

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL *Silybum marianum* PARA EL
TRATAMIENTO HEPÁTICO POR SOBREDOSIS CON
PARACETAMOL EN RATONES**

POR

CESAR OCTAVIO CRUZ MARMOLEJO

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE**

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México

Agosto de 2014

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

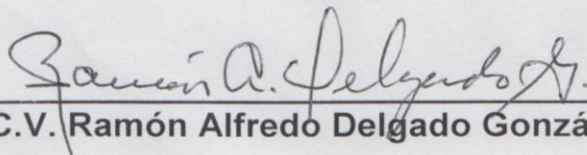
DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

TESIS

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL *Silybum marianum* PARA EL
TRATAMIENTO HEPATICO POR SOBREDOSIS CON
PARACETAMOL EN RATONES**

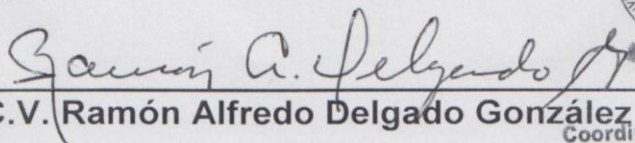
APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR DE REVISIÓN

ASESOR PRINCIPAL




M.C.V. Ramón Alfredo Delgado González

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



M.C.V. Ramón Alfredo Delgado González


Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

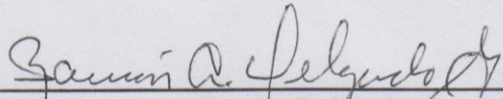
Torreón, Coahuila, México,

agosto de 2014

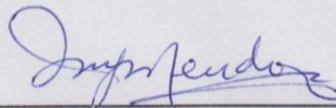
EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL *Silybum marianum* PARA EL
TRATAMIENTO HEPATICO POR SOBREDOSIS CON
PARACETAMOL EN RATONES

TESIS ELABORADA BAJO SUPERVISIÓN DEL COMITÉ
PARTICULAR DE ASESORÍA Y APROBADA COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:

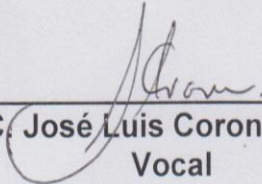
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA



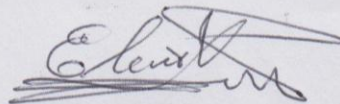
M.C.V. Ramón Alfredo Delgado González
Presidente



M.C. Margarita Yolanda Mendoza Ramos
Vocal



M.C. José Luis Corona Medina
Vocal



M.C. Eleno Hernández Martínez
Vocal Suplente

Torreón, Coahuila, México,

agosto de 2014

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios, el Dios de todos los tiempo el cual me enseña día con día el juego de la vida, el me da y me quita todo lo que no me sirve, por eso le agradezco cada momento de mi vida, cada éxito, y cada aprendizaje, éstos son gracias a él, no tengo muchas palabras que decirle solo darle las gracias, que haga de mi según su palabra.

A mis padres

A mi madre Rosa Marmolejo Montoya, la cual con su gran apoyo y dedicación ha sabido tener la fuerza que se necesita en la familia, a ella le agradezco todos estos años y todos los que hacen falta gracias madre.

A mi padre Marcos Cruz Cruz, por su fuerza, el cual me dice que hay que seguir luchando, que aunque la vida te apriete tú debes de salir triunfador, también él sabe que cada sudor y cada esfuerzo serán recompensados, a él le doy las gracias por ser mi padre.

A mi hermano

Este hombre de mediana edad tan necio como siempre pero tan aventado como él lo sabe hacer le doy las gracias por todo este tiempo, aunque parece sorprendente y muy absurdo, de este hombre también he aprendido demasiado que cada conversación es un rito de armonía.

A mis amigos, compañeros y conocidos

A cada uno de ellos les agradezco su presencia en cada momento de mi vida gracias a todos ustedes aprendo y reaprendo porque me llevo algo de cada uno en cada momento y en cada instante gracias por todo, su semilla en mí está dando frutos.

RESUMEN

Se realizó un estudio con la finalidad de evaluar la eficacia de *Silybum marianum* en dosis homeopáticas, como protector hepático después de la intoxicación aguda con Paracetamol. Se analizaron 27 hígados de ratas, se dividieron en tres grupos: Un Grupo control sin tratamiento, se les administró agua y alimento a libre acceso; Grupo Paracetamol, se administró 20 mg/Kg/PC de Paracetamol por vía oral, agua y alimento a libre acceso; Grupo Paracetamol - *Carduus marianus* (P/Cm), se administró 4 mL Cm 6c en 140 mL de agua, 20 mg/Kg/PC de Paracetamol vía oral, agua y alimento a libre acceso. Se analizó el hígado con un estudio histopatológico descriptivo observando disociación de cordones hepáticos, anisocariosis, células binucleadas, infiltración linfocitaria, vacuolización de hepatocitos y necrosis. Describiendo el grado de alteración como leve, moderada, y severa. Los resultados importantes mostraron lipidosis hepática en el Grupo control con 77.7% en grado leve; en el Grupo Paracetamol con 66.6% en grado leve; y en el Grupo P/Cm en 11.1%. En el Grupo control no se observó necrosis; en el Grupo Paracetamol hubo 88.8% de necrosis leve y 11.1% de necrosis moderada; y en el grupo P/Cm necrosis en grado leve en el 44.4%. Hubo una diferencia numérica marcada con respecto a ésta alteración del Grupo Paracetamol, tanto con el Grupo control como para el Grupo P/Cm. Se concluye que el *Silybum marianum* produce protección hepática en dosis homeopáticas 6c.

Palabras clave: Intoxicación, Paracetamol, *Silybum marianum*, hepatoprotector, histopatología, necrosis, lipidosis hepática.

INDICE

	Página
Agradecimientos	i
Resumen	ii
Indice	iii
Índice de cuadros y figuras	iv
Anexos	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	2
2.1. Hígado.....	2
2.1.1. Generalidades del hígado	2
2.1.3. Hepatocito.....	3
2.1.4. Sinusoides hepáticos	4
2.2. <i>Silybum marianum</i> (<i>Carduus marianus</i>)	5
2.2.1. Principios activos	6
2.2.2. Características fenotípicas y fenológicas	6
2.2.3. Respuestas sistémicas	7
2.2.4. Principales usos.....	8
2.2.5. Farmacocinética.....	9
2.2.6. Efectos antiinflamatorios	10
2.2.7. Homeopatía	11
2.2.8. Generalidades de la homeopatía	11
2.2.9. Principios fundamentales de la homeopatía	12
2.2.10. Principios básicos de la homeopatía	12
2.2.11. Patogénesias.....	13
2.2.12. Acción del medicamento homeopático	13
2.2.13. Campo de acción de la homeopatía y sus límites.....	14
2.3. Paracetamol	14
2.3.1. Generalidades del Paracetamol.....	14
2.3.2. Epidemiología.....	15
2.3.3. Farmacología y fisiología	16

2.3.4.	Hepatotoxicidad	17
2.3.5.	Manifestaciones clínicas.....	18
III.	JUSTIFICACION	21
IV.	HIPOTESIS	21
V.	OBJETIVOS	21
	Objetivo General.....	21
	Objetivos Específicos.....	21
VI.	MATERIAL Y METODOS	22
VII.	RESULTADOS Y DISCUSION	25
VIII.	CONCLUSIONES.....	35
IX.	LITERATURA CITADA	36

INDICE DE FIGURAS Y CUADROS

	Página
Figura 1. Lobulillo hepático limitado por tejido conectivo interlobulillar Periportal. A) Espacio periportal, B) Vena central.	4
Figura 2. Lesiones observadas por intoxicación con paracetamol. A) Hepatocitos delimitados. Espacios sinusoidales permeables; B) Hiperemia en los espacios intersinusoidales; C) Espacios sinusoidales permeables. Arquitectura del hepatocito intacta; D) Hepatocitos con degeneración grasa con patrón vacuolar.	19
Figura 3. Disociación de cordones hepáticos en ratas intoxicadas experimentalmente con paracetamol.	26
Figura 4. Anisocariosis (núcleos de diferentes tamaños) de hepatocitos en ratas intoxicadas experimentalmente con paracetamol.	27
Figura 5. Hepatocitos binucleados en ratas intoxicadas experimentalmente con paracetamol.	28
Figura 6. Infiltración linfocitaria focal periportal en ratas intoxicadas experimentalmente con paracetamol.	29
Figura 7. Vacuolización de citoplasma de hepatocitos en ratas intoxicadas	30

experimentalmente con paracetamol.

Figura 8. Necrosis de hepatocitos en ratas intoxicadas experimentalmente con paracetamol. Se aprecian A) núcleos picnóticos, B) detritos celulares, y C) hepatocitos sin núcleo. 31

Cuadro 1. Porcentaje de alteraciones histológicas en hígado de los tres grupos, de acuerdo a su grado de lesiones 25

ANEXOS

Anexo 1. Técnica de histopatología de inclusión en parafina.41

Anexo 2. Tinción de Hematoxilina y Eosina.....42

I. INTRODUCCIÓN

La homeopatía se utiliza como alternativa médica como terapéutica de los semejantes. El principio de la similitud consiste en producir alteraciones o síntomas similares de una enfermedad con algunas sustancias, y también son capaces de curarlas. La medicina homeópata cura de tal manera que le permite al organismo responder inmunológicamente en forma natural al estimular sus capacidades y no inhibiéndolas (Silva, 2008). Como terapia alternativa es considerada como inocua por excelencia, ya que es muy segura si se utiliza adecuadamente. La homeopatía es una forma terapéutica que, “basada en el principio de la similitud y considerando que sin similitud no hay homeopatía”, utiliza medicamentos en dosis infinitesimales para curar, como una alternativa de salud muy eficiente (Ballester *et al.*, 1999).

Por otra parte, el *paracetamol (acetaminofén)* es un medicamento muy utilizado por la población como un analgésico y antipirético eficiente, sin embargo, cuando se utiliza una sobredosificación puede causar toxicidad la cual produce necrosis hepática, siendo una de las principales causas de insuficiencia hepática aguda en niños (Knight *et al.*, 2003). Debido a las diferencias asociadas con la edad, a la administración del medicamento, y la eliminación o depuración de los metabolitos del acetaminofén, los niños pequeños lactantes son más susceptibles que los adultos a la toxicidad después de una ingestión aguda. En caso de que se retrase el tratamiento se incrementa de forma importante el riesgo de lesión hepatocelular clínicamente significativa (González-Mendoza y Vicuña-Fernández, 2003).

En la medicina homeopática, *Silybum marianum* (Silimarina) es una planta empleada para el tratamiento de la enfermedad hepática, especialmente en aquellas causadas por estrés oxidativo. Los principales efectos de la silimarina son la estabilización de la membrana del hepatocito, efecto antioxidante, regenerador celular, efecto antiinflamatorio y antifibrótico (Vázquez-Frías *et al.*, 2013).

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. Hígado

2.1.1. Generalidades del hígado

El hígado constituye la mayor glándula del cuerpo y es considerablemente más pesada en el animal joven que en el adulto, se localiza entre el diafragma, en posición craneal, estómago y masa intestinal en situación caudal, en todas las especies su mayor parte se sitúa en el cuadrante superior derecho de la cavidad abdominal, en la mayoría de las especies el hígado se encuentra dividido en lóbulos mediante una serie de cisuras que se prolongan desde el borde ventral hacia el interior del órgano (Getty, 2002).

El hígado realiza actividades de excreción, secreción de bilis, almacenamiento, síntesis, fagocitosis, detoxificación, conjugación, esterificación, metabolismo, hematopoyesis. Además de tener funciones exocrinas, suministra la principal fuente de proteínas plasmáticas sintetizando a los pro coagulantes plasmáticos y proteínas de fase aguda de la inflamación, una de las funciones del hígado es captar a los fármacos y sustancias tóxicas del cuerpo absorbidas en el intestino y los degrada mediante oxidación o formación de conjugados inocuos que son devueltos a intestino a través de la bilis, realiza importantes funciones en la formación de fermentos y como órgano protector contra agentes nocivos mediante selección de sustancias absorbidas en el intestino (Guyton y Hall, 2000).

2.1.2. Estructura del hígado

El hígado es un órgano compacto con un parénquima de células con funciones endócrinas y exócrinas dispuestas en unidades estructurales llamadas lobulillos hepáticos. La glándula está recubierta por una cápsula delgada y poco resistente, externamente revestida por células mesoteliales de origen peritoneal y tejido conectivo fibroso en donde se encuentran fibras musculares lisas, vasos arteriales venosos y linfáticos (Banks, 1993).

El lobulillo hepático tiene forma hexagonal, su estructura se organiza alrededor de la vena centrilobulillar a partir de la cual se encuentran cordones de hepatocitos, dispuestos en forma radial, dirigidos hacia los espacios periportales en los que se encuentran capilares que se disponen entre los cordones hepáticos. En los vértices alternos del lobulillo existe una pequeña área triangular formada por tejido conectivo llamado espacio portal en cuyo seno se observa la presencia del conductillo biliar, una rama de la arteria hepática, una de la vena porta y un vaso linfático, conociéndose como triada portal, las ramas laterales de estos vasos confluyen en los sinusoides hepáticos, que ocupan los espacios entre los cordones hepáticos, para drenar a la vena centrilobulillar. Por otro lado la bilis es secretada de forma continua hacia una red de canalículos biliares que se sitúan en el interior de los cordones hepáticos. Esta unidad poligonal se ha considerado la unidad estructural y funcional del hígado claramente delimitada por tabiques de tejido conectivo (Gazquez y Blanco, 2004).

2.1.3. Hepatocito

El hepatocito constituye aproximadamente el 80% del parénquima del hígado, ésta célula tiene forma poliédrica con seis o más lados, la membrana celular se repliega para formar microvellosidades, presenta una polaridad muy marcada y está íntimamente relacionada con el espacio vascular. Se caracteriza por tener un núcleo esférico central con uno o más nucléolos prominentes es frecuente encontrar hepatocitos binucleados y poliploides, el citoplasma tiene una nutrida representación de organelos, debido a su función de célula endocrina y exocrina, entre los organelos destaca su mitocondrias, el retículo endoplásmico rugoso y liso y los lisosomas (Aughey y Frye, 2001).

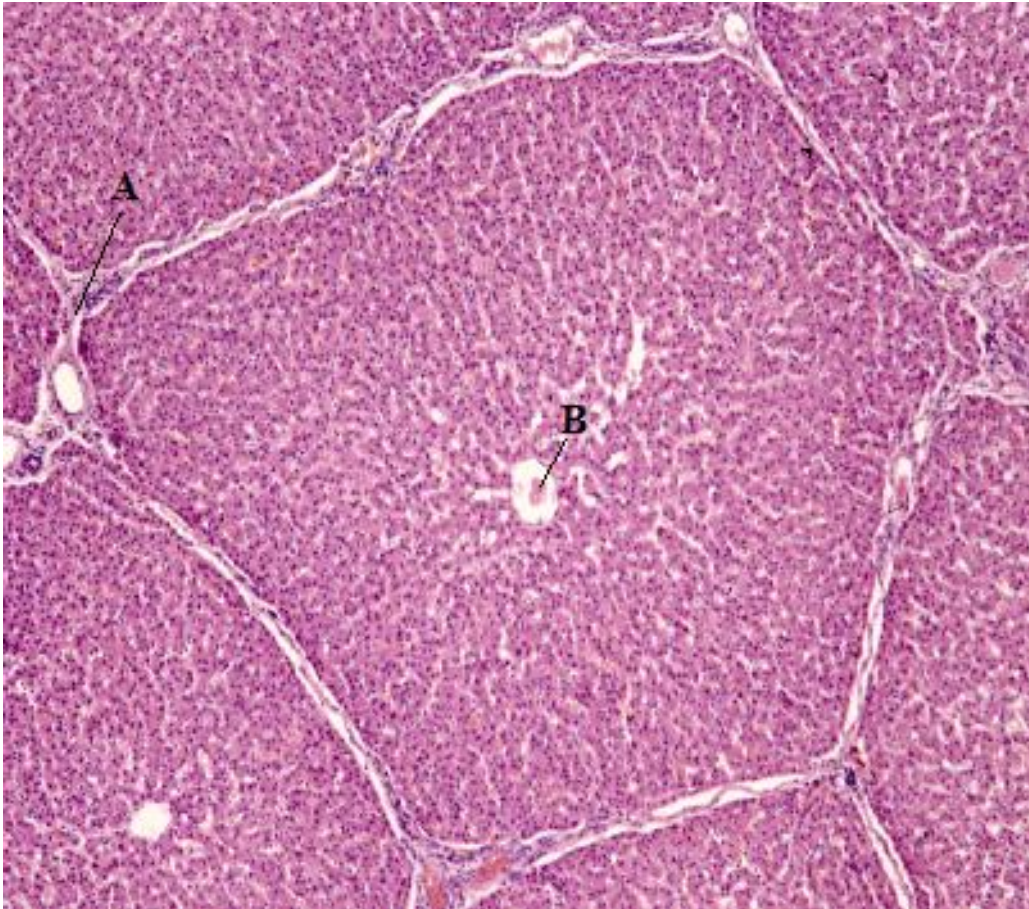


Figura 1. Lobulillo hepático limitado por tejido conectivo interlobulillar periportal.
A) Espacio periportal, B) Vena central.

2.1.4. Sinusoides hepáticos

Los sinusoides tienen una importante función de la circulación hepática, éstos forman un plexo tridimensional en el interior de los lobulillos, constituyendo una superficie muy amplia de intercambio de nutrientes y metabolitos entre la sangre y el parénquima hepático. Los sinusoides hepáticos son más anchos que los capilares y se encuentran a través del lobulillo llevando sangre del espacio periportal hacia la vena centrilobulillar, a partir de la arteria hepática y de la vena porta, estos vasos sanguíneos están revestidos por un endotelio discontinuo y poroso. Además, se encuentran a su alrededor grandes macrófagos estelares llamados células de Kupffer que se derivan de los monocitos sanguíneos con una gran capacidad de autoreplicación y forman parte del sistema fagocítico

mononuclear en este órgano (Gazquez y Blanco, 2004; Aughey y Frye, 2001; Banks, 1993).

2.2. *Silybum marianum* (*Carduus marianus*)

El *Carduus marianus* (*Cm*), es un representante de la familia de las *Asteráceas*, se conoce como un importante hepatoprotector (Abbasi *et al.*, 2010). Se encuentra entre los suplementos botánicos más vendidos en los Estados Unidos y Europa, su venta promedio en Estados Unidos es sobre 8000 millones de dólares al año y su demanda varía de 18 a 20 toneladas por año (Ahmad *et al.*, 2013a; Ahmad *et al.*, 2013b).

La *Silimarina* es aislada de las frutas y semillas del llamado comúnmente cardo mariano. Es una mezcla de flavonoides polifenólicos con una importante función antioxidante. Desde hace varias décadas, varios estudios con silimarina han demostrado que ésta protege contra la hepatotoxicidad en roedores. En Estados Unidos muy recientemente se ha incrementado su uso como suplemento dietético, además de ser un componente con diversas mezclas de antioxidantes (Malewicz *et al.*, 2006) para tratar los trastornos hepáticos y biliares caracterizados por necrosis, degeneración y deterioro funcional (Luper, 1998), y también se ha utilizado en protocolos de desintoxicación y limpieza hepática.

El *Cm*, es una hierba que se utiliza en investigación y tratamientos de oncología. Esta planta tradicional se ha utilizado desde la antigüedad como un hepatoprotector contra la intoxicación por setas amanita y por daño oxidativo debido a xenoantibióticos, especialmente en Europa (Flora *et al.*, 1998). El *Cm*, es utilizado cada vez más en investigación para su uso en poblaciones adultas y pediátricas en indicaciones oncológicas. Este *Cm* ha sido utilizado para el tratamiento del cáncer, incluyendo la limpieza y desintoxicación antes, durante y después de la quimioterapia, y la potenciación de la quimioterapia y la radioterapia como tratamiento adyuvante. Los extractos de las semillas del *Cm*, son conocidos

como silibinina y silimarina y poseen acciones contra el cáncer en el carcinoma de próstata humano *in vitro* e *in vivo* (Davis-Searles *et al.*, 2005).

2.2.1. Principios activos

El principio activo de *Cm*, es la silimarina; que es una mezcla isomérica de *silibina*, *silicristina*, *isosilibina* y *silidianina* la silimarina es importante radical que protege los tejidos humanos de daño oxidativo. Mejora la producción de una potente enzima, la *superóxido dismutasa*, un antioxidante natural conocido especialmente en desintoxicación de los radicales libres. También se conoce que aumenta la síntesis de proteínas ribosomales que ayudan a los tejidos en su regeneración hepática (Misar *et al.*, 2013).

2.2.2. Características fenotípicas y fenológicas

El *Cm* es medicinalmente importante por su contenido de silimarina, antioxidante, tradicionalmente utilizado como un inmunoestimulante, hepatoprotector, además de ser un quimiopreventivo y un útil agente antineoplásico. Su componente activo protege y regenera a los hepatocitos de los efectos tóxicos de los fármacos (Das *et al.*, 2011; Post-White, 2007), eliminando radicales libres, debido a su potencial actividad antioxidante de diferentes partes de la planta. Se observa una actividad significativamente mayor (78.2%) en las semillas de plantas con flores de color púrpura, que en las semillas de planta con flores blancas (49%). La actividad de las hojas jóvenes de plantas con flores blancas (64.8%) es más alta que la de las plantas con flores de color púrpura (55.1%). La misma actividad se observa en las hojas maduras de plantas con flores blancas (52%) y en plantas con flores de color púrpura (50%). El tallo principal obtenido de ambas variedades presenta actividad similar 50-52%. Una actividad de 67.2% se registra en las raíces maduras de la planta con flores blancas seguido de las raíces de la variedad púrpura (65%). Se concluye que las semillas y las raíces de ambas variedades limpian y desintoxican de los radicales libres, más que otras partes de la planta y

pueden ser utilizados como una fuente de antioxidantes naturales y aditivos alimentarios (Afhmad *et al.*, 2013)

La química de sus componentes, aislado de los frutos de diferentes especies de *Silybum* procedentes de diversas partes de Europa, ha sido objeto de numerosos proyectos de investigación desde mediados del siglo pasado. La presencia de flavonolignanos en la flor púrpura variante de esta planta fue reconocido en los años cincuenta a sesentas (Nyiredy *et al.*, 2008). La *Silimarina* es un agente prometedor para la prevención del cáncer, para el tratamiento adyuvante del cáncer, y la reducción de la toxicidad iatrogénica. Ha demostrado eficacia contra el cáncer de piel, próstata, de mama y de células cervicales, entre otros, ya que Inhibe el crecimiento de células malignas (Post-white *et al.*, 2007). En el cáncer de piel, el tratamiento con *Silimarina* inhibe el inicio de la carcinogénesis química debido a la radiación ultravioleta. Estos efectos de la *Silimarina* contra la carcinogénesis de la piel se han atribuido a su fuerte acción antioxidante y anti-inflamatoria, así como su efecto inhibitorio sobre la señalización mitogénica. Del mismo modo, el tratamiento inhibe la carcinogénesis de próstata y retarda el crecimiento de xenoinjertos del tumor de próstata avanzado e ratones experimentales. (Deep y Agarwal, 2007). Aunque es seguro y libre de efectos secundarios adversos serios, pocos estudios han evaluado su uso junto con terapias citotóxicas convencionales, y los eventos adversos asociados con la administración a largo plazo son inciertos (Sagar, 2007).

2.2.3. Respuestas sistémicas

El *Cm*, no altera significativamente el curso de la enfermedad hepática crónica, pero reduce los niveles de enzimas hepáticas y ha demostrado efectos sobre las células T modulando el efecto antiinflamatorio. Se considera seguro y bien tolerado, con ligero malestar gastrointestinal, un efecto laxante leve y reacción alérgica rara, siendo los únicos eventos adversos informados cuando se toma dentro del rango de dosis recomendadas (Post-White *et al.*, 2007).

Los extractos siguen siendo ampliamente utilizados para proteger el hígado contra toxinas y para controlar las enfermedades crónicas del hígado. Estudios experimentales y clínicos recientes sugieren que los extractos de *Cm* también tienen efectos antidiabéticos y cardioprotectores. Varios ensayos han estudiado los efectos del *Cm* para pacientes con enfermedades hepáticas como cáncer, hepatitis C, Virus de la Inmunodeficiencia Humana, diabetes e hipercolesterolemia, con resultados prometedores. Las dosis establecidas y la mejora en la calidad y la normalización de esta hierba aportan evidencias sobre su eficacia. Los extractos de cardo son conocidos por ser seguros y bien tolerados, y los efectos tóxicos observados con ensayos clínicos parecen ser mínimos. El futuro de la investigación sobre el *Cm* es prometedor, y pueden ser necesarios ensayos clínicos aleatorios de alta calidad con el *Cm* .versus placebo para demostrar aún más la seguridad y eficacia de esta hierba (Tamayo y Diamond, 2007).

2.2.4. Principales usos

Tradicionalmente, el *Cm* es comúnmente utilizado para la cirrosis hepática, hepatitis alcohólica, hígado graso, la intoxicación del hígado y la hepatitis viral. *Sm* juega un papel en el desplazamiento de las toxinas de unión al hígado y haciendo que las células del hígado para regenerarse con mayor rapidez. Los extractos estandarizados de *Silimarina* de frutos y semillas de *Sm* se han empleado para el tratamiento en seres humanos, principalmente con trastornos hepáticos relacionados con diferentes etiologías. Es incluida en la farmacopea de mucho países bajo marcas comerciales y su frecuencia es utilizado como terapia de apoyo en la intoxicación (Pilat *et al.*, 2011).

En animales de laboratorio se han estudiado los efectos tóxicos del tetracloruro de carbono, etanol, y acetaminofén (Crocenzi y Roma, 2006), Arsénico (Jain *et al.*, 2011), radiación (Kroll *et al.*, 2007), entre otros. Recientemente, dos laboratorios independientes han demostrado los efectos antivirales de la *Silimarina* contra el

virus de la Hepatitis C (Bonifaz *et al.*, 2007) los efectos beneficiosos de la *Silimarina* en la enfermedad hepática no han sido establecidos debido a las inconsistencias en los resultados obtenidos a partir de varios ensayos clínicos aleatorios que pueden reflejar diferentes diseños de ensayos y el uso de diferentes formulaciones (Mayer *et al.*, 2005).

2.2.5. Farmacocinética

La *Silimarina* actúa de varias maneras diferentes, como un antioxidante, absorbente, regulador de la glutatión intracelular, estabilizador y regulador de la permeabilidad de la membrana celular que impide la entrada de sustancias hepatotóxicas en los hepatocitos como promotor de la síntesis de ARN ribosómico, así como estimulador de la regeneración del hígado e inhibidor de la transformación de las células hepáticas en miofibroblastos (Pilat *et al.*, 2011).

Se ha demostrado que ejerce efectos profundos en la membrana hepatocelular, afectando su estabilidad y es capaz de aumentar la tasa de síntesis de rRNA mediante la activación de la ARN polimerasa (Machicao y Sonnenbichler, 1997), lo que podría mejorar la integridad de la membrana. También puede estabilizar directamente la membrana plasmática eliminando la tensión mecánica (por ejemplo, hinchazón osmótica) y el estrés químico que puede ser ocasionado por detergentes y diferentes tipos de células (Basiglio *et al.*, 2009). Las interacciones de los compuestos flavonoides con los fosfolípidos en interface lípido agua de la membrana, contribuyen con la función protectora contra la per oxidación de lípidos debido al sistema antioxidante de las células (Erlejman *et al.*, 2004).

El *Cm* estimula la capacidad de regeneración del hígado para formar nuevos hepatocitos mediante la estimulación de la actividad de ARN (Sonnenbichler *et al.*, 1999). Los efectos protectores de *Cm* en el hígado pueden estar relacionados con la recuperación de la fluidez de la membrana de los microsomas y mitocondrias del hígado (Wu *et al.*, 2008).

2.2.6. Efectos antiinflamatorios

La multiplicación de los hepatocitos en un hígado aparentemente sano es muy rápida ya que un ciclo celular en éstas células tiene una duración de ~24 h (López, 2004). Esta regeneración hepática normal se manifiesta con la presencia de células binucleadas y una anisocariosis leve, la cual se aprecia en forma marcada en ratas jóvenes (Nuñez y Bouda, 2007).

Durante la inflamación hepática, el daño muestra cambios en la estructura celular y en la disposición histológica de los hepatocitos. Los parámetros a medir son el pleomorfismo celular, necrosis, pérdida de la integridad del tejido, zonas de vacuolización, anisocitosis y anisocariosis, hiper Cromasia y disociación de los cordones hepáticos, todas con diferentes grados de alteración, leves, moderadas, severas o hasta muy severas. Otras alteraciones del tejido hepático se relacionan con el grado de fibrosis y el depósito de colágena, grosor de los trabéculos de colágena y el espacio porta conjuntivo, que caracterizan un proceso crónico (Molina *et al.*, 2012).

En general la inflamación severa es conocida como una de las principales consecuencias fisiopatológicas del hígado, tales como la hepatitis viral y cirrosis. La *Silimarina* ha demostrado tener efectos antiinflamatorios significativos sobre el tejido hepático. El efecto antiinflamatorio implica el bloqueo de la activación intrahepática del Factor Nuclear Kappa B, la disminución del Factor de Necrosis Tumoral, Interferón gamma, interleucinas, y el inductor de Óxido Nítrico sintetasa, además de la inhibición de la síntesis de Leucotrienos y la formación de Prostaglandinas. La *Silimarina* puede tener un efecto inhibitor sobre el sistema desintoxicante, citocromo oxidasa P450, en forma dependiente de la dosis (Doehmer *et al.*, 2011). El estrés oxidativo es un mecanismo principal de iniciación y progresión del daño hepático en una variedad de trastornos hepáticos (Jain *et al.*, 2011).

2.2.7. Homeopatía

2.2.8. Generalidades de la homeopatía

El fundador de la filosofía medica homeopática fue el médico alemán Samuel Hahneman quien en 1796 afirmo “*si la ley de la medicina se reconoce y proclama como real y verdadera y natural ella deberá encontrar su aplicación tanto en animales así como también en el hombre*”. La aplicación de la homeopatía en animales nace con Hahnemann, al aplicar él mismo su novedoso tratamiento en su caballo. Pero quien formalmente aplicó este principio en animales fue Ernest Rucker. En 1833 el veterinario alemán Guillaume Lux publicó en un periódico de Leipzig un primer artículo de homeopatía veterinaria en el que cita: “*existe una patología, una materia médica y una sola medicina para todos los seres vivos*” (Silva, 2008).

La importancia de la homeopatía tuvo su auge con el trabajo a nivel científico durante el empirismo, su método científico va de lo general a lo particular, enuncia que la salud es un proceso dinámico resultante entre la interacción del organismo y el medio externo, los síntomas valorables en la enfermedad son los propios de cada enfermo. Paracelso fue un personaje muy renombrado del pensamiento empirista. En su época arremete contra la práctica médica de su época y plantea la necesidad de regresar al uso de la naturaleza, de acuerdo a Sócrates, resaltando su poder curativo. En su tiempo expresa que el éxito de las medicinas que van a curar un proceso se encuentra en la misma naturaleza. Establece varias teorías, una de éstas, la de “las signaturas”, donde busca una relación formal o conceptual entre la enfermedad y el remedio por la similitud entre ellos (Ballester *et al.*, 1999).

2.2.9. Principios fundamentales de la homeopatía

La Homeopatía es un sistema terapéutico que consiste en administrar sustancias en dosis infinitesimales y que, en un sujeto sano, producirá los mismos síntomas que en la enfermedad que se va a tratar. Cada tratamiento exige una *individualización* meticulosa, basadas en las patogenesias (Ballester *et al.*, 1999).

La práctica homeopática consiste en buscar los puntos de contacto resistentes entre los síntomas que experimentalmente produce un remedio y los síntomas que presenta el enfermo. El principio de la similitud enuncia que las enfermedades pueden ser curadas por sustancias capaces de provocar una afección o síntoma similar. Hahnemann expone este principio de una forma clara y sencilla; el medicamento más eficaz en cada caso concreto, será el más similar aquel cuyos síntomas sean más similares a la enfermedad a tratar (Silva, 2008).

Desde el inicio de la homeopatía, el empleo de dosis débiles ha suscitado controversia y rechazo por parte de la medicina clásica. La utilización de dosis débiles, es una vez más, el producto de variadas y repetidas experiencias, una observación extraída de la práctica, según Hahnemann *“No es en virtud de una opinión preconcebida, ni por amor a la singularidad, por lo que me decidí en favor de las dosis débiles, he llegado a ella por observaciones y me han demostrado que muchos medicamentos actúan con más intensidad de la necesaria para lograr la curación, así las he disminuido y como he observado por siempre los mismos efectos aunque en un grado menor he descendido hasta las dosis más mínimas”* (Silva, 2008)

2.2.10. Principios básicos de la homeopatía

La homeopatía es un sistema terapéutico donde se le aplica a un individuo enfermo un remedio en dosis infinitesimales, produciéndole tanto a un sujeto sano como al enfermo, la misma sintomatología que la enfermedad en cuestión. El

organismo enfermo reacciona mediante la aplicación de la Ley de semejanza. La Ley de semejanza menciona que “*Toda remedio produce en un individuo sano y sensible a este un conjunto de síntomas que se caracterizan de dicha sustancia*”. También, “*Todo individuo enfermo presenta un conjunto de síntomas que caracterizan su enfermedad*”. La homeopatía se basa en la individualización de cada enfermo y no de la enfermedad, ya que la enfermedad, la cual se basa en las patogénesias. Además las dosis de la sustancia activa son infinitesimales o microdosis. 1) El proceso de curación avanza desde las partes más profundas del organismo (mental, emocionales y órganos vitales) hacia las externas, como la piel y las extremidades. 2) La curación progresa en orden inverso a su aparición original (visible en enfermedades crónicas). 3) La curación evoluciona desde la parte superior del cuerpo hacia la inferior. Estas leyes son de inestimable valor para el pronóstico y se puede confirmar a diario en los enfermos. (Ballester *et al.*, 1999).

2.2.11. Patogénesis

Se le llama patogénesis al inicio, desarrollo y finalización de una enfermedad, según a determinados criterios y síntomas obtenidos por enfermedad, intoxicación o experimentación, de algunas sustancias homeopáticas aplicadas en individuos sanos, a dosis infinitesimales o a dosis tóxicas y confirmación de curación clínica (Ballester *et al.*, 1999). Es el principio de la experimentación pura o el conjunto de signos y síntomas que se producen en una persona sana y sensible en el curso de la experimentación, al darle una sustancia medicamentosa.

2.2.12. Acción del medicamento homeopático

La acción curativa de los remedios no depende de su acción fisiológica sino de su naturaleza dinámica. Cada remedio administrado aun en individuos sanos, desarrolla dos efectos (Silva, 2008).

Este efecto dual o bifásico depende de la cantidad de sustancia empleada y cada agente fisicoquímico provoca en el individuo sano o enfermo de acuerdo con la mayor cantidad de sustancias administrada de los efectos compuestos activos y reaccionales, la acción fisiológica de los medicamentos es siempre de naturaleza toxica e injuriosa para el paciente mientras la cura, homeopáticamente hablando, se cumple desde el plano dinámico y es siempre suave y sin sufrimientos, aunque provoque una ligera agravación de los síntomas latentes en el enfermo al inicio de su administración, si esto sucede se puede tener una gran seguridad de que estén curados definitivamente (Silva, 2008).

2.2.13. Campo de acción de la homeopatía y sus límites

La homeopatía puede curar a todos aquellos individuos que disponen de capacidades vitales defensivas inmunitarias, hormonales, neurológicas, psíquicas, entre otras, lo que causa que no cure instantáneamente por que requiere un estímulo el cual lo provoca el medicamento bien seleccionado, sería inútil en procesos como cirugías y reacciones instantáneas de emergencias por eso se enumeran algunas situaciones en las que el tratamiento homeopático tiene menores posibilidades; afecciones de indicaciones quirúrgicas impostergables (apendicitis aguda, peritonitis, cuerpos extraños, etc.), pacientes con cuidados intensivos (choque, deshidratación, sepsis, cardiopatías agudas), enfoques psiquiátricos (psicóticos o neuróticos graves, crónicos o en procesos de agudización), inmunodepresión grave (tumores o afectados con tratamientos de inmunosupresión), lesiones irreversibles orgánica o funcionales considerables (Silva, 2008).

2.3. Paracetamol

2.3.1. Generalidades del Paracetamol

El paracetamol (N acetyl *p* aminophenol APAP) es un analgésico antipirético, disponible en farmacias. El fármaco, sin embargo, es tóxico en altas dosis y una

sobredosis puede causar necrosis hepática (Knigth *et al.*, 2003). El APAP se metaboliza en el hígado para formar sulfatos solubles y glucurónidos. Una pequeña cantidad se convierte, en el sistema de enzimas microsomal de citocromo P450, en un metabolito reactivo de N acetil *p* benzoquinona-amina (NAPQI) a dosis bajas, la cantidad de NAPQI formada consigue un conjugado con la glutatión hepática reducida (GSH) almacenada, antes de ser eliminada (Dahlin *et al.*, 1984). En caso de una sobredosis de APAP o en condiciones cuando el GSH hepático almacenado se agota, NAPQI reacciona con las proteínas celulares que causan el estrés oxidativo, daño de la membrana microsomal y muerte (Knigth *et al.*, 2003).

Es muy seguro como antipirético, no obstante, su uso en altas dosis puede llevar a importante morbilidad. La sobredosis del paracetamol es una de las causas más frecuentes de toxicidad en el mundo y es la primera causa de intoxicación farmacológica en niños, principalmente menores de cinco años, se puede producir necrosis de los hepatocitos, por lo cual se considera, también, la primera causa de falla hepática aguda en pediatría, pero el retraso en la presentación al servicio de urgencias y al inicio del tratamiento incrementa de forma importante el riesgo de lesión hepatocelular clínicamente significativa (González-Mendoza y Vicuña-Fernández, 2003).

2.3.2. Epidemiología

El acetaminofén es el agente farmacéutico más investigado en los centros de intoxicación de Estados Unidos (González *et al.* 2003) El primer caso reportado de hepatotoxicidad por paracetamol fue en el año de 1966 en Inglaterra. La sobredosis con paracetamol es la causa más frecuente de insuficiencia hepática aguda (40%), seguida de las reacciones idiosincráticas (12%), desplazando a las de origen viral. En el año 2003 en Estados Unidos las estadísticas reportadas por la Asociación Americana de Centros de Control de Intoxicaciones, presentan una cifra de aproximadamente 127,000 intoxicaciones por acetaminofén o productos

que lo contienen, de las cuales 38,989 ocurrieron en niños menores de seis años (Watson *et al.*, 2003). En este mismo año se reportaron 214 muertes por sobredosis de medicamentos analgésicos, en 62 de estos casos, el acetaminofén fue el único agente involucrado. Estas estadísticas se incrementaron en el 2005, año en el que se reportaron 165,000 casos nuevos, de los cuales un 40% se presentó por ingesta de acetaminofén solo y un 60% por el consumo de mezclas de acetaminofén con otros fármacos, especialmente opioides. La toxicidad por acetaminofén representa la mayor causa de falla hepática fulminante (Ostapowicz *et al.*, 2002) y se observó un incremento alarmante del 21% al 51% de este daño hepático entre los años 1988 y 2003; más de la mitad de estos casos se presentaron por sobredosis accidentales. La sobredosis de paracetamol en casos graves puede resultar en falla hepática aguda y muerte, aunque estas consecuencias no son frecuentes. La sobredosis de paracetamol es la principal causa de falla hepática aguda reportada en Estados Unidos. Está involucrado en el 50% de los casos de falla hepática en adultos y en el 13% en niños (Roldán *et al.* 2012).

2.3.3. Farmacología y fisiología

El Paracetamol es un metabolito activo de la fenacetina, analgésico derivado de la anilina tiene una excelente biodisponibilidad, su pico de concentración plasmática se presenta después de 30 a 60 minutos de su administración vía oral y su vida media es de dos horas (Mancipe *et al.*, 2010). Se distribuye uniforme en líquidos corporales, a diferencia de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) presenta una acción antiinflamatoria débil que inhibe probablemente a la ciclooxigenasa (COX) principalmente en el sistema nervioso central y no interactúa en la activación de los neutrófilos (Sisamon, 2003).

El paracetamol durante el metabolismo hepático, se conjuga con ácido glucurónico (60%), ácido sulfúrico (35%) o cisteína (3%); una pequeña proporción del fármaco presenta N-hidroxilación por el citocromo P450 hasta formar N-acetil-p-

benzoquinoneimina (NAPQI), un metabolito potencialmente tóxico, que en condiciones normales es detoxificado mediante conjugación con la enzima glutatión peroxidasa y grupos sulfhídricos (Brunton *et al.*, 2009).

En dosis terapéuticas el acetaminofén suele ser bien tolerado, ocasionalmente surgen erupciones cutáneas (urticaria, eritema); rara vez se asocia con fiebre medicamentosa, metahemoglobina, y hay reportes aislados de neutropenia, y pancitopenia, puede producir déficit de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (Sisamon, 2003).

2.3.4. Hepatotoxicidad

Las drogas que inducen daño hepático pueden presentar consecuencias de reacciones idiosincráticas, alérgicas, autoinmunes o dependientes de dosis. Por otro lado los patrones de lesión pueden diferir entre necrosis hepatocelular, colestasis, fibrosis y esteatosis, así como efectos tóxicos dependientes de la dosis, causando necrosis de los hepatocitos predominantemente en la región centrilobulillar del lobulillo hepático por distintos mecanismos y patrones de lesión (Sisamon, 2003).

Sustancias como los xenobióticos son metabolizadas en el hígado, por ejemplo el acetaminofén o paracetamol, éste medicamento se conjuga mayormente con el ácido glucorónico y también en pequeñas cantidades con la glutatión peroxidasa y se excreta por la bilis. Por lo tanto, un exceso de paracetamol sobrecarga ambas vías y produce un metabolito tóxico denominado NAPQI (Nacetil-p-benzoquinonemina), éste se acumula en el citoplasma del hepatocito fijándose por enlace covalente a aminoácidos de enzimas y otras proteínas hepáticas, de tal manera que las inactiva. Este mecanismo produce lesiones hepáticas caracterizadas con necrosis centrolobulillar (Munné *et al.*, 2003), lo cual altera la función de los riñones y del corazón produciendo insuficiencia renal y miocárdica respectivamente. La toxicidad produce una degeneración lipídica asociada a la

alteración de mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso, asociado a necrosis hepatocelular (Muñón *et al.*, 2007).

La Asociación Americana de Centros de Control de Intoxicaciones reporta aproximadamente 127,000 exposiciones anuales al paracetamol. Se presentan alrededor de 200 muertes relacionadas con sobredosis, en las que los agentes analgésicos han sido los responsables. En 30% de los casos, el paracetamol se encontró como agente único y estaba implicado en 40% de los casos como causa de falla hepática fulminante (Roldan y López, 2012).

El paracetamol, junto con el ácido acetil salicílico (aspirina), es uno de los analgésicos más utilizados mundialmente, especialmente después de recibir aprobación por parte de la Agencia de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (Food and Drug Administration-FDA) en el año de 1953. Es un reconocido representante de la familia de los AINES (analgésicos, antiinflamatorios de tipo no esteroidal), sin embargo su utilidad terapéutica no está limitada a su efecto analgésico y antiinflamatorio, ya que también posee un reconocido efecto antipirético (Vázquez-Frías *et al.*, 2013).

2.3.5. Manifestaciones clínicas

La toxicidad por paracetamol suele expresarse por medio de 4 etapas:

1. Durante las primeras 24 horas el paciente se encuentra asintomático o con síntomas inespecíficos como malestar general, náuseas, dolor abdominal, vómitos, sudoración; es el período de toxicidad potencial.
2. Entre las 24 y 72 hrs el dolor puede localizarse en hipocondrio derecho y típicamente comienzan a elevarse las transaminasas hepática.
3. Alrededor del tercero o cuarto día es cuando se produce el máximo daño hepático, pudiendo presentarse diátesis hemorrágica, encefalopatía, convulsiones, hipoglucemia, mostrando valores de transaminasas extremadamente elevados

(fueron reportados valores mayores de 30.000 UI/l) y marcadores de insuficiencia hepática. La insuficiencia hepática aguda se desarrolla en este período, y se caracteriza por encefalopatía y deterioro severo de la función hepática en pacientes sin hepatopatía crónica. Esta entidad es potencialmente reversible.

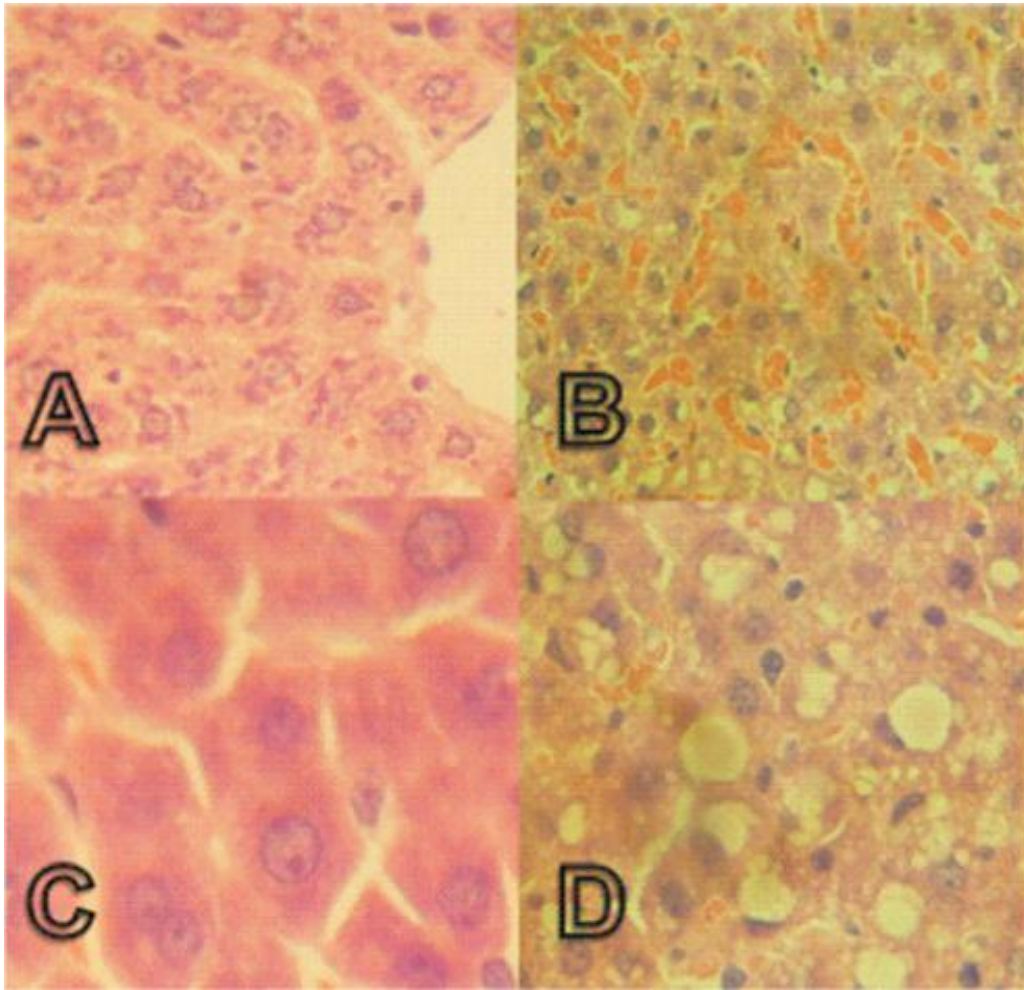


Figura 2. Lesiones observadas por intoxicación con paracetamol. A) Hepatocitos delimitados. Espacios sinusoidales permeables; B) Hiperemia en los espacios intersinusoidales; C) Espacios sinusoidales permeables. Arquitectura del hepatocito intacta; D) Hepatocitos con degeneración grasa con patrón vacuolar (Ochoa *et al.*, 2008).

4. Los que sobreviven hasta este período comienzan la recuperación clínica y el descenso de los niveles enzimáticos. El proceso se puede prolongar por tres semanas o más.

5. De los 4 días a 2 semanas si sobreviven a la etapa anterior entran en recuperación , cuya duración depende de la gravedad de la alteración, por otra parte, si el daño ha sido extenso se pueden presentar complicaciones como sepsis, coagulación intravascular diseminada, insuficiencia renal (también mediada por NAPQI), infarto agudo de miocardio y hemólisis (Sisamon, 2003).

III. JUSTIFICACION

Considerando que el paracetamol en grandes dosis produce daño hepático y que la *Silimarina* actúa como protector hepático, la finalidad de la presente investigación es obtener información científica que avale el uso de dosis homeopáticas de la planta *Silybum marianum*, De esta manera se podrá contribuir con un antecedente de estudio histopatológico que recaude información detallada y ayude al conocimiento médico-científico homeopático.

IV. HIPOTESIS

La planta *Silybum marianum* utilizada en homeopatía 6c, protege a los hepatocitos contra los daños provocados por la intoxicación experimental con paracetamol en ratas.

V. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la eficacia de la planta *Silybum marianum* en hígado de ratas intoxicadas experimentalmente con paracetamol.

Objetivos Específicos

Inocular experimentalmente ratas con una sobredosis de paracetamol y evaluar histológicamente las alteraciones de los hepatocitos.

Aplicar un tratamiento con *Silybum marianum* en rata intoxicadas con paracetamol y comparar histológicamente los daños hepáticos con los de ratas intoxicadas y no tratadas.

VI. MATERIAL Y METODOS

Marco de referencia. La investigación se llevó a cabo en el lugar con las coordenadas 25° 33' 04" N 103° 26. 56' 06" ubicado en... en el municipio de Torreón, Coah.

Se trabajó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), aceptando que el uso de animales de investigación, solo se justifica para la enseñanza, prueba y el desarrollo del conocimiento en beneficio de los seres humanos y/o de los propios animales. Se buscó cuidar siempre el bienestar general del animal y evitar en lo posible el dolor y el sufrimiento. El proyecto tubo una duración de 15 días

Animales de laboratorio. Se utilizaron 27 ratas blancas de variedad Wistar de una misma cepa con buen estado clínico de salud. Las ratas fueron provenientes del bioeterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Juárez del Estado de Durango. Todas se alimentaron y manejaron de manera similar, sin distinción por ninguna. La edad que el bioterio registró de cada animal fue de entre 2 a 3 meses de edad. Se utilizaron 13 machos y 14 hembras, con un peso inicial que osciló entre 160 y 270 g hembras y 220 y 340 g machos.

Los animales se trasladaron a la ubicación con las coordenadas 25° 33' 04" N 103° 26. 56' 06" para ser utilizados en el experimento. Se realizó limpieza y desinfección del lugar, a partir de ese momento a los roedores se les mantuvo con agua potable y alimento comercial (Conejina y Harlan) a libre acceso. Para evitar cualquier descompensación se le administró el mismo alimento que tenían en el bioterio de la UJED.

Grupos experimentales. Se utilizaron 12 jaulas con una medida de 40 X 30 X 40 cm cada una, y se guardaron 2 a 3 ratas por jaula, en una cama de aserrín. Se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos con 9 ratas cada uno, 5 hembras y 4

machos cada uno con un total de 27 ratas. Se aplicaron tres tratamientos de la siguiente forma: **Grupo A.** Grupo control sin tratamiento. Se les administró agua y alimento a libre acceso. **Grupo B.** Grupo paracetamol; se administró únicamente este fármaco por vía oral en una dosis de 20 mg/Kg de peso corporal, cada 24 horas durante 5 días, más agua y alimento a libre acceso. **Grupo C (P/Cm).** Grupo de *Carduus marianus* Se administró Cm 6c a razón de 4 mL en 140 mL de agua de bebida, cada 24 horas durante 5 días, más paracetamol 20 mg/Kg de peso corporal, cada 24 horas durante 5 días por vía oral. se aplicó Cm 6c, 4 mL en 140 mL de agua de bebida, cada 24 horas durante 5 días, sin paracetamol.

Se realizaron observaciones clínicas diarias para verificar su estado de salud, y se midió el peso. Se les administró agua potable y alimento 2 veces al día, en un horario a las 8:00 y a las 19:00 horas. Se les realizó el cambio de la cama de aserrín cada tercer día con limpieza general de las jaulas utilizando jabones neutros y cloro.

Preparación de los inóculos. Se elaboró una suspensión de agua bidestilada y paracetamol (tabletas de 500 mg) para su administración a cada animal proporcionalmente a su peso, utilizando una jeringa de 1 mL (para insulina) vía oral cada 24 horas.

El *Carduus marianus* 6c se adquirió en el Laboratorio Homeopático de Investigación, S.A, (LAHISA) de Durango, Dgo. En presentación líquida, en frascos de 30 mL.

Eutanasia de las ratas y toma de muestras. Al término de los 10 días las ratas se prepararon manteniéndolas en ayuno para su posterior eutanasia, la cual se realizó con cloroformo en campana de vidrio. Ya anestesiadas se procedió a abrirlas por la parte torácica en la línea media del animal desde el cuello hasta el diafragma, con una hoja de bisturí, ya abiertas se extrajeron 3 mL de sangre por punción cardíaca, en cada una de las ratas, con una jeringa de 5 mL,

conservándola en un tubo al alto vacío sin conservadores ni anticoagulantes. Se separó el plasma por sedimentación y se conservó en refrigeración para posteriores estudios enzimáticos (estudio no realizado en éste experimento). Al término de la toma de muestras sanguíneas se practicó eutanasia a las ratas, con sobredosis de cloroformo.

Se extrajo el hígado de las ratas el cual se pesó y posteriormente se colocó en formalina al 10% amortiguada con fosfatos a pH 7.4. Los hígados se procesaron en el Laboratorio de Patología de la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, para el estudio histopatológico (Anexos 1 y 2).

Análisis Estadístico. Los datos se expresan como porcentaje. La significativa estadística se calculó comparando los grupos A con B, A con C y B con C mediante la prueba de X^2 . Se consideraron valores significativos de $p < 0.05$. Apoyo..

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

Se evaluaron las características histológicas de los hígados considerando las siguientes alteraciones: Disociación de cordones hepáticos, anisocariosis, células binucleadas, infiltración linfocitaria, citoplasma vacuolado de hepatocitos, y necrosis. Se describió el grado de alteración, tomando 4 valores de referencia numérica de 0 a 3, donde 0 es sin alteración, 1 leve, 2 moderado, y 3 severo. En el Cuadro 1 se aprecian los porcentajes de las alteraciones de los hígados de los tres grupos.

Cuadro 1. Porcentaje de alteraciones histológicas en hígado de los tres grupos, de acuerdo a su grado de lesión

Característica Histológica	Grupos/ % de Grados de alteración (n = 9, en cada grupo)											
	Grupo A				Grupo B				Grupo C			
	(-)	L	M	S	(-)	L	M	S	(-)	L	M	S
Disociación	66.6	33.3	0	0	22.2	22.2	44.4	11.1	0	44.4	44.4	11.1
Anisocariosis	0	55.5	44.4	0	0	0	100	0	0	55.5	44.4	0
Binucleación	0	55.5	44.4	0	0	0	100	0	0	66.6	33.3	0
Inf. Linfocitaria	77.7	22.2	0	0	22.2	77.7	0	0	88.8	11.1	0	0
Vacuolización	22.2	77.7	0	0	33.3	66.6	0	0	100	0	0	0
Necrosis	100	0	0	0	0	88.8	11.1	0	55.5	44.4	0	0

(-) = Sin Alteración; L = Grado leve; M = Grado moderado; S = Grado severo

La disociación de cordones hepáticos se observó en el Grupo A en un 33.3% con grado leve; en el Grupo B se encontró 22.2% con grado leve, 44.4% con grado moderado y 11.1% con grado severo; en el Grupo C se apreció 44.4% con grado leve, 44.4% con grado moderado y 11.1% con grado severo. Se aprecia una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el grupo control y el grupo de intoxicación con paracetamol pero no con el grupo P/Cm (Figura 3).

La aniscariosis en el Grupo A mostró 55.5% de grado leve y 44.4% de grado moderado; en el Grupo B presentó el 100% con grado moderado y el Grupo C

presentó 55.5% con grado leve y 44.4% con grado moderado. No hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) en esta lesión entre ninguno de los tres grupos (Figura 4).

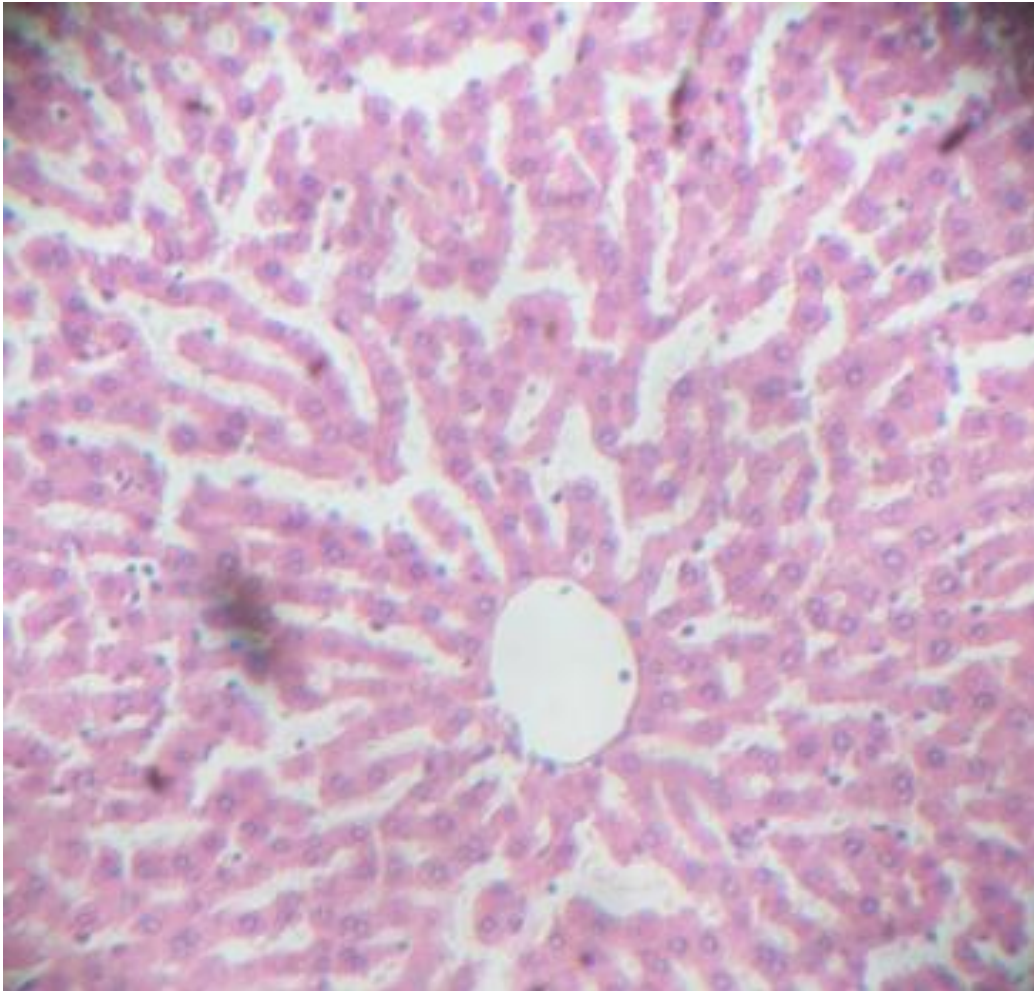


Figura 3. Disociación de cordones hepáticos en ratas intoxicadas experimentalmente con paracetamol.

Las células binucleadas en el Grupo A se apreciaron en 55.5% en grado leve y 44.4% en grado moderado, al igual que la anisocariosis; en el grupo B se observó en grado moderado en el 100% de las muestras; en el Grupo C se observó un 66.6% con grado leve y 33.3% con grado moderado. Tampoco hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) en esta lesión entre ninguno de los tres grupos (Figura 5).

Las tres alteración descritas previamente son frecuentes en cualquier tipo de daño hepático, ya sea degenerativo, inflamatorio o necrótico (López, 2004; Núñez y

Bouda, 2007; Willard, 2007). La importancia en esta investigación es que la disociación de los cordones hepáticos muestra una diferencia muy marcada entre el grupo control contra el grupo intoxicado con Paracetamol, así como con el grupo control y el grupo P/Cm, esto nos indica un proceso de regeneración activa en éste último grupo.

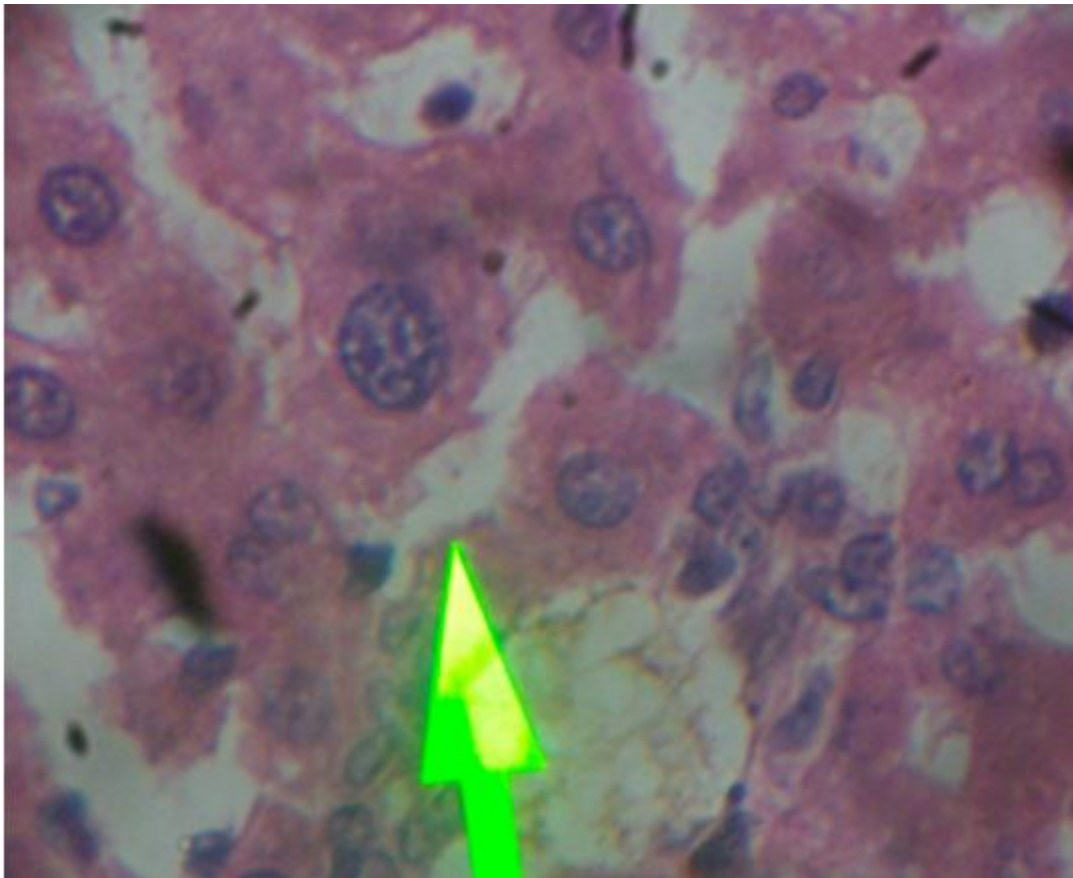


Figura 4. Anisocariosis (núcleos de diferentes tamaños) de hepatocitos en ratas intoxicadas experimentalmente con paracetamol.

La alteración inflamatoria con infiltración por linfocitos se observó en el Grupo A en el 22.2% en grado leve; en el Grupo B en el 77.7% en grado leve; y en el Grupo C con 11.1% en grado leve. Se aprecia una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el Grupo B con los grupos A (control) y C (P/Cm). Con respecto al grupo control y al grupo intoxicado con Paracetamol, se explicaría por el hecho de que un tóxico es capaz de producir necrosis y una reacción linfocitaria y plasmocitaria inespecífica

como respuesta a dicha lesión (Arellano-Montero *et al.*, 2011), y es posible que esté disminuida por la acción del *Cm* (Figura 6).

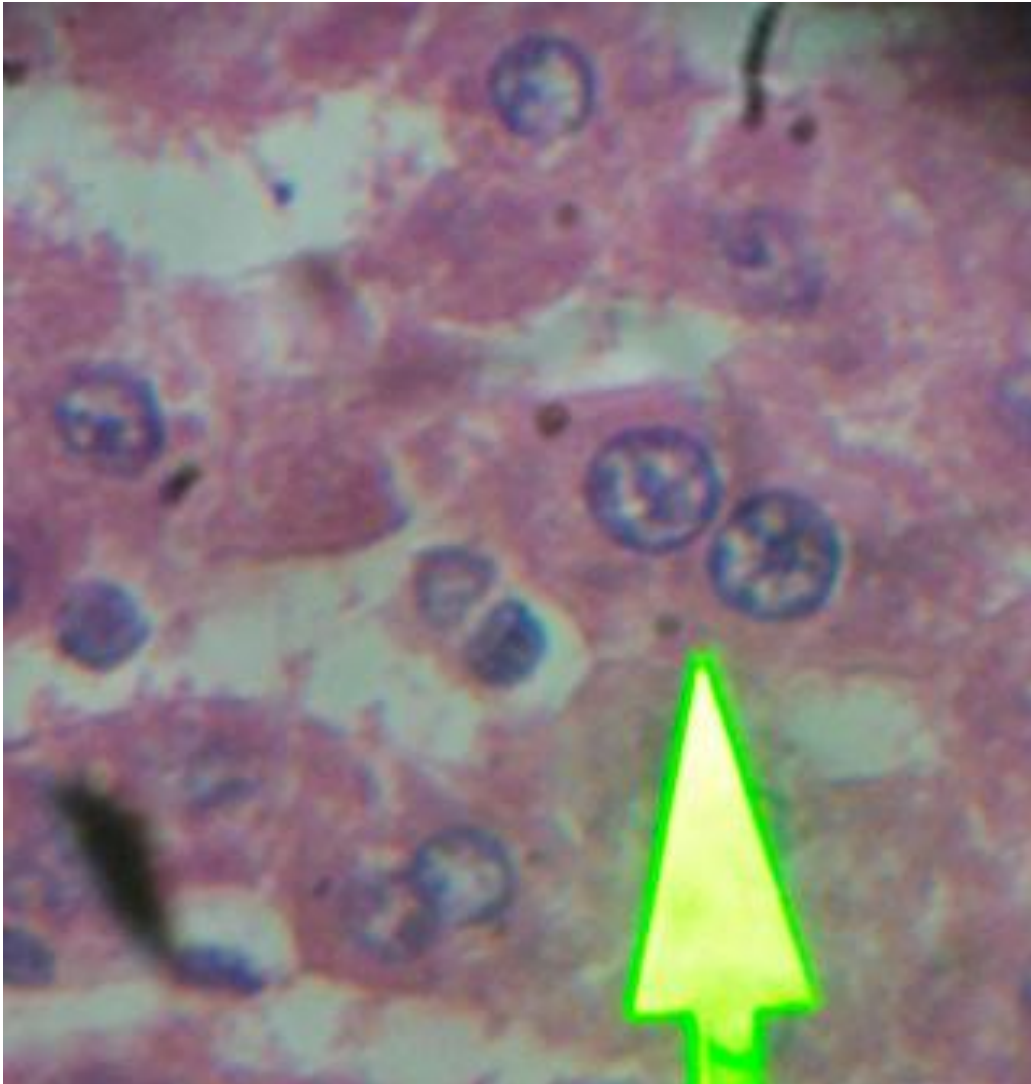


Figura 5. Hepatocitos binucleados en ratas intoxicadas experimentalmente con paracetamol.

La vacuolización se encontró en el Grupo A en el 77.7% en grado leve; en el Grupo B en el 66.6% en grado leve; y en el Grupo C en 11.1%. En este caso no hay diferencia significativa entre el grupo control y el grupo Paracetamol, y no podemos saber porque ocurrió ésta alteración en el grupo control, habrá que revisar otras variables que puedan influir con estos cambios debido a la ingestión de sustancias tóxicas en agua y alimentos. Sin embargo, si hay una diferencia

significativa ($P < 0.05$) muy evidente con respecto al grupo P/Cm, ya que la lipidosis hepática bajó considerablemente (Figura 7).

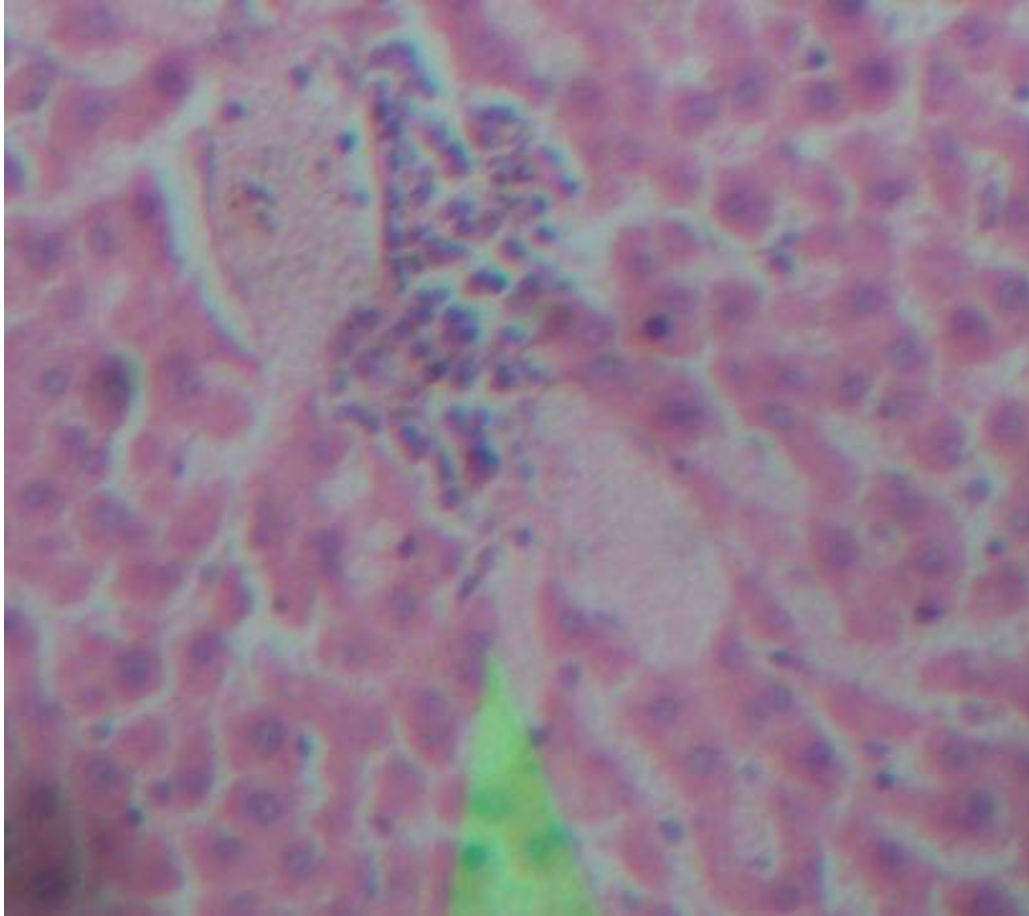


Figura 6. Infiltración linfocitaria focal periportal en ratas intoxicadas experimentalmente con paracetamol.

Con respecto a la necrosis, en el Grupo A no se observó; en el Grupo B hubo 88.8% de necrosis leve y 11.1% de necrosis moderada; y en el grupo C solo se observó necrosis en grado leve en el 44.4%. También hubo una diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto a ésta alteración del Grupo B, tanto con el Grupo A como con el Grupo C (Figura 8).

Ambas lesiones, la necrosis como la lipidosis hepática, son características de la intoxicación por paracetamol (Ochoa *et al.*, 2008).

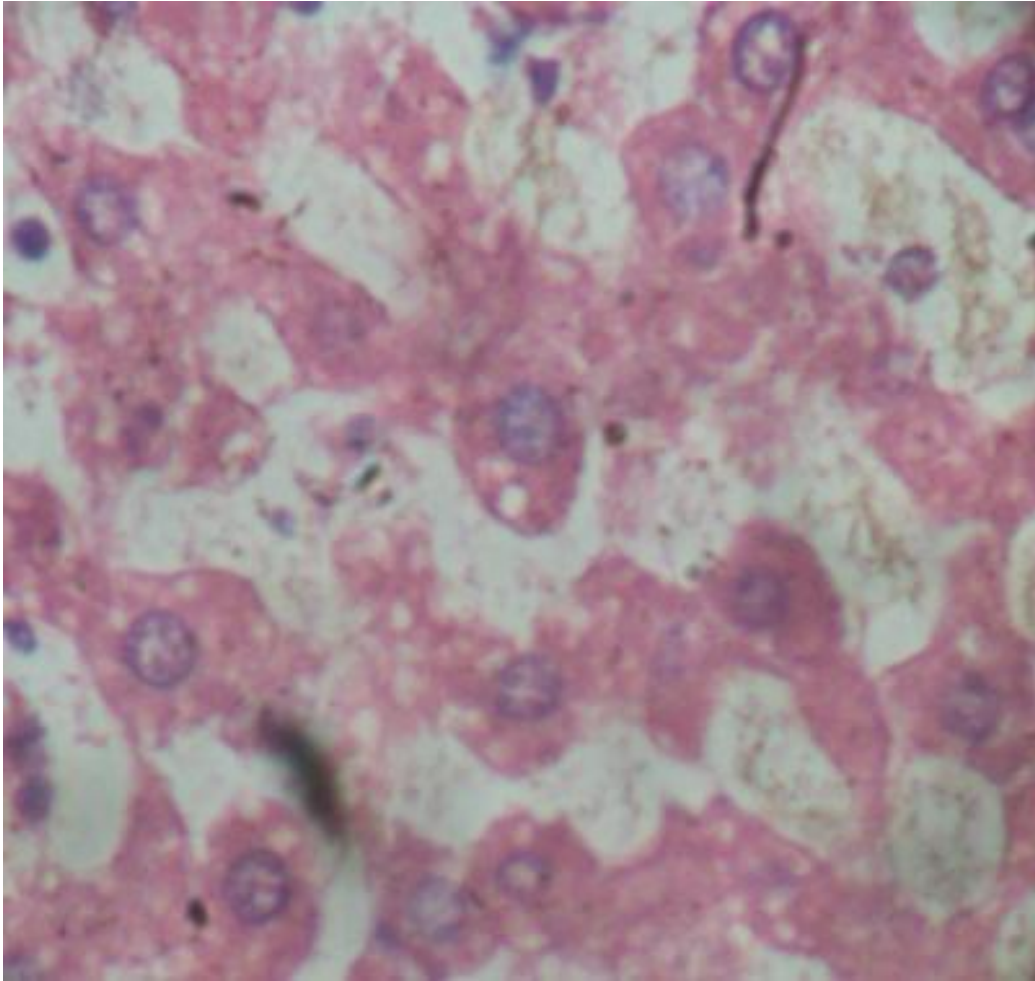


Figura 7. Vacuolización de citoplasma de hepatocitos en ratas intoxicadas experimentalmente con paracetamol.

El acetaminofén o paracetamol utiliza la vía de conjugación con glucoronato (95%) y la conjugación con glutatión para su excreción (5%). Cuando hay un exceso de paracetamol, ambas vías se sobresaturan produciéndose en exceso el metabolito NAPQ1 (N-acetil-p-benzoquinonemina), de ésta manera desencadena lesiones hepáticas con necrosis centrilobulillar (Munné *et al.*, 2003). El paracetamol también produce lipidosis hepática caracterizada con vacuolización del citoplasma y necrosis hepatocelular (Muñón *et al.*, 2007). La intoxicación aguda con paracetamol puede simular un cuadro de hígado graso alcohólico o de esteatohepatitis no alcohólica (Soza *et al.*, 2004).

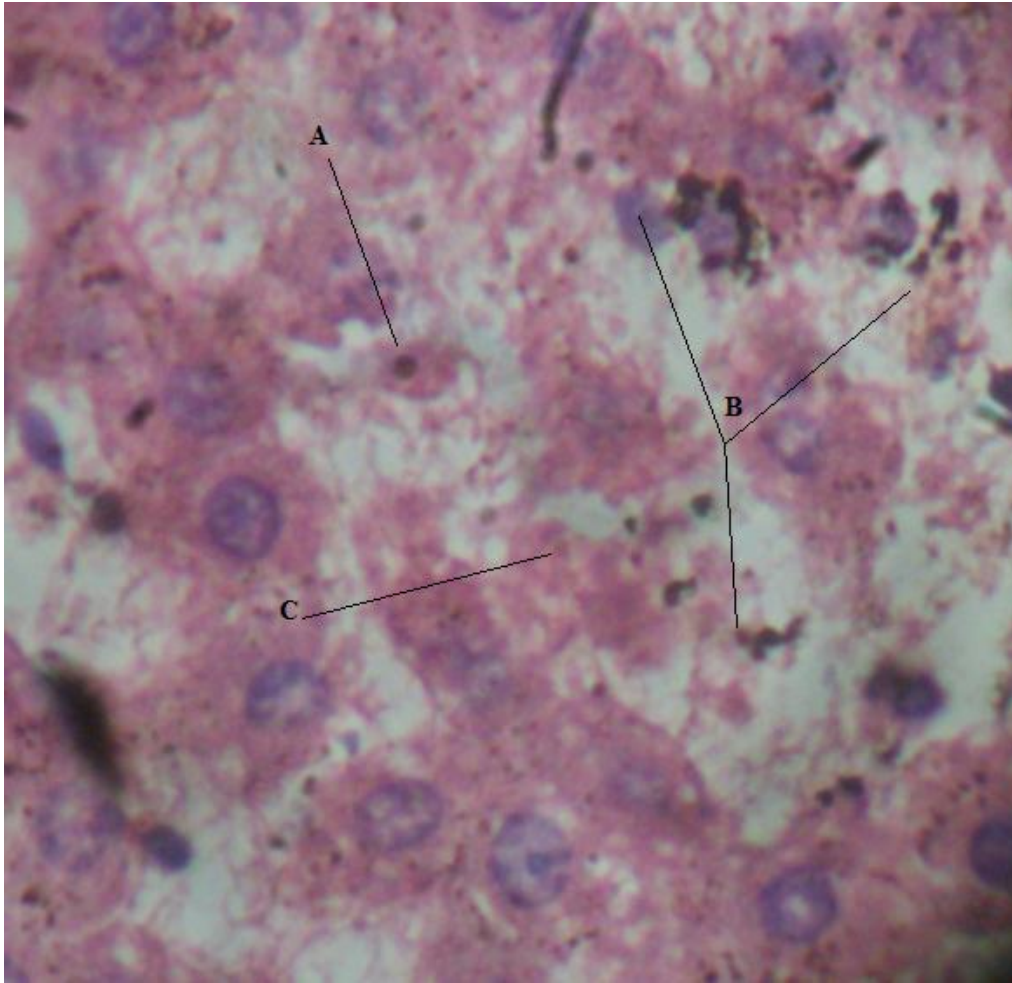


Figura 8. Necrosis de hepatocitos en ratas intoxicadas experimentalmente con acetamol. Se aprecian A) núcleos picnóticos, B) detritos celulares, y C) hepatocitos sin núcleo.

En base nuestros resultados, el *Cm* homeopático si protege contra la hepatotoxicidad producida por el paracetamol en ratas intoxicadas experimentalmente. Su eficacia ha sido demostrada ampliamente ya que se utiliza como suplemento dietético (Malewicz *et al.*, 2006), para tratar los trastornos hepáticos y biliares caracterizados por necrosis, degeneración y deterioro funcional (Luper, 1998), además para la desintoxicación y limpieza hepática.

Además es bien conocido que los extractos de *Cm*, tienen un potencial anticarcinogénico ya que se ha utilizado contra el cáncer en el carcinoma de próstata humano (Davis-Searles *et al.*, 2005). El mecanismo de protección en los

diferentes tejidos es que actúa como un antioxidante mejorando la producción de la *superóxido dismutasa*, que desintoxica de los radicales libres, además aumenta la síntesis de proteínas ribosomales coadyuvando en la regeneración hepática (Misar *et al.*, 2013), y modula las células T en la inflamación (Post-White *et al.*, 2007).

El análisis histopatológico es una herramienta muy útil para establecer las características de daño de un tóxico y la acción curativa de un medicamento. Se debe realizar inicialmente el examen histopatológico del hígado de animales sanos para identificar la arquitectura normal (El Mesallamy *et al.*, 2011).

Se han reportado diversos estudios histopatológicos en ratas y ratones, donde se analizan las alteraciones microscópicas del hígado producidas por sobredosis de diferentes tóxicos, incluyendo el paracetamol. Primeramente se analizan los patrones de la morfología tisular y celular del hígado normal de ratas y posteriormente las principales evidencias de daño tisular incluyendo degeneración grasa, congestión de la vena centrolobulillar; necrosis pericentrolobulillar y congestión de los sinusoides hepáticos (Selema y Martínez, 1999). Otros estudios reportan inflamación caracterizada por venas centrolobulillares congestivas y congestión sinusoidal, vacuolización de hepatocitos, núcleos hiper cromáticos, disminución de la relación del tamaño núcleo/citoplasma (anisocariosis) aumento de células apoptóticas y necrosis pericentrolobulillares (Ochoa *et al.*, 2008).

Con respecto a nuestro estudio histopatológico, se observó mejoría en las características de los grupos tratados con *Cm* con el grupo control. Nosotros analizamos la disociación de los cordones hepáticos como una alteración inespecífica de daño tisular, observándose una diferencia muy marcada entre el grupo control y el grupo intoxicado con paracetamol. Además se encontró una importante mejoría entre el grupo intoxicado con paracetamol y el grupo tratado *P/Cm*. Estudios similares en ratas intoxicadas con paracetamol, al aplicar un

medicamento regenerador hepático (*Peumus boldus*), se observó una mejoría en la arquitectura y conservación hepatocelular (Ochoa *et al.*, 2008).

En ratas intoxicadas con un compuesto nitroso N-nitrosodietilamina (NDEA) muestran apoptosis de los hepatocitos, mitosis, megalocitosis, citoplasma espumoso y núcleos hipercromáticos El hígado de ratas pretratadas con *Cm* se observa restaurado en su arquitectura hepática normal con menos disociación y degeneración de los hepatocitos, anisonucleosis y vesiculación nuclear mínima en comparación con el grupo tratado con NDEA. Mientras tanto, las secciones de hígado de ratas postratadas con la silimarina revelaron ligera mejora en los hepatocitos en comparación con el grupo tratado con NDEA. Secciones de hígado de ratas postratadas con silimarina revelaron menor grado de hepatocitos citomegálicos y vacuolados con vesiculación nuclear mínima y prominencia nuclear en comparación con los animales inducidos con Carcinoma Hepatocelular (El Mesallamy *et al.*, 2011).

Una potente toxina producida por cianobacterias, la microcistina, es conocido que produce hepatotoxicidad exhibiendo disociación de cordones hepáticos y hepatocitos individuales, daño centrilobulillar con necrosis midzonal, y sinusoides dilatados. En animales pretratados con silimarina y posteriormente inoculados con microcistina, no se aprecian alteraciones significativas comparadas con un grupo control sin microcistina (Mereish *et al.*, 1991).

La toxicidad hepática inducida por tetracloruro de carbono (CCl₄) produce inflamación, necrosis, cambio graso, hemorragia y dilatación sinusoidal en ratas. En un estudio se analizaron ratas sanas con histopatología hepática normal. En un grupo de control tóxico las ratas mostraron grandes hepatocitos rodeados por células inflamatorias mononucleares, necrosis de la pared de la vena central y dilatación sinusoidal en la zona centrolobulillar. En un grupo tratado con silimarina el hígado mostró dilatación sinusoidal alrededor de la vena central, pero no inflamación y necrosis. Las ratas tratadas con silimarina mostraron apariencia casi

normal del parénquima del hígado con respecto a la necrosis e inflamación de los hepatocitos (Parveen *et al.*, 2011).

Para investigar la hepatotoxicidad de aflatoxina B₁, y tratamiento hepatoprotector con silimarina, se realizó un estudio en palomas y se analizó por histopatología el hígado. Las aves intoxicadas mostraron infiltración grasa y vacuolización, hiperplasia de conductos biliares, hemorragias, necrosis e inflamación, indicativos de hepatopatía y aflatoxicosis. El *Cm* puede mejorar los efectos tóxicos de las aflatoxinas, cuando se alimenta a las aves con altas concentraciones de la Silimarina, antes de la intoxicación con aflatoxinas. Sin embargo, los cambios en la morbilidad y la función hepática después de la exposición aguda de aflatoxinas puede ser tan grave que el *Cm* en la dieta no es capaz de proteger la arquitectura histológica del hígado (Grizzle *et al.*, 2009).

VIII. CONCLUSIONES

El *Silybum marianum* es un hepatoprotector efectivo utilizado en dosis homeopáticas 6c, en ratas intoxicadas experimentalmente con Paracetamol.

Las alteraciones histológicas ocasionadas por Paracetamol son más marcadas que las lesiones de los grupos no tratados (control) y el grupo con intoxicación con Paracetamol y tratado con *Cm* (P/*Cm*).

Se recomienda un estudio más completo utilizando diferentes dosis y tiempos de intoxicación con paracetamol, incluir dos grupos controles, uno con intoxicación y otro sin intoxicación, además de otros grupos con diferentes dosis y tiempos del tratamiento con *Silybum marianum*.

IX. LITERATURA CITADA

- Abbasi, B.H., Khan, M.A., Mahmood, Ahmad, M., Chaudhary, M.F. y Khan, M.A. (2010).** Shoot regeneration and free-radical scavenging activity in *Silybum marianum* L. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 101(3):371- 376.
- Agarwal, C., Tyagi, A., Kaur, M. y Agarwal R. (2007).** Silibinin inhibits constitutive activation of Stat3, and causes caspase activation and apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells. *Carcinogenesis.* 28(7):1463–1470.
- Ahmad, N., Abbasi, B.H. y Fazal, H. (2013a).** Evaluation of antioxidant activity and its association with plant development in *Silybum Marianum* L. *Ind. Crops Prod.* 49:164-168.
- Ahmad, N., Fazal, H., Abbasi, B.H., Anwar, S. y Basir, A. (2013b).** DPPH Free radical scavenging activity and phenotypic difference in hepatoprotective plant (*Silybum marianum* L.). *Toxicol. Ind. Health.* 29(5):460- 467.
- Alvarado, R.S., Garcia, G. Cespedes, R, Casañas, M. y Rodriguez A. (2012).** Caracterización morfológica e histoquímica del hígado de la baba (Caiman *Crocodylus Crocodylus*). *Rev. Fac. Cs. Vet.* 53(1):13-19.
- Alvarado, R.S. y Castro, L. (2010).** Histology of rat livers treated with a leaf infusion of Fig Plant. *Rev. Fac. Cs. Vet.* 51(2):99-103.
- Arellano-Montero, T.P., Padilla-Arellanes, S., Barajas-López, I.N., Avilés-Torres, N. y Alvarado-Enríquez, N.L.A. (2011).** Diagnóstico y tratamiento de insuficiencia hepática crónica en un perro Schnauzer. XXII Encuentro de investigación veterinaria y producción animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Pp 185-191.
- Ballester, S.A., Sanz, F.M. y Galan, G.E. (1999).** Homeopatía fundamentos científicos. *FMC.* 6(2):71-78.
- Banks, W.J. (1993).** Applied veterinary histology. 3rd Edition. Mosby Inc. St. Louis, Missouri, USA.
- Basiglio, C.L., Sánchez Pozzi, E.J., Mottino A.D. y Roma, M.G. (2009).** Differential effects of silymarin and its active component silibinin on plasma membrane stability and hepatocellular lysis. *Chemi. Biol. Interact.* 179(2-3):297-303.
- Bonifaz, V., Shan, Y., Lambrecht, R., Donohue, S.E., Moschenross, D., Bonkoovsky, H. (2007).** Silymarin down-regulates HCV core and up-regulates hemeoxygenase-1 gene in expression in the CNS3 replicon line of human liver cells. *Hepatology.* 46:363A.
- Brunton, L., Parker, K., Blumenthal, D. y Buxton, I. (2009).** Goodman and Gilman's Manual de farmacología y terapéutica. McGraw-Hill Interamericana Editores, México.

- Crocenzi, F.A. y Roma, M.G. (2006).** Silymarin as a new hepatoprotective agent in experimental cholestasis: new possibilities for an ancient medication. *Curr. Med. Chem.* 13(9):1055-1074.
- Davis-Searles, P.R., Nakanishi, Y., Kim, N.C., Graf, T.N., Oberlies, N.H., Wani, M.C., Wall, M.E., Agarwal, R. y Kroll, D.J. (2005).** Milk thistle and prostate cancer, differential effects of pure flavonolignans from *Silybum marianum* on antiproliferative end points in human prostate carcinoma cells. *Cancer Res.* 65:4448-4457.
- Das, S., Roy, P., Auddy, R.G. y Mukherjee, A. (2011).** Silymarin nanoparticle prevents paracetamol-induced hepatotoxicity. *Int. J. Nanomedicine.* 6:291-301.
- Deep, G. y Agarwal, R. (2007).** Chemopreventive efficacy of silymarin in skin and prostate cancer intergr. *Cancer Ther.* 6:130-145.
- Doehmer, J., Weiss, G., Weiss, G.P., Mc Gregor, G.P., Appel, K. (2011).** Assessment of a dry extract from milk thistle (*Silybum marianum*) for interference with human liver cytochrome P450 activities. *Toxicology in vitro.* 25:21-27.
- El-Kamary, S.S., Shardell, M.D., Abdel-Hamid, M., Ismail, S., El-Ateek, M., Metwally, M., Mikhail, N., Hashem, M., Mousa, A., Aboul-Fotouh, A., El-Kassas, M., Esmat, G. y Strickland, G.T. (2009).** A randomized controlled trial to assess the safety and efficacy of silymarin on symptoms, signs and biomarkers of acute hepatitis. *Phytomedicine.* 16(5):391-400.
- El Mesallamy, H.O., Metwally, N.S., Soliman, M.S., Ahmed, K.A. y Moaty, M.M.A. (2011).** The chemopreventive effect of *Ginkgo biloba* and *Silybum marianum* extracts on hepatocarcinogenesis in rats. *Cancer Cell Internal.* 11:38. <http://www.cancerci.com/content/11/1/38>
- Erleijman, A.G., Verstraeten, S.V., Fraga, C.G y Oteiza, P.I. (2004).** The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects. *Free Radic. Res.* 38:1311-1320.
- Flora, K., Hahn, M., Rosen, H. y Benner, K. (1998).** Milk Thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. *Am. J. Gastroenterol.* 93(2):139-143.
- Gazquez, O.A. y Blanco, R.A. (2004).** Tratado de histología veterinaria. Editorial Elsevier Masson. Barcelona España. Pag. 281 -293.
- Getty, R. (2002).** Anatomía de los animales domésticos de Sisson y Grossman, Editorial Elsevier Masson. 5ª Ed. Barcelona, España. Pag.
- Goldsworthy, T.L. y Fransson-Steen, R. (2002).** Quantitation of the cancer process in C57BL/6J, B6C3F1 and C3H/HeJ mice. *Toxicol. Pathol.* 30(1):97-105.

- González-Mendoza, M. y Vicuña-Fernández, N. (2003).** Modificación de enzimas hepáticas en ratas desnutridas tratadas con acetaminofén. *Gac. Med. Mex.* 139(5):429-433.
- Grizzle, J., Hadley, T.L., Rotstein, D.S., Perrin, S.L., Gerhardt, L.E., Beam, J.D., Saxton, A.M., Jones, M.P. y Daniel, G.B. (2009).** Effects of Dietary Milk Thistle on Blood Parameters, Liver Pathology, and Hepatobiliary Scintigraphy in White Carneaux Pigeons (*Columba livia*) Challenged With B1 Aflatoxin. *J. Avi. Med. Surg.* 23(2):114–124.
- Guyton, C.G. y Hall J.E. (2001).** Tratado de fisiología médica. Mcgraw-Hill Interamericana. 10ª ed. México. D.F.
- Jain, A., Yadav, A., Bozhkov, A.L., Padalko, V.I. y Flora, S.I. (2011).** Therapeutic efficacy of *Silymarin* and *Naringenin* in reducing arsenic-Induced hepatic damage in young Rats. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 74:607-614.
- Knight, T.M., Farris, T.R., Farhood, W. y Jaeschke, A. (2003).** Role of lipid peroxidation as a mechanis of liver injury after Acetominiphen overdose in mice. *Toxicol Sci.* 76:229-236.
- López, M.A. (2004).** Reparación 5ª Unidad. Patología General Veterinaria. 4ª Edición. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. pp 215-251.
- Machicao, F. y Sonnenbichler, J. (1997).** Mechanism of the stimulation of RNA synthesis in rat liver nuclei by silybin. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 358(2):141-147.
- Mancipe, L.C., Fernandez, A.D. y Fernandez, A.D. (2010).** Intoxicación por Acetaminofen. *Rev. Fac. Med.* 18(2):221-227.
- Mayer, K.E., Myers, R.P. y Lee, S.S. (2005).** *Silymarin* treatment of viral hepatitis, a systematic review. *J. Viral Hepat.* 12(6):559-567.
- McMurtry, R.J., Snodgrass, W.R. y Mitchell, J.R. (1978).** Renal necrosis, glutathione depletion, and covalent binding after acetaminophen. *Toxicol Appl Pharmacol.* 46:87–100.
- Mereish, K.A., Bunner, D.L., Ragland, D.R. y Creasia, D.A. (1991).** Protection against Microcystin-LR-Induced hepatotoxicity by Silimarin: Biochemistry, histopathology, and lethality. *Pharma. Res.* 8(2):273-277.
- Mira, L., Silva, M. y Manso, C.F. (1994).** Scavenging of reactive oxygen species by silybin dihemisuccinate. *Biochem. Pharmacol.* 48:753–759.
- Molina, A.CH., Guerrero, C.M. y Díaz, M.M. (2012).** El acceso restringido al alimento aminora el crecimiento neoplásico y preserva la estructura celular del hígado en un modelo experimental de cirrosis-hepatocarcinoma. *Ciencia UAQ.* 6:1-12.

- Munné, P., Saenz Bañuelos, J.J., Izura, J.J., Burillo-Putze, G., Nogué, S. (2003).** Intoxicaciones medicamentosas (II). Analgésicos y anticonvulsivantes. *Anales Sis. San. Navarra.* 2(1):65-97.
- Muñón, M.J., Álvarez, M., Culebras, J.M. y González-Gallego, J. (2007).** Modelos animales de fallo hepático fulminante. *Nutr. Hosp.* 22(2):199-204.
- Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).** Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Núñez, O.L. y Bouda, J. (2007).** Patología Clínica Veterinaria. 2ª Edición. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. pp 309.
- Nyiredy, S.Z., Samu, Z.S., Szücs, Z., Gulácsi, K., Kurtán, T. y Antus, S. (2008).** New insight into the biosynthesis of Flavanolignans in the white-flowered variant of *Silybum marianum*. *J. Chromatographic Science.* 46:93-96.
- Ochoa, CH., Granda, C., Chapoñan, M., Borja, R., Borjas, P., Ortiz, J. y Ugaz, G. (2008).** Efecto protector de *Peumus boldus* en ratas con toxicidad hepática inducida por Paracetamol. *CIMEL.* 13(1):20-25 .
- Ostapowicz, G., Fontana, R.J. y Schiodt, F.V. (2002).** Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the united states. *Ann. Intern. Med.* 137(12):947-954.
- Parveen, R., Baboota, S., Ali, J., Ahuja, A., Vasudev, S.S. y Ahmad, S. (2011).** Effects of Silymarin nanoemulsion against Carbon Tetrachloride induced hepatic damage. *Arch. Pharm Res.* 34(5):767-774.
- Pilat, L., Mihali, C., Herman, H., Popescu, C., Turcus, V., Ardelean, A., Ardelean, G., Mariasiu, T., Popa, C. y Hermenean, A. (2011).** Pharmacology of *Silybum Marianum* and its active constituents, Therapeutic Activity – Part 1. *J. Med. Aradean.* 14(2):25-33.
- Polyak, S.J., Morishima, C., Shuhart, M.C., Wang, C., Liu, Y. y Lee, D.Y. (2007).** Inhibition of t cell inflammatory citokines, hepatocyte NF kappab signaling and HCV infection by standardized *Silymarin*. *Gastroenterology.* 132:1925-1936.
- Post-White, J., Ladas, E..J y Kelly, K.M. (2007).** Advances in the use of Milk thistle (*Silybum marianum*). *Integr. Cancer Ther.* 6:104-109.
- Ramakrishnan, G., Jagan, S., Kamaraj, S., Anandakumar, P. y Devaki, T. (2009).** *Silymarin* attenuated mast cell recruitment thereby decreased the expressions of matrix metalloproteinases-2 and 9 in rat liver carcinogenesis. *Invest. New Drugs.* 27:233–240.
- Roldán, T. y López A. (2012).** Intoxicación por acetaminofén en pediatría aproximación y manejo. *Univ. Med. Bogotá.* (Colombia). 53 (1): 56-67.
- Sagar, S.M. (2007).** Future directions for research on *Silybum marianum* for cancer patients. *Integr. Cancer Ther.*(6):166-173.

- Seeff, L.B., Curto, T.M., Szabo, G., Everson, G.T., Bonkovsky, H.L., Dienstag, J.L., Shiffman, M.L., Lindsay, K.L., Lok, A.S., Di Bisceglie, A.M., Lee, W.M. y Ghany, M.G. (2008).** Herbal product use by persons enrolled in the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis (HALT-C) trial. *Hepatology*. 47:605–612.
- Selema, G. y Martínez, J. (1999).** Efecto hepatoprotector inducido por el flavonoide Astilbina frente a un modelo animal tratado con tetracloruro de carbono. *Rev. Cubana Plant. Med.* 4(1):36-39
- Silva, C.E. (2008).** Homeopatía veterinaria. Editorial Propulsora de Homeopatía. México.
- Sisamon, I. (2003).** Acerca de la hepatotoxicidad del Paracetamol. *Rev. Hosp. Priv. Com.* 6(2).
- Sonnenbichler, J., Scalera, F., Sonnenbichler, I. y Weyhenmeyer, R. (1999).** Stimulatory effects of *Silibinin* and *Silicristin* from the Milk Thistle *Silybum marianum* on kidney cells. 290:1375.
- Soza, A. (2004).** Hepatitis tóxica: acetaminofeno y otras. *Gastr. Latinoam.* 15(2):158-162.
- Takahashi, M., Dinse, G.E., Foley, J.F., Hardisty, J.F. y Maronpot, R.R. (2002).** Comparative prevalence, multiplicity, and progression of spontaneous and vinyl carbamate-induced liver lesions in five strains of male mice. *Toxicol. Pathol.* 30:599–605.
- Tamayo, C. y Diamond, S. (2007).** Review of clinical trials evaluating safety and efficacy of Milk Thistle (*Silybum marianum* L Gaertn . *Integr. Cancer Ther.* 6:146-157.
- Tedesco, D., Steidler, S., Galletti, S., Tameni, M., Sonzogni, O. y Ravarotto, L. (2004).** Efficacy of silymarin-phospholipid complex in reducing the toxicity of aflatoxin B1 in broiler chicks. *Poult. Sci.* 83:1839-1843.
- Willard, M. (2007).** Hepatopatía Inflamatoria Canina en: Tratado de Medicina Interna Veterinaria. 6a Edición. Tomado de Ettinger S. y Feldman E. Ed. Elsevier, pp. 1442-1447.
- Wu, Y.F., Fu, S.L., Kao, C.H., Yang, C.W., Lin, C.H., Hsu, M.T. y Tsai, T.F. (2008).** Chemopreventive effect of *Silymarin* on liver pathology in HBV X protein transgenic mice. *Cancer Res.* 68:2033–042.

Anexo 1. Técnica de histopatología de inclusión en parafina.

1. Fijación de tejidos en formalina al 10%
2. Procesamiento de tejidos
 - a) Deshidratación
 - Alcohol 50%
 - Alcohol 70%
 - Alcohol 80%
 - Alcohol 96%
 - Alcohol absoluto
 - b) Aclaramiento
 - Xilol
 - c) Inclusión en parafina (bloques)



Figura 9. Histoquinete o procesador de tejidos.

Anexo 2. Tinción de Hematoxilina y Eosina

1. Cortes de tejidos (incluidos en parafina) con micrótopo a 5 μm de grosor



Figura 10. Microtopo.

2. Desparafinar, con platina caliente y Xilol.
3. Hidratar
 - Alcohol absoluto
 - Alcohol 96%
 - Alcohol 70%
 - Agua.
4. Tinción con hematoxilina
 - Tinción
 - Lavar
 - Virar la tinción con Ácido Acético 2%
 - Lavar
5. Tinción con Eosina

6. Deshidratar

- Alcohol 70%
- Alcohol 96%
- Alcohol Absoluto



Figura 11. Tina para flotacion de tejidos.

7. Aclaramiento

- Xilol

8. Montar con Resina Sintética