparación con el grupo control (Figura 6A y 6C); además, este resultado se correlaciona con el incremento en la peroxidación de lípidos de membrana, dentro de los cuales podría estar implicada la cardiolipina. Por otro lado, la administración del extracto al no restaurar la actividad del complejo I y III a valores estadísticamente similares a los grupos controles, sin embargo, tiende a restablecerlos. Además, esta disminución en la actividad del complejo I podría estar relacionada con el aumento en la actividad del complejo II, de forma que

compensa la baja transferencia de electrones por parte del complejo I y III del grupo EHGNA (Figura 6B), al haber exceso de equivalentes reductores provenientes de la oxidación de los ácidos grasos, ya que éstos se encuentran incrementados en forma de TAG en las ratas con EHGNA (Figura 4). Estos resultados de la actividad de los tres complejos concuerdan con los obtenidos en un modelo de diabetes inducido con STZ, realizado por Ortiz-Avila et al. (2015), en el cual, también en los grupos diabéticos, se encontró una disminución en la actividad del complejo I y III, y un aumento del complejo II. Sin embargo, en este estudio, la actividad del complejo II de ratas administradas con *E. carlinae* restaura la actividad a valores estadísticamente similares a los del grupo control; hecho que se correlaciona con la disminución en la acumulación de TAG hepáticos (Figura 4). En cuanto a la actividad del complejo IV, no se encuentra alterada en el grupo EHGNA, lo cual coincide con lo reportado por Trejo Hurtado et al., (2023) en un modelo de diabetes y por Chen et al., (2020) en un modelo de esteatosis, en el que la actividad de este complejo no mostró cambios significativos.

9. Conclusión

El extracto etanólico de *E. carlinae* previene el desarrollo de EHGNA al disminuir el estrés oxidativo provocado por el aumento de los lípidos intrahepáticos, generados por el consumo de una dieta alta en grasas y carbohidratos.

10. Referencias

Andrade-Cetto, A., y Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J of Ethnopharmacology*, 99(3), 325–348.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.019>

Arab, J. P., Castro, L., Gómez, P. C., Vignolo, P., Arrese, M., Barrera, F., Castro, F., Díaz, L. A., Donoso, A., Elgueta, K., González, K., González, M. I., Moreno, M., Lazarte, R., Poniachik, J., Salman, P., & Valderas, J. P. (2021). Resumen ejecutivo: Enfermedad por hígado graso no alcohólico en sujetos con diabetes mellitus tipo 2: Postura conjunta de la Asociación Chilena de Hepatología (ACHHEP) y la Sociedad Chilena de Diabetología (SOCHIDIAB) [Non-alcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes: a joint statement of the Chilean Hepatology and Diabetology Societies]. *Revista médica de Chile*, 149(9), 1360–1371. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872021000901360>

Arana-Argáez, V., Alonso-castro, A. J., Yáñez-Barrientos, E., Euan-canto, A., Torres-Romero, J. C., Isiordia-Espinoza, M. A., Brennan-Bourdon, L. M., Juárez-Vázquez, M. del C., y GonzálezIbarra, A. A. (2021). In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of an ethanol extract from the aerial parts of *Eryngium carlinae* F. Delaroche (Apiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 266, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113406>

Balhim, JL, de Alcântara, BGV, Domingos, ODS, Soares, MG, Caldas, IS, Novaes, RD, Oliveira, TB, Lago, JHG y Chagas-Paula, DA (2017). La correlación entre las estructuras químicas y las propiedades antioxidantes, prooxidantes y antitripanosomáticas de los flavonoides. *Medicina oxidativa y longevidad celular*, 2017, 3789856. <https://doi.org/10.1155/2017/3789856>

Bello-González, M. A. (2006). Catálogo de plantas medicinales de la comunidad indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. En CIRPAC y INIFAP (Eds.), Libro técnico (Número 4).

Bernal-Reyes, R., Castro-Narro, G., Malé-Velázquez, R., Carmona-Sánchez, R., González-Huezo, M. S., García-Juárez, I., Chávez-Tapia, N., Aguilar-Salinas, C., Aiza-Haddad, I., Ballesteros-Amozurrutia, M. A., Bosques-Padilla, F., Castillo-Barradas, M., Chávez-Barrera, J. A., Cisneros-Garza, L., Flores-Calderón, J., García-Compeán, D., Gutiérrez-Grobe, Y., Higuera de la Tijera, M. F., Kershenobich-Stalnikowitz, D., Ladrón de Guevara-Cetina, L., ... Velarde-Ruiz Velasco, J. A. (2019). The Mexican consensus on nonalcoholic fatty liver disease. Consenso mexicano de la enfermedad por hígado graso no alcohólico. *Revista de gastroenterología de Mexico (English)*, 84(1), 69–99. <https://doi.org/10.1016/j.rgmex.2018.11.007>

Carocho, M., y Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51(1), 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>

Castro-Torres, I. G., De La O-Arciniega, M., Naranjo-Rodríguez, E. B., Castro-Torres, V. A., Domínguez-Ortíz, M. Á., y Martínez-Vázquez, M. (2017). The Hypocholesterolemic Effects of *Eryngium carlinae* F. Delaroche Are Mediated by the Involvement of the Intestinal Transporters ABCG5 and ABCG8. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/3176232>

Cortés-rojo, C., Calderón-cortés, E., Clemente-Guerrero, M., Estrada-villagómez, M., Manzo-avalos, S., Mejía-Zepeda, R., Bolgogh, I., y Saavedra-Molina, A. (2009). Elucidation of the effects of lipoperoxidation on the mitochondrial electron transport chain using yeast mitochondria with manipulated fatty acid content. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 41(1), 15–28. <https://doi.org/10.1007/s10863-009-9200-3>.Elucidation

Đuračková, Z. (2008). Oxidants, antioxidants and oxidative stress. *Mitochondrial Medicine*, 19–54. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6714-3_2

Erdem, S. A., Nabavi, S. F., Orhan, I. E., Daglia, M., Izadi, M., y Nabavi, S. M. (2015). Blessings in disguise: A review of phytochemical composition and antimicrobial activity of plants belonging to the genus *Eryngium*. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s40199-015-0136-3>

Forrester, S. J., Kikuchi, D. S., Hernandez, M. S., Xu, Q., y Griendling, K. K. (2018). Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circulation Research*, 122(6), 877–902.

García-Cerrillo, D., Noriega-Cisneros, R., Peña-Montes, D., Huerta-Cervantes, M., Rí-os-Silva, M., Salgado-Garciglia, R., Montoya-Pérez, R., y Saavedra-Molina, A. (2018). Antioxidant Effects of *Eryngium carlinae* in Diabetic Rats. *Asian Journal of Applied Sciences*, 6(5), 308–314. <https://doi.org/10.24203/ajas.v6i5.5482>

García-Ruiz, I. (2015). Contribución al conocimiento del género *Eryngium* (Apiaceae) en el estado de Michoacán, México. *Acta Botánica Mexicana*, 118(103), 65. <https://doi.org/10.21829/abm103.2013.51>

Guo, X., Yin, X., Liu, Z., & Wang, J. (2022). Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Pathogenesis and Natural Products for Prevention and Treatment. *International journal of molecular sciences*, 23(24), 15489.

Huerta-Cervantes, M., Peña-Montes, D. J., Montoya-Pérez, R., Trujillo, X., Huerta, M., López-Vázquez, M. Á., Olvera-Cortés, M. E., & Saavedra-Molina, A. (2020). Gestational Diabetes Triggers Oxidative Stress in Hippocampus and Cerebral Cortex and Cognitive Behavior Modifications in Rat Offspring: Age- and Sex-Dependent Effects. *Nutrients*, 12(2), 376.

Jain, C., Khatana, S., y Vijayvergia, R. (2019). Bioactivity of secondary metabolites of various plants: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(2), 494–504.

Jebur, A., Mokhamer, M., y El-Demerdash, F. (2016). A Review on Oxidative Stress and Role of Antioxidants in Diabetes Mellitus. *Austin Endocrinology and Diabetes Case Reports*, 1(1),1006.

Knauth, P., Acevedo-Hernández, G. J., Cano, M. E., Gutiérrez-Lomelí, M., y López, Z. (2018). In Vitro Bioactivity of Methanolic Extracts from *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Schiede ex Standl., *Chenopodium ambrosioides* L., *Cirsium mexicanum* DC., *Eryngium carlinae* F. Delaroché, and *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. Used in Traditional Medi. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/3610364>

Kosmalski, M., Frankowski, R., Ziółkowska, S., Różycka-Kosmalska, M., & Pietras, T. (2023). What's New in the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Journal of clinical medicine*, 12(5), 1852. <https://doi.org/10.3390/jcm12051852>

Khlebnikov, A. I., Schepetkin, I. A., Domina, N. G., Kirpotina, L. N., y Quinn, M. T. (2007). Improved Quantitative Structure-Activity Relationship Models to Predict Antioxidant Activity of Flavonoids in Chemical, Enzymatic, and Cellular Systems. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15(4), 1749–1770.

Lammert, E., y Zeeb, M. (2014). Metabolism of Human Diseases Organ physiology and pathophysiology. En E. Lammert y M. Zeeb (Eds.), *Metabolism of Human Diseases*. Springer.

Lehninger D., Michael N., Cox M. *Principles of Biochemistry*. Fourth Edition. 2002. Pg. 659-670.

Montes Teves, P. (2016). Enfermedad por hígado graso no alcohólico: una epidemia en ascenso [Non alcoholic fatty liver: a growing epidemic]. *Revista de gastroenterología del Perú: órgano oficial de la Sociedad de Gastroenterología del Perú*, 36(3), 195–196.

Noriega-Cisneros, R., Ortiz-Vila, O., Esquivel-Gutiérrez, E., Clemente-Guerrero, M., Manzo-Avalos, S., Salgado-Garciglia, R., Cortés-Rojó, C., Boldogh, I., y Saavedra-Molina, A. (2012a). Hypolipidemic activity of *eryngium carlinae* on streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochemistry Research International*, 2012, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2012/603501>

Noriega-Cisneros, R., Peña-Montes, D. J., Huerta-Cervantes, M., Torres-Martínez, R., Huerta, M., Manzo-Avalos, S., Salgado-Garciglia, R., y Saavedra-Molina, A. (2019). *Eryngium carlinae* Ethanol Extract Corrects Lipid Abnormalities in Wistar Rats with Experimental Diabetes. *Journal of Medicinal Food*, 00(0), 1–7. <https://doi.org/10.1089/jmf.2019.0189>

Ortiz-Avila, O., Gallegos-Corona, M. A., Sánchez-Briones, L. A., Calderón-Cortés, E., Montoya-Pérez, R., Rodríguez-Orozco, A. R., Campos-García, J., Saavedra-Molina, A., Mejía-Zepeda, R., y Cortés-Rojó, C. (2015). Protective effects of dietary avocado oil on impaired electron transport chain function and exacerbated oxidative stress in liver mitochondria from diabetic rats. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 47(4), 337–353. <https://doi.org/10.1007/s10863-015-9614-z>

Peña-Montes, D. J., Huerta-Cervantes, M., Ríos-Silva, M., Trujillo, X., Huerta, M., Noriega-Cisneros, R., Salgado-Garciglia, R., y Saavedra-Molina, A. (2019). Protective effect of the hexanic extract of *eryngium carlinae* inflorescences in vitro, in yeast, and in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Antioxidants*, 8(3), 1–12. <https://doi.org/10.3390/antiox8030073>

Peñarrieta, J. M., Alvarado, J. A., Åkesson, B. Bergenståhl, B. 2008, Total antioxidant capacity and content of flavonoids and other phenolic compounds in canihua (*Chenopodium pallidicaule*): An Andean pseudocereal, *Molecular Nutrition and Food Research*, 52, 708-717.

Pérez-Ramírez, I. F., Enciso-Moreno, J. A., Guevara-González, R. G., Gallegos-Corona, M. A., LoarcaPiña, G., y Reynoso-Camacho, R. (2016). Modulation of renal dysfunction by *Smilax cordifolia* and *Eryngium carlinae*, and their effect on kidney

proteome in obese rats. *Journal of Functional Foods*, 20, 545–555.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.024>

Rains, J. L., y Jain, S. K. (2011). Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(5), 567–575.

Saavedra-Molina, A., y Devlin, T. M. (1997). Effect of extra- and intra-mitochondrial calcium on citrulline synthesis. *Aminoacids*, 12, 293–298.

Saavedra-Molina, Alfredo, Salgado-Garciglia, R., Noriega-Cisneros, R., Esquivel-Gutiérrez, E. R., Manzo-Avalos, S., Cortés-Rojó, C., y Montoya-Pérez, R. (2014). Oxidative stress in diabetes and hypertension treated with alternative therapy of medicinal plants. En *Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation and Protein Oxidation* (pp. 205–218).

Sepanlou, M. G., Ardakani, M. M., Hajimahmoodi, M., Sadrai, S., Amins, G.-R., Sadeghi, N., y Lamardi, S. N. S. (2019). Ethnobotanical and traditional uses, phytochemical constituents and biological activities of *Eryngium* species growing in Iran. *Traditional Medicine Research*, 4(3, SI), 148–159.
<https://doi.org/10.12032/TMR20190412114>

Sies, H., y Jones, D. (2007). Oxidative stress. En *Encyclopedia of stress* (2a ed., Vol. 3, pp. 45–48). Elsevier. <https://doi.org/10.1201/b12948>

Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current biology : CB*, 27(21), R1147–R1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>

Ullah, A., Khan, A., y Khan, I. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress — A concise review. Saudi Pharmaceutical Journal, 24(5), 547–553. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013>

Van De Wier, B., Koek, G. H., Bast, A., y Haenen, G. R. M. M. (2017). The potential of flavonoids in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 57(4), 834–855.

Wang, X., Zhou, W., Song, Q., & Xie, Y. (2023). Association of the triglyceride-glucose index with the occurrence of non-alcoholic fatty liver disease and mortality in elderly inpatients: a prospective observational study. Asociación entre el índice glucemia-triglicéridos con la presencia de la enfermedad del hígado graso no alcohólico y la mortalidad en pacientes hospitalizados de avanzada edad: estudio observacional prospectivo. Nutrición hospitalaria, 40(2), 319–324. <https://doi.org/10.20960/nh.04435>

Wang, P., Su, Z., Yuan, W., Deng, G., y Li, S. (2012). Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of Eryngium L. (Apiaceae). Pharmaceutical Crops, 3(1), 99–120. <https://doi.org/10.2174/2210290601203010099>

Dulce Yareli Guerra Quezada

Efecto del extracto etanólico de *Eryngium carlinae* en la enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) inducida ...

 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::3117:517719147

Fecha de entrega

24 oct 2025, 11:49 a.m. GMT-6

Fecha de descarga

24 oct 2025, 12:00 p.m. GMT-6

Nombre del archivo

Efecto del extracto etanólico de *Eryngium carlinae* en la enfermedad de hígado graso no alcohó....docx

Tamaño del archivo

5.6 MB

54 páginas

12.672 palabras

69.750 caracteres

21% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

Exclusiones

- N.º de fuente excluida

Fuentes principales

- 21%  Fuentes de Internet
- 14%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alerta de integridad para revisión

-  **Caracteres reemplazados**
9 caracteres sospechosos en N.º de páginas
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	MAESTRIA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL	
Título del trabajo	Efecto del extracto etanolico de Eryngium carlinae en la enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) inducida por el consumo de una dieta alta en grasas y carbohidratos	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	Dulce Yareli Guerra Quezada	1608225F@umich.mx
Director	Rocío del Carmen Montoya Pérez	rocio.montoya@umich.mx
Codirector	Claudia Isabel García Berumen	cl
Coordinador del programa	Mauro Manuel Martínez Pacheco	mauro.martinez.pacheco@umich.mx

Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	no	

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	no	
Traducción a otra lengua	no	
Revisión y corrección de estilo	no	
Análisis de datos	no	
Búsqueda y organización de información	no	
Formateo de las referencias bibliográficas	no	
Generación de contenido multimedia	no	
Otro		

Datos del solicitante	
Nombre y firma	Dulce Yareli Guerra Quezada
Lugar y fecha	Morelia, Michoacán, 21 de octubre del 2025