

Efecto hepatoprotector de la mezcla de ácido ursólico/ácido oleanólico en ratones con daño hepático inducido con fármacos antituberculosos

Hepatoprotective effect of the ursolic acid-oleanolic acid mixture in mice with liver damage induced with anti-TB drugs

Alicia Georgina Siordia-Reyes ¹, **Roberto Joaquín Robles-Ramírez**²,
María Adelina Jiménez-Arellanes ³.

1. Anatomía Patológica, UMAE Hospital de Pediatría "Dr. Silvestre Frenk Freund", Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. Ciudad de México, México.
2. División Auxiliar de Diagnóstico y Tratamiento, UMAE Hospital de Pediatría "Dr. Silvestre Frenk Freund", Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. Ciudad de México, México.
3. Unidad de Investigación Médica en Farmacología, UMAE Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez", Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. Ciudad de México, México.



Recibido: 19 de febrero de 2025

Aceptado: 6 de marzo de 2025

ART-AO-91-e090102

DOI: 10.5281/zenodo.15852015

Autor(a) responsable de la correspondencia

María Adelina Jiménez-Arellanes

adelinajim08@prodigy.net.mx

Av. Cuauhtémoc 333, Col. Doctores, C.P. 06720,
Alcaldía Cuauhtémoc. Ciudad de México, México.



Este artículo se distribuye bajo una licencia *Creative Commons* Atribución-NoComercial 4.0 Internacional.

© Siordia-Reyes AG, Robles-Ramírez RJ, Jiménez-Arellanes MA. Efecto hepatoprotector de la mezcla de ácido ursólico/ácido oleanólico en ratones con daño hepático inducido con fármacos antituberculosos. Rev Cadena Cereb. 2025; 9(1): e090102.
<https://www.cadenadecerebros.com/articulo/2025-e090102>

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el efecto hepatoprotector (HPP) de la mezcla ácido ursólico-ácido oleanólico (AU/AO) administrado por vía intragástrica (i.g.) ante el daño provocado por fármacos antituberculosos (rifampicina/isoniazida/pirazinamida, -RIF/INH/PZA-).

Materiales y métodos: La mezcla de AU/AO se obtuvo a partir del extracto metanólico (MeOH) de *Rosmarinus officinalis*. El ensayo se realizó en ratones machos Balb/C con daño hepático inducido con RIF/INH/PZA y como control positivo se empleó silimarina (SIL). La mezcla AU/AO se administró por vía intragástrica (i.g.) a 10 y 20 mg/kg durante 60 días.

Resultados: La mezcla AU/AO a 10 y 20 mg/kg administrada durante 60 días favoreció la ganancia de peso y disminuyó los valores de aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (FA). Este efecto fue similar al del control positivo SIL. A nivel histológico se observó ligera disminución de esteatosis en el grupo que recibió la mezcla de AU/AO a 10 mg/kg, respecto al grupo con daño hepático y con respecto al grupo de AU/AO a 20 mg/kg. La mezcla de AU/AO a 10 mg/kg mostró buen efecto HPP.

Conclusiones: La mezcla de AU/AO administrado por vía i.g. favoreció la ganancia de peso corporal (GPC), y disminuyó los valores de enzimas hepáticas, también redujo la esteatosis ante el daño inducido por fármacos antituberculosos. La mejor dosis fue la de 10 mg/kg administrado durante 60 días.

Palabras clave: ácido oleanólico; ácido ursólico; triterpenos; hepatoprotector; antituberculosos; silimarina.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the hepatoprotective effect (HPP) of the ursolic acid-oleanolic acid (UA/OA) mixture administered intragastrically (i.g.) against damage induced by antituberculosis drugs (rifampicin/isoniazid/pyrazinamide, -RIF/INH/PZA-).

Materials and methods: The UA/OA mixture was obtained from the methanolic extract (MeOH) of *Rosmarinus officinalis*. The assay was performed in male Balb/C mice with RIF/INH/PZA-induced liver damage, and silymarin (SIL) was used as a positive control. The UA/OA mixture was administered intragastrically (i.g.) at 10 and 20 mg/kg for 60 days.

Results: The UA/OA mixture at 10 and 20 mg/kg administered for 60 days promoted weight gain and decreased aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and alkaline phosphatase (AP) levels. This effect was similar to that of the positive control SIL. Histologically, a slight decrease in steatosis was observed in the group receiving the UA/OA mixture at 10 mg/kg, compared to the group with liver damage and compared to the UA/OA group at 20 mg/kg. The UA/OA mixture at 10 mg/kg showed a positive HPP effect.

Conclusions: The UA/OA mixture administered i.g. promoted body weight gain (BWG) and decreased liver enzyme levels. It also reduced steatosis in the context of damage induced by antituberculosis drugs. The optimal dose was 10 mg/kg administered for 60 days.

Keywords: Oleanolic acid; ursolic acid; triterpenes; hepatoprotective; antitubercular; silymarin.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una de las 10 principales causas de muerte por un agente infeccioso y representa un problema de salud pública a nivel mundial. Anualmente, provoca aprox. 1.3 millones de muertes y aparecen 11 millones de casos nuevos; de estos últimos casos, entre el 10-12 % son VIH-positivos (aprox 300000 casos), siendo esta co-infección (TB/VIH) la causa principal de mortalidad. Se estima que 1.7 billones de personas en el mundo están infectadas y pueden desarrollar la enfermedad. La disminución de casos es muy lenta, en el 2020 solo se redujo el 30% en el número total de casos y con reducción del 20% en la incidencia¹⁻³.

Entre el 2018 y 2020, aproximadamente 5 millones fueron casos nuevos de TB; 600,000 con resistencia a rifampicina (RIF) y aprox. el 78% fueron casos multi-farmacoresistentes (MFR) y tan sólo 111 000 personas fueron tratados en forma adecuada. Para el 2019, hubo incremento del 10% de casos MFR respecto al 2018. Actualmente existe aumento de TB-MFR y de resistencia extendida (TB-XFR). Alrededor del 60% de casos MFR se curan y aprox. el 10% se convierten en TB-XFR¹⁻⁵.

La RIF, isoniacida (INH) y pirazinamida (PZA) son tres fármacos básicos para tratar la TB (sensible y MFR) y no pueden ser sustituidos. Estos fármacos provocan principalmente hepatotoxicidad (HPT), nefrotoxicidad; así como, neuropatía, hipersensibilidad, náu-

seas, vómito y gastritis. La incidencia de HPT depende de la población estudiada, tiempo de tratamiento, edad, desnutrición, alcoholismo, diabetes mellitus 2, artritis reumatoide, VIH/SIDA, cáncer, etc^{5,6}. La bio-transformación de fármacos antiTB se lleva a cabo en el hígado, siendo este órgano el más afectado cuando al metabolizarse estos fármacos dan origen a productos muy reactivos. Los cuales alteran la integridad y funcionalidad del hígado; generando inflamación, hepatitis medicamentosa crónica, fibrosis hepática, cirrosis no alcohólica y hasta carcinoma hepato-celular, siendo esta última una de las principales causas por lo que los medicamentos se retiran del mercado o es causa para trasplante de hígado⁷⁻¹¹. En el metabolismo de los fármacos antiTB, también influyen factores genéticos; por ejemplo, se ha descrito que existen acetiladores lentos y rápidos de INH, lo que ocasiona en mayor o menor medida el daño hepático. En acetiladores lentos la cantidad de NAT2 es baja, lo que provoca acumulación de INH y presentan mayor daño en hígado¹²⁻¹⁵. La HPT es una de las causas de abandono de tratamiento en el caso de la TB (aprox. 48% de pacientes), favoreciendo la aparición de cepas farmacoresistentes.

En la actualidad se están realizando investigaciones enfocadas a prevenir y/o reducir el efecto HPT de fármacos, mediante el uso de extractos de plantas medicinales, compuestos naturales y/o productos biológicos. Entre estos podemos mencionar a la SIL, resveratrol, quercetina, vitamina E y C, polifenoles, el ajo y otros. Es importante mencionar que la inhibición del citocromo P450, en su isoforma CYP 2E1, junto con un efecto antioxidante, es el mecanismo

benéfico y más común de los remedios herbolarios (extractos, productos biológicos y compuestos naturales) por esto son los más recomendados para proteger de la HPT inducida por los fármacos anti-TB^{9,10}. Dentro de estas sustancias con efecto HPP, está la mezcla de AU/AO, metabolitos que se encuentran en diferentes especies medicinales y alimentos. Se ha descrito que esta mezcla tiene diversas actividades biológicas: antiinflamatoria, antinociceptiva, antimicrobiana, antituberculoso, antiviral, antiparasitario, escasa toxicidad, anticancerígeno, antitumoral, antioxidante, efecto HPP (contra el daño provocado por tetracloruro de carbono, EtOH, D-galactosamina, cadmio, benceno y tioacetamida), entre otras^{9,16-20}. Cabe señalar, que existe un solo trabajo que describe el efecto HPP de esta mezcla administrado por vía subcutánea (s.c.) contra el daño hepático provocado con la mezcla de fármacos anti-TB (RIF/INH/PZA) en ratones machos Balb/C. Los animales fueron tratados con AU/AO a la dosis de 0.1 and 0.2 mg (solubilizado en 100 µL de aceite de olivo extra virgen) durante 11 semanas, administrado por vía s.c. y encontraron que esta mezcla AU/AO (0.1 µg) favoreció la GPC, disminuyó los valores de ALT y AST y no generó esteatosis, respecto al grupo con daño hepático²¹.

La justificación de la presente investigación se basa en que el tratamiento para la TB sensible o FR genera diversos efectos secundarios (hepatotoxicidad y nefrotoxicidad entre otros) y no puede emplearse otro tipo de fármacos; esto repercute en el abandono al tratamiento y a la aparición de cepas resistentes. Considerando estos antecedentes es necesario contribuir en la búsqueda de sustancias con efecto protector ante el daño hepático o renal que generan estos fármacos y dentro de estas sustancias se encuentra la mezcla de AU/AO. La cual tiene efecto antituberculoso y HPP ante el daño que genera el tetracloruro de carbono, EtOH, D-galactosamina, cadmio, benceno y tioacetamida.

En este trabajo se describe el efecto hepato- y nefroprotector de la mezcla de AU/AO ante el daño inducido con la mezcla de RIF/INH/PZA administrado por vía intragástrica (i.g.) durante 60 días.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la mezcla AU/AO

La mezcla de AU/AO se obtuvo a partir del extracto MeOH (10 gr) de *Rosmarinus officinalis* (R. officinalis), el extracto se lavó con 200 mL de acetonitrilo (CH₃CN), posteriormente con 200 mL de cloroformo (CHCl₃) y finalmente con 200 mL de MeOH; cada lavado se realizó tres veces, fueron reunidos y concentrados al vacío para eliminar el disolvente a 40°C. Al lavado MeOH se le adicionó carbón activado (5 mg/mL) y se puso en agitación por 10 minutos, este proceso se realizó por duplicado con la finalidad de eliminar clorofilas.

Cada lavado se analizó por cromatografía en capa fina empleando CHCl₃:MeOH 9:1 (como sistema de elución) para detectar la

mezcla AU/AO y se observó que los lavados de CHCl₃ (3.5 g) y MeOH (2.6 g) contenían mayor cantidad de ésta mezcla. Estas muestras fueron sometidas a un fraccionamiento químico en cromatografía en columna de fase normal (CC-FN) usando sílica gel F254 (200 g). La CC-FN se eluyó con diclorometano (CH₂Cl₂) 100 % y mezcla de CH₂Cl₂:etanol (EtOH) (8:2, 1:1, 3:7) y EtOH 100 %. A partir de las fracciones eluidas con la mezcla de CH₂Cl₂:EtOH se obtuvo un polvo color crema (3.54 g), el cual se lavó tres veces con CH₃CN. Mediante este proceso se obtuvieron 3.10 g de un polvo blanco con punto de fusión 265-269 °C, soluble en MeOH y EtOH. Este polvo fue sometido a un análisis de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN-1H) y el análisis de los datos permitieron identificar la mezcla de AU/AO, los cuales fueron comparados con lo descrito en la literatura²².

Ensayos *in vivo*

El presente estudio es de tipo experimental y para ello se emplearon ratones machos Balb/C (24 ± 2 g) provenientes del bioterio IMSS, los cuales fueron mantenidos bajo condiciones estándar de laboratorio de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) modificada en 2016. Los animales fueron tratados de acuerdo con la Guía de Cuidados y Uso de animales de Laboratorio de la Academia Nacional de Ciencia. El protocolo fue aprobado por la Comisión Local de Investigación Científica y de Bioética 3601 del IMSS (CLIC R-2015-3601-47, se anexa comprobante). El alimento y agua fue proporcionado *ad libitum*.

Actividad hepatoprotectora

El ensayo se realizó siguiendo la metodología descrita previamente^{7,8,21}, con algunas modificaciones. El daño hepático se indujo con la mezcla de RIF/INH/PZA (10:10:30 mg/kg, c/u) solubilizado en carboximetilcelulosa (CMC) al 0.5 % en solución salina isotónica (SSI) y fue administrado por vía i.g., en un volumen <10 mL/kg. La mezcla AU/AO (10 y 20 mg/kg) y SIL (2.5 mg/kg, control positivo de hepatoprotección) fueron solubilizados en el vehículo Tween 80:CMC (0.5:9.5) y fueron administrados por vía i.g. Los grupos recibieron el siguiente tratamiento diario durante 60 días: Grupo I: CMC, 0.5%; Grupo II: antiTB (INH/RIF/PZA, 10:10:30 mg/kg); Grupo III: antiTB más SIL, 2.5 mg/kg; Grupo IV: antiTB + AU/AO, 10 mg/kg; Grupo V: antiTB + AU/AO, 20 mg/kg.

Durante el periodo de experimentación (60 días) se registró el peso corporal cada tercer día. Al finalizar el periodo, se tomó sangre sin anticoagulante (por punción retro orbitaria) con ayuno previo de 12 hrs. Después, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se extrajo el hígado, riñón y bazo para registrar su peso y para realizar análisis histológico.

En el suero se determinó los niveles de ALT, AST, FA, colesterol (COL), triglicéridos (TRIG) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Los análisis se realizaron en el equipo Selectra II Analyser (Modelo Vitalab 2) automatizado, empleando el kit comercial Brand (Randox LAB).

Análisis histológico

Este ensayo se realizó de acuerdo a lo previamente descrito por Pérez-González, et al.⁷ y por Gutiérrez-Rebolledo, et al.²¹.

Cuantificación de parámetros de estrés oxidativo: La actividad de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión oxidado (GPx) se determinó en el sobrenadante por método colorimétrico. Los niveles de proteínas oxidadas (POx) y lípidos oxidados (Lpx) fueron determinados en el homogenado sin centrifugar. Los ensayos se determinaron de acuerdo a lo previamente descrito por Pérez-González et al.^{7,8}.

Análisis estadístico

Se empleó el programa SigmaPlot ver. 12.5 para el análisis de resultados y gráficas. Los datos se presentan como la media de error estándar (SEM). La GPC se analizó por ANOVA y con la prueba post hoc de Student-Newman-Keuls (SNK) test. Los resultados con valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Los parámetros bioquímicos y de estrés oxidativo se analizaron con ANOVA de una vía y con post hoc SNK test.

RESULTADOS

Obtención e identificación de la mezcla de AU/AO

A partir de 10 g del extracto MeOH de *R. officinalis* se obtuvieron 3.10 gr de un polvo blanco con punto de fusión de 265-269°C, después de un fraccionamiento químico en CC-FN de los lavados con CHCl₃ y MeOH. Este polvo blanco se identificó como la mezcla de AU/AO de acuerdo a sus datos de RMN-1H y comparado con lo descrito previamente²² y por comparación del Rf con un estándar comercial marca Sigma.

Efecto hepatoprotector *in vivo* de la mezcla AU/AO a 60 días

En la **Figura 1** se muestra la GPC que genera la mezcla de AU/AO al ser administrado por vía i.g. diariamente durante 60 días. El grupo I (vehículo) mostró escaso incremento de peso corporal, esta ganancia de peso fue constante durante el periodo de tratamiento, al día 60 el incremento fue de 0.85 g. El grupo II (fármacos antiTB) mostró un incremento mayor al del grupo I (vehículo), con aumento de 1.1 g vs 0.85 g al día 60. Los grupos IV y V (antiTB más AU/AO a 10 y 20 mg/kg, respectivamente) mostraron ligera GPC durante el periodo de tratamiento; sin embargo, al día 60 mostraron mayor incremento de peso respecto al grupo I (vehículo) y respecto al grupo II (antiTB), siendo este incremento de 1.82 g para el grupo IV (AU/AO a 10 mg/kg) y de 1.64 g para el grupo V (AU/AO a 20 mg/kg). El incremento de peso en el grupo III (antiTB/SIL) fue similar al grupo V (antiTB + AU/AO a 20 mg/kg) siendo de 1.64 g.

En la **Tabla 1** se describe el peso relativo de órganos; sólo el peso del hígado del grupo II (antiTB) mostró un ligero aumento (1.37

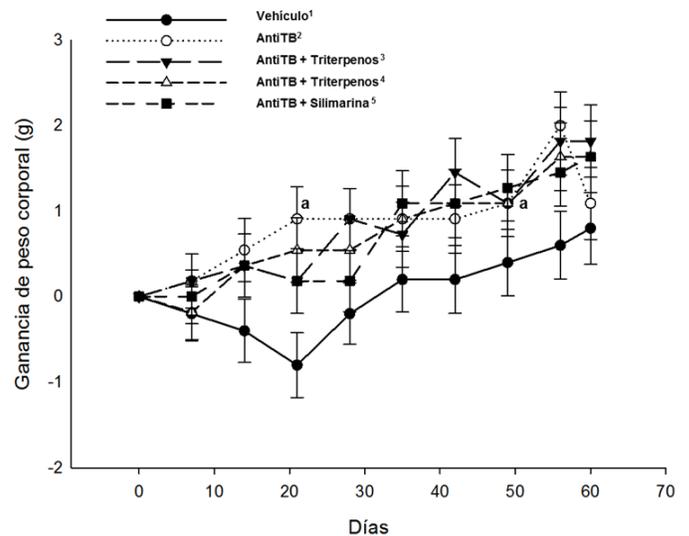


Figura 1. Ganancia de peso corporal (GPC) de ratones machos Balb/C con daño hepático provocado por RIF/INH/PZA y tratados con la mezcla de AU/AO durante 60 días.

Datos presentados como la media (±) con su error estándar (e.e.). Análisis estadístico (ANOVA) Bifactorial de Medidas Repetidas (MR), prueba post hoc Tukey ($p < 0.05$); avs Grupo I (Vehículo); bvs Grupo II (antiTB); cvs Grupo III (antiTB/SIL, 2.5 mg/kg); dvs Grupo IV (antiTB + AU/AO, 10 mg/kg); Grupo V (antiTB + AU/AO, 20 mg/kg). n= 10.

g) respecto al peso de los demás grupos (<1.33 g). El peso del bazo y riñón fueron similar en todos los grupos.

Los resultados de química sanguínea se muestran en la **Tabla 2**. Los valores de creatinina del grupo II (antiTB) fue elevado (0.84 mg/dL) respecto al grupo I (control, 0.53 mg/dL) y los valores de los grupos III (SIL), IV y V (AU/AO a 10 y 20 mg/kg) fueron similares al del grupo I (0.49, 0.50 y 0.57 mg/dL vs 0.53 mg/dL). También los valores de urea fueron altos en el grupo II (antiTB, 91.1 mg/dL) y ligeramente menores en los grupos IV y V que recibieron AU/AO a 10 y 20 mg/kg cuyos valores fueron de 83.26 y 83.28 mg/dL, sin llegar al valor del grupo control (75.27 mg/dL), sólo el grupo III (antiTB/SIL, 71.7 mg/dL) mostró un valor ligeramente bajo al del grupo control. Los niveles de AST del grupo II (antiTB) fueron elevados en 102% comparado al control sano (251 UI vs 123 UI) con diferencia estadística significativa de $p = 0.004$ y al grupo III –antiTB/SIL– (125.67 UI); y los grupos IV y V (175.0 y 141.25 UI, respectivamente) mostraron un ligero aumento respecto al grupo I (vehículo, 123 UI), pero estos valores fueron menores al grupo II (251 UI). Por otro lado, los valores de ALT mostraron comportamiento similar, estos fueron elevados en el grupo II (antiTB, 372 UI) y disminuyeron en los grupos III (SIL, 248 UI), IV y V (248 y 235 UI, respectivamente), siendo estos valores más bajos que el vehículo (256.75 UI). Respecto a los valores de FA y HDL se observó el siguiente comportamiento antiTB > SIL > AU/AO 20 mg/kg > AU/AO 10 mg/kg > vehículo. Los valores para colesterol mostraron el siguiente comportamiento (antiTB > AU/AO 10 mg/kg > AU/AO 20 mg/kg > SIL > vehículo) y sobre los valores de triacilglicéridos no hubo cambios significativos.

Los resultados sobre el análisis histológico del hígado se describen en la **Tabla 3** y **Figura 2**. De acuerdo a las observaciones, 3/3 animales del grupo I (vehículo) mostraron ligera esteatosis. El

Tabla 1. Peso de órganos de ratones machos Balb/C con daño hepático y tratados con la mezcla de AU/AO durante 60 días.

Órgano	Tratamientos				
	Grupo I Vehículo	Grupo II AntiTB	Grupo III AntiTB + SIL	Grupo IV AntiTB + AU/AO	Grupo V AntiTB + AU/AO
Hígado (g)	1.29±0.02	1.39±0.14	1.32±0.06	1.31±0.03	1.33±0.14
Bazo (g)	0.11±0.02	0.16±0.19	0.10±0.01	0.10±0.01	0.15±0.07
Riñones (g)	0.39±0.01	0.38±0.03	0.43±0.05	0.40±0.04	0.43±0.10

Datos presentados como la media (±) con su error estándar (e.e.). Grupo I: CMC, 0.5%; Grupo II: antiTB (INH/RIF/PZA, 10:10:30 mg/kg); Grupo III: antiTB/SIL, 2.5 mg/kg; Grupo IV: antiTB + AU/AO, 10 mg/kg; Grupo V: antiTB + AU/AO, 20 mg/kg; n= 5.

Tabla 2. Valores de química sanguínea de ratones machos Balb/C con daño hepático provocado por RIF/INH/PZA y tratados con la mezcla de AU/AO durante 60 días.

Parámetro	Tratamientos				
	Grupo I Vehículo	Grupo II AntiTB	Grupo III AntiTB + SIL	Grupo IV AntiTB + AU/AO	Grupo V AntiTB + AU/AO
Creatinina (mg/dL)	0.53±0.02	0.84±0.01 ^{a,c}	0.49±0.02	0.50±0.02	0.57±0.04 ^{a,c,e}
Urea (mg/dL)	75.27±0.88	91.1±1.11 ^{a,c,d,e***}	71.77±0.28	83.26±1.39 ^{a,e***}	83.28±2.07 ^{a,e*}
AST (UI)	123.75±13.82	251.0±29.48	125.67±9.65	175.0±18.61	141.25±16.74
ALT (UI)	256.75±10.78	372.0±16.90	248.0±52.32	248.0±14.12	235.00±22.68
ALP (UI)	131.5±13.70	292.0±22.02	192.0±5.66	174.0±35.25	183.5±8.46
Colesterol (mg/dL)	38.33±0.41	49.4±0.84	40.67±1.77	44.25±1.19	43.5±2.60
Trig (mg/dL)	1.26±0.14	1.24±0.22	1.24±0.04	1.23±0.15	1.22±0.12
HDL (mg/dL)	19.13±0.67	26.68±1.99	21.07±1.96	17.37±2.53	19.87±0.88

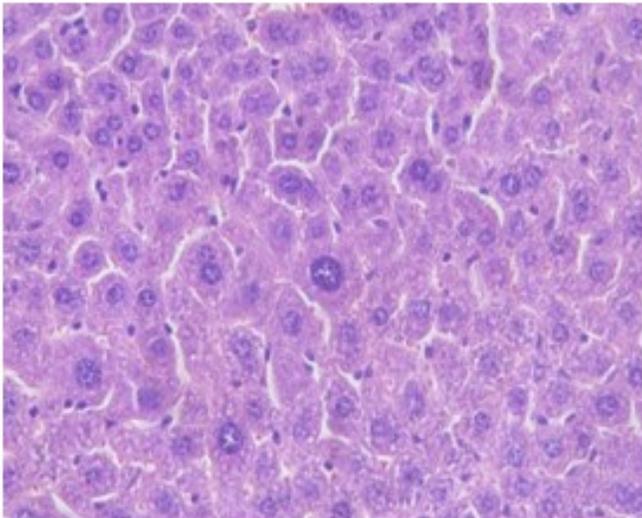
Datos presentados como la media (±) con su error estándar (e.e.). Grupo I: Vehículo (CMC, 0.5%); Grupo II: antiTB (INH/RIF/PZA, 10:10:30 mg/kg); Grupo III: antiTB/SIL, 2.5 mg/kg; Grupo IV: antiTB + AU/AO, 10 mg/kg; Grupo V: antiTB + AU/AO, 20 mg/kg. n=3. ^avs Grupo I; ^bvs Grupo II; ^cvs Grupo IV; ^dvs Grupo V; ^evs Grupo III. *** $p < 0.001$. Prueba post hoc Holm-Sidak n=5.

Tabla 3. Análisis histológico de hígado de ratones machos Balb/C con daño hepático provocado por RIF/INH/PZA y tratados con la mezcla de AU/AO durante 60 días.

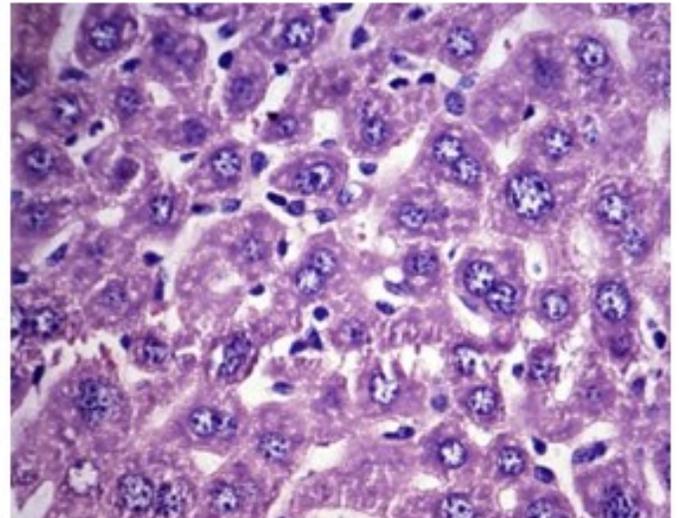
Grupo	Hematopoyesis hepática	Microabscesos hepáticos	Infiltrado linfoide	Esteatosis	Degeneración hidrópica centrolobulillar
I Vehículo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
II AntiTB	+	Negativo	Negativo	++	Negativo/Esplenomegalia
	+	Negativo	Perivenoso/++	++	Negativo/Esplenomegalia
	Negativo	Negativo	Perivenoso/++	++	Negativo
III AntiTB/ SIL (2.5 mg/kg)	Negativo	Negativo	+	Negativo	Negativo
	Negativo	Negativo	Negativo	++	Negativo
	Negativo	Negativo	Negativo	++	Negativo
IV AntiTB + AU/AO (10 mg/kg)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Negativo	Negativo	Negativo	+	Negativo
	Negativo	Negativo	Negativo	+	Esplenomegalia
V AntiTB + AU/AO (20 mg/kg)	Negativo	Negativo	Negativo	++	Negativo
	Negativo	Negativo	Negativo	++	Negativo
	+	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo/Esplenomegalia

Grupo I: Vehículo (CMC, 0.5%); Grupo II: antiTB (INH/RIF/PZA, 10:10:30 mg/kg); Grupo III: antiTB/SI (2.5 mg/kg); Grupo IV: antiTB + AU/AO (10 mg/kg); Grupo V: antiTB + AU/AO (20 mg/kg). + leve; ++ moderado; +++ intenso. n=3. Tinción con H&E.

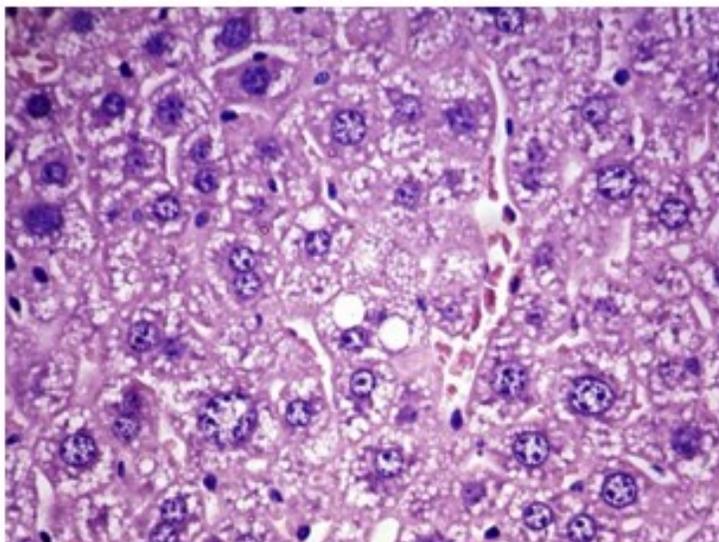
Grupo I: Vehículo



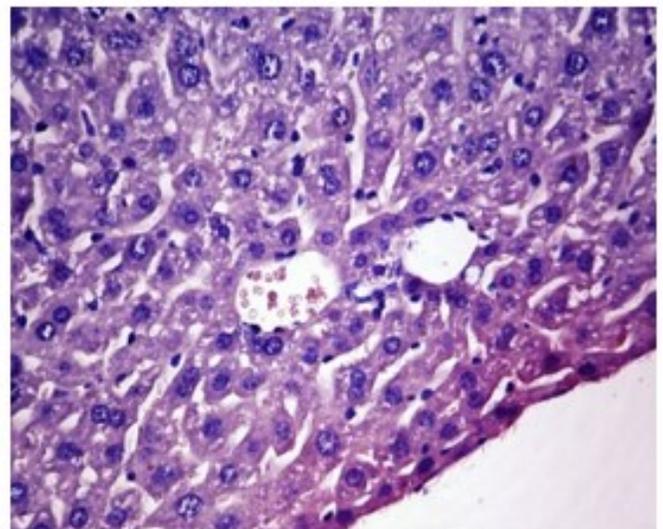
Grupo II: AntiTB



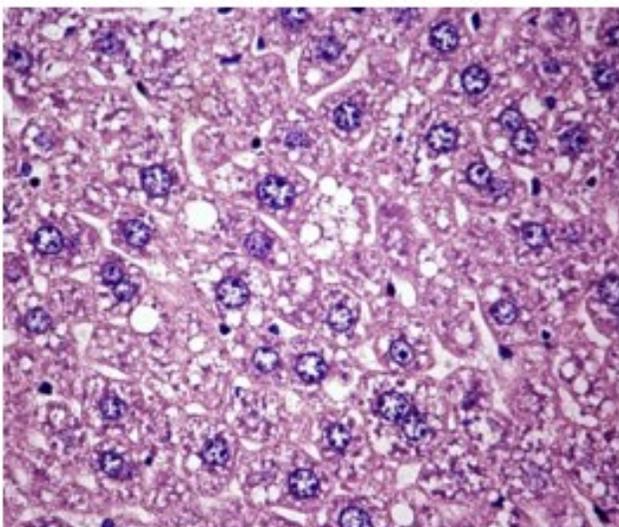
Grupo III: AntiTB + SIL



Grupo IV: Anti-TB + Au/AO 10 mg/kg



Grupo V: Anti-TB + AU/AO 20 mg/kg



Grupo I: CMC 0.5%
Grupo II: antiTB (INH/RIF/PZA, 10:10:30 mg/kg)
Grupo III: antiTB/SIL, 2.5 mg/kg
Grupo IV: antiTB + AU/AO, 10 mg/kg
Grupo V: antiTB + AU/AO, 20 mg/kg
Tinción con H&E 40X

Figura 2. Cortes histológicos de hígado de ratones machos Balb/C con daño hepático provocado por RIF/INH/PZA y tratados con la mezcla de AU/AO durante 60 días.

grupo II (antiTB) mostró leve hematopoyesis hepática (2/3), ligero infiltrado linfóide (2/3) y moderada esteatosis (3/3); además, presentaron esplenomegalia (2/3). Los animales del grupo IV (antiTB más AU/AO, 10 mg/kg) presentaron leve esteatosis (2/3) y ligera esplenomegalia (1/3). El grupo V (antiTB más AU/AO, 20 mg/kg) presentó escasa hematopoyesis hepática (1/3), moderada esteatosis (2/3) y ligera esplenomegalia (1/3). Por último, el grupo III (antiTB/SIL) presentó ligero infiltrado linfóide (1/3) y moderada esteatosis (2/3). Cabe señalar que la esteatosis fue mayor en el grupo de antiTB/SIL respecto al grupo antiTB.

DISCUSIÓN

En esta investigación se observó que la mezcla de AU/AO (a 10 y 20 mg/kg) y SIL administrado por vía i.g. durante 60 días, favoreció la GPC respecto al grupo antiTB y al vehículo. Este comportamiento fue similar a lo reportado previamente por Gutiérrez-Rebolledo et al.,²¹ cuando la mezcla de AU/AO (100 o 200 µg) se administró por ruta subcutánea. También observo que el hígado de los animales que recibieron solo antiTB (grupo II) presentó mayor peso respecto a los grupos I, III y IV.

Con respecto a los parámetros bioquímicos, la mezcla de AU/AO disminuyó los valores de creatinina respecto al grupo antiTB, siendo mejor la dosis de 10 mg/kg, ya que el valor fue muy similar al grupo de SIL y ligeramente menor al del vehículo. También la mezcla AU/AO (a las dosis de 10 y 20 mg/kg) redujo los niveles de urea y AST respecto al grupo antiTB, pero sin alcanzar los valores del vehículo ni de SIL. Los valores fueron similares a lo previamente reportado²¹.

El valor de ALT disminuyó en los grupos de AU/AO a 10 y 20 mg/kg respecto al vehículo y estos valores fueron similares al grupo que recibió SIL. Este efecto fue similar a lo observado cuando se administró por ruta subcutánea. Los valores de FA y COL disminuyeron ligeramente sin llegar a los valores del grupo control.

Los valores de triglicéridos no se afectaron en forma significativa, en cambio los valores de HDL fueron similares entre AU/AO (10 y 20 mg/kg) y el vehículo, pero ligeramente menores al grupo antiTB/SIL y antiTB.

La mezcla de AU/AO disminuyó la esteatosis respecto al grupo antiTB y antiTB/SIL. En un estudio previo se reportó que la mezcla AU/AO a la dosis de 100 µg/ratón/día, administrada por vía s.c. favoreció la GPC, disminuyó los niveles de AST, ALT y urea, y también disminuyó la esteatosis²¹. Los resultados encontrados en este trabajo indican que la mezcla de triterpenos (AU/AO) administrados por vía i.g. protegen al hígado del daño que ocasiona la mezcla de RIF/INH/PZA, el efecto HPP fue similar al observado cuando se administra por vía s.c. También está bien documentado que los niveles de urea y creatinina aumentan en casos de HPT provocado por fármacos antiTB debido al aumento del metabolismo de proteínas^{21,23,24}; los resulta-

dos encontrados en esta investigación, al administrar la mezcla de AU/AO (por vía i.g.) durante dos meses genero la disminución de los valores de este parámetro, esto indica que esta mezcla también tiene efecto nefroprotector.

Cabe señalar que el hígado es el órgano clave para la biotransformación de diversas sustancias, entre estas podemos mencionar a los fármacos antiTB; por lo que los desórdenes asociados con este órgano son numerosos y variados^{9,10}. Los antiTB al metabolizarse generan compuestos más tóxicos, alterando la integridad funcional y estructural de este órgano, también generan inflamación, hepatitis medicamentosa crónica y no crónica, fibrosis hepática, esteatosis y/o cirrosis no alcohólica y en ocasiones hasta carcinoma hepatocelular^{9,10,25}. Esta mezcla de fármacos (RIF/INH/PZA) básicos para tratar la TB ocasionan el mayor daño hepático, al incrementar los niveles de AST, ALT y FA; favorecen el desarrollo de estrés oxidativo, lipoperoxidación y deficiencia de colina, alterando de este modo la síntesis de fosfolipoproteínas. Cabe señalar que PZA es más hepatotóxico^{9-11,25,26}.

En la actualidad se están buscando sustancias de origen natural o sintético con efecto HPP. Por ejemplo, se ha descrito que la SIL muestra este efecto *in vivo* e *in vitro* ante el daño hepático ocasionado por fármacos antiTB, aunado a que también presenta efecto antituberculoso y antimicobacteriano²⁷⁻²⁹. Otros ejemplos de sustancias hepatoprotectoras son el picroliv, N-acetilcisteína, curcumina, resveratrol, entre otras^{9,10,30-32}. En trabajos previos, se reportó que la mezcla de AU/AO tiene efecto antimicobacteriano *in vitro*, antituberculoso a los 30 y 60 días de administración (en modelo murino de TB pulmonar) y nula toxicidad a 28 días en ratones Balb/C sanos cuya DL50 fue >2 mg/kg^{20,21,35,36}. De manera adicional, esta mezcla mostró efecto HPP contra el daño hepático ocasionado por tetracloruro de carbono, EtOH y D-galactosamina. El AO también mostró efecto HPP contra el daño generado por cadmio, bromobenceno y tioacetamida^{35,36}. La evaluación HPP de esta mezcla administrada durante 11 semanas por vía subcutánea (usando como vehículo aceite de olivo a dosis de 100 y 200 µg/ratón/día) en animales con daño hepático inducido con la mezcla de RIF/INH/PZA (10:10:30 mg/kg, solubilizados en SSI y administrados por vía i.g), demostró que AO/AU a 100 µg/ratón/día redujo los niveles de AST y ALT, sin cambios significativos sobre los valores de FA; también se observó que a esta dosis, la mezcla de triterpenos redujo la esteatosis²¹.

Cabe señalar, que previamente se ha descrito que el extracto CHCl₃ y MeOH de *R. officinalis* (hojas) contiene la mezcla de AU/AO¹⁶⁻¹⁹, por lo que esta especie medicinales constituye una fuente potencial para la obtención de la mezcla de triterpenos AU/AO. Es importante remarcar que la mezcla de AU/AO es insoluble en agua y fue parcialmente soluble en CMC, siendo esto una limitante a tomar en cuenta para estudios posteriores, por eso es necesario e importante desarrollar algunas formulaciones farmacéuticas de esta mezcla para someterlos a evaluación en este mismo ensayo, tomando en cuenta su potencial antituberculoso y HPP.

CONCLUSIONES

La mezcla de AU/AO administrado por vía intragástrica favoreció la ganancia de peso, y disminuyó los valores de enzimas hepáticas, también redujo la esteatosis ante el daño hepático que generan los fármacos antituberculosos. La mejor dosis fue la de 10 mg/kg administrado por vía i.g. durante 60 días. Esta mezcla de triterpenos puede obtenerse a partir de la especie medicinal *R. officinalis*.

REFERENCIAS

- Silva DR, Mello FCQ, Migliori GB. Tuberculosis series 2020. J Bras Pneumol. 2020; 46(2): e20200027. DOI: [10.36416/1806-3756/e20200027](https://doi.org/10.36416/1806-3756/e20200027)
- World Health Organization [internet]. Geneva: World Health Organization. Global tuberculosis report 2019. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329368/9789241565714-eng.pdf?ua=1>
- World Health [internet]. Geneva: World Health Organization. Global tuberculosis report 2020. Disponible en: <https://www.who.int/publications/item/9789240013131>
- Brigden G, Nyang'wa BT, du Cros P, Francis V, Jennifer H, Rich M, et al. Principles for designing future regimens for multidrug-resistant tuberculosis. Bull World Health Organ. 2014; 92(1):68-74. DOI: [10.2471/BLT.13.122028](https://doi.org/10.2471/BLT.13.122028)
- Günther G. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a review of current concepts and future challenges. Clin Med (Lond). 2014; 14(3): 279-285. DOI: [10.7861/clinmedicine.14-3-279](https://doi.org/10.7861/clinmedicine.14-3-279)
- Njoku DB. Drug-induced hepatotoxicity: Metabolic, genetic and immunological basis. Int J Mol Sci. 2014; 15(4): 6990-7003. DOI: [10.3390/ijms15046990](https://doi.org/10.3390/ijms15046990)
- Pérez-González MZ, Siordia-Reyes AG, Damián-Nava P, Hernández-Ortega S, Macías-Rubalcava ML, Jiménez-Arellanes MA. Hepatoprotective and Anti-Inflammatory Activities of the *Cnidioscolus chayamansa* (Mc Vaugh) Leaf Extract in Chronic Models. Evid Based Complement Alternat Med. 2018 (2018): 3896517. DOI: [10.1155/2018/3896517](https://doi.org/10.1155/2018/3896517)
- Pérez-González MZ, Macías-Rubalcava ML, Hernández-Ortega S, Siordia-Reyes G, Jiménez-Arellanes MA. Additional compounds and the therapeutic potential of *Cnidioscolus chayamansa* (McVaugh) against hepatotoxicity induced by antitubercular drugs. Biomed Pharmacother. 2019; 117:109140. DOI: [10.1016/j.biopha.2019.109140](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109140)
- Ramírez-Marroquín OA, Jiménez-Arellanes MA. Hepato-protective effect from natural compounds, biological products and medicinal plant extracts on antitubercular drug-induced liver injuries: A systematic review. Med Aromat Plants. 2019; 8: 339(1-12). DOI: [10.35248/2167-0412.19.8.339](https://doi.org/10.35248/2167-0412.19.8.339)
- Jiménez-Arellanes MA, Gutiérrez-Rebolledo GA, Meckes-Fischer M, León-Díaz R. Medical plant extracts and natural compounds with a hepatoprotective effect against damage caused by antitubercular drugs: A review. Asian Pac J Trop Med. 2016; 9(12): 1141-1149. DOI: [10.1016/j.apjtm.2016.10.010](https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.10.010)
- Nagarajan S, Whitaker P. Management of adverse reactions to first-line tuberculosis antibiotics. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2018; 18(4):333-341. DOI: [10.1097/ACI.0000000000000462](https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000462)
- Metushi I, Uetrecht J, Phillips E. Mechanism of Isoniazid-induced hepatotoxicity: then and now. Br J Clin Pharmacol. 2016; 81:1030-1036. DOI: [10.1111/bcp.12885](https://doi.org/10.1111/bcp.12885)
- Mukherjee A, Lodha R, Kabra SK. Pharmacokinetics of First-Line Anti-Tubercular Drugs. Indian J Pediatr 2019; 86(5):468-478. DOI: [10.1007/s12098-019-02911-w](https://doi.org/10.1007/s12098-019-02911-w)
- Perwitasari DA, Irham LM, Darmawan E, Mulyani UA, Atthobari J. CYP2E1 polymorphism, acetylator profiles and drug-induced liver injury incidence of Indonesian tuberculosis patients. Indian J Tuberc. 2016; 63(3):139-143. DOI: [10.1016/j.ijtb.2016.08.001](https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2016.08.001)
- Suvichapanich S, Fukunaga K, Zahroh H, Mushiroda T, Mahasirimongkol S, Toyooka L, et al. NAT2 ultra-slow acetylator and risk of anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a genotype-based meta-analysis. Pharmacogenet Genomics. 2018; 28(7): 167-176. DOI: [10.1097/FPC.0000000000000339](https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000339)
- Abe F, Yamauchi T, Nagao T, Kinjo J, Okabe H, Higo H, et al. Ursolic acid as a trypanocidal constituent in rosemary. Biol Pharm Bull. 2002; 25(11):1485-1487. DOI: [10.1248/bpb.25.1485](https://doi.org/10.1248/bpb.25.1485)
- Lukaczar D, Darland G, Tripp M, Liska DA, Lerman RH, Schiltz B, et al. A Pilot trial evaluating meta050, a proprietary combination of reduced iso-alpha acids, rosemary extract and oleanolic acid in patients with arthritis and fibromyalgia. Phytother Res. 2005; 19(10):864-869. DOI: [10.1002/ptr.17](https://doi.org/10.1002/ptr.17)
- Martínez AL, González-Trujano ME, Chávez M, Pellicer F. Antinociceptive effectiveness of triterpenes from rosemary in visceral nociception. J Ethnopharmacol. 2012; 142(1):28-34. DOI: [10.1016/j.jep.2012.03.052](https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.052)
- Beltrán-Villalobos KL, Déciga-Campos M, Aguilar-Mariscal H, González-Trujano ME, Martínez-Salazar MF, Ramírez-Cisneros MA, et al. Synergistic antinociceptive interaction of *Syzygium aromaticum* or *Rosmarinus officinalis* coadministered with ketorolac in rats. Biomed Pharmacother. 2017; 94: 858-864. DOI: [10.1016/j.biopha.2017.07.166](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.166)
- Jiménez-Arellanes A, Luna-Herrera J, Cornejo J, López-García S, Castro-Musnot ME, Meckes-Fischer M, et al. Ursolic and oleanolic acids as antimicrobial and immunomodulatory compounds for tuberculosis treatment. BMC Complement Alter Med. 2013; 13(1): 258-269. DOI: [10.1186/1472-6882-13-258](https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-258)
- Gutiérrez-Rebolledo GA, Siordia-Reyes GA, Meckes-Fischer M, Jiménez-Arellanes A. Hepatoprotective properties of oleanolic and ursolic acids in anti-tubercular drug-induced liver damage. Asian Pac Trop Med. 2016; 9(7): 644-651. DOI: [10.1016/j.apjtm.2016.05.015](https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.05.015)
- Seebacher W, Simic N, Weis R, Saf R, Kunert O. Spectral Assignments and reference data. Complete assignments of ¹H and ¹³C NMR resonances of oleanolic acid, 18 α -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. Magn Reson Chem. 2003; 41(8): 636-638. DOI: [10.1002/mrc.1214](https://doi.org/10.1002/mrc.1214)
- Sakashita K, Murata K, Takahashi Y, Yamamoto M, Oohashi K, Sato Y, et al. A Case Series of Acute Kidney Injury During Anti-tuberculosis Treatment. Intern Med. 2019; 58(4): 521-527. DOI: [10.2169/INTERNALMED.0813-18](https://doi.org/10.2169/INTERNALMED.0813-18)
- Siordia-Reyes GA, Cornejo-Garrido Jorge, Jiménez-Arellanes MA. Nephro- and Hepatoprotective effect of *Rosmarinus officinalis* against damage induced with anti-tb drugs in chronic model. Pharmacogn J. 2021; 13(3): 722-729. DOI: [10.5530/pj.2021.13.92](https://doi.org/10.5530/pj.2021.13.92)
- Ramappa V, Aithal GP. Hepatotoxicity related to anti-tuberculosis drugs: Mechanisms and management. J Clin Exp Hepatol. 2013; 3(1):37-49. DOI: [10.1016/j.jceh.2012.12.001](https://doi.org/10.1016/j.jceh.2012.12.001)
- Luangchosisri C, Thakkinstian A, Chitphuk S, Stitchantrakul W, Petraksa S, Sobhonslidsuk A. A double-blinded randomized controlled trial of silymarin for the prevention of antituberculosis drug-induced liver injury. BMC Complement Alter Med. 2015; 15: 334. DOI: [10.1186/s12906-015-0861-7](https://doi.org/10.1186/s12906-015-0861-7)
- Eminzade S, Uraz F, Izzettin FV. Silymarin protects liver against toxic effects of anti-tuberculosis drugs in experimental animals. Nutr Metab (Lond). 2008; 5(18): 1-8. DOI: [10.1186/1743-7075-5-18](https://doi.org/10.1186/1743-7075-5-18)
- Rodríguez-Flores EM, Mata-Espinosa D, Barrios-Payan J, Marquina-Castillo B, Castañón-Arreola M, Hernández-Pando R. A significant therapeutic effect of silymarin administered alone, or in combination with chemotherapy, in experimental pulmonary tuberculosis caused by drug-sensitive or drug-resistant strains: in vitro and in vivo studies. PLoS One. 2019; 14(5):e0217457. DOI: [10.1371/journal.pone.0217457](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217457)
- Jiménez-Arellanes MA. Silymarina como potencial agente hepatoprotector. Rev Cadena Cereb. 2019, 3(2): 60-70. Disponible en: <https://www.cadenadecerebros.com/art-re-32-02>
- Nicoletti NF, Rodrigues-Junior V, Santos Jr AA, Leite CE, Dias ACO, Batista Jr EL, et al. Protective effects of resveratrol on hepatotoxicity induced by isoniazid and rifampicin via SIRT1 modulation. J Nat Prod. 2014; 77(10): 2190-2195. DOI: [10.1021/np5003143](https://doi.org/10.1021/np5003143)
- Vargas-Mendoza N, Madrigal-Santillán E, Morales-González Á, Esquivel-Soto J, Esquivel-Chirino C, García-Luna M, et al. Hepatoprotective effect of silymarin. World J Hepatol. 2014; 6(3): 144-149. DOI: [10.4254/wjh.v6.i3.144](https://doi.org/10.4254/wjh.v6.i3.144)
- Girish C, Pradhan SC. Drug development for liver diseases: focus on picroliv, ellagic acid and curcumin. Fundam Clin Pharmacol. 2008; 22(6): 623-663. DOI: [10.1111/j.1472-8206.2008.00618.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2008.00618.x)
- Jiménez-Arellanes MA, Franco-García M, León-Díaz R. Current Status of Mexican Medicinal Plants as Source of Antimycobacterial and Antituberculosis Compounds. J Infect Dis Ther. 2019; 7(6): 1000414; 1-4. Disponible en: <https://www.omicsonline.org/open-access/current-status-from-mexican-medicinal-plants-as-source-of-antimycobacterial-and-antituberculosis-compounds.pdf>
- Cornejo-Garrido J, Chamorro-Cevallos GA, Garduño-Siciliano L, Hernández-Pando R, Jiménez-Arellanes MA. Acute and subacute toxicity (28 days) of a mixture of ursolic acid and oleanolic acid obtained from *Bouvardia ternifolia* in mice. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromats. 2012; 11(1):91-102. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85622229011>
- do Nascimento PG, Lemos TL, Bizerra AM, Arriaga AM, Ferreira DA, Santiago GM, et al. Antibacterial and Antioxidant Activities of Ursolic Acid and Derivates. Molecules 2014; 19: 1317-1327. DOI: [10.3390/molecules19011317](https://doi.org/10.3390/molecules19011317)
- Ayeleso TB, Matumba MG, Mukwevho E. Oleanolic Acid and Its Derivates: Biological Activities and Therapeutic Potential in Chronic Diseases. Molecules. 2017; 22(11): 1915. DOI: [10.3390/molecules22111915](https://doi.org/10.3390/molecules22111915)

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declararon que no tienen conflictos de intereses.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo se desarrolló con el financiamiento del proyecto FIS/IMSS/PROT/G16/ 1577 (CLIC: R-2015-3601-47).

PRESENTACIONES PREVIAS

Ninguna.