



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN DE AREQUIPA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL Y ACADÉMICA DE CIENCIAS DE LA
NUTRICIÓN



**“EFECTO PROTECTOR DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Peumus boldus*
(BOLDO) FRENTE A LA INDUCCIÓN DE CIRROSIS HEPÁTICA CON
PARACETAMOL Y FENOBARBITAL EN RATAS, COMPARADO CON LA
SILIMARINA, AREQUIPA 2015”**

Tesis presentada por las Bachilleres:

GUTIÉRREZ MACHACA ROSMERY

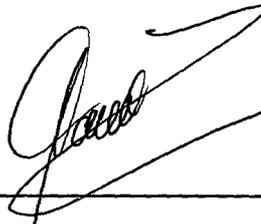
JIMÉNEZ ROJAS JANETT JESSICA

Para optar el Título Profesional de Licenciada
en Nutrición Humana

AREQUIPA - PERÚ

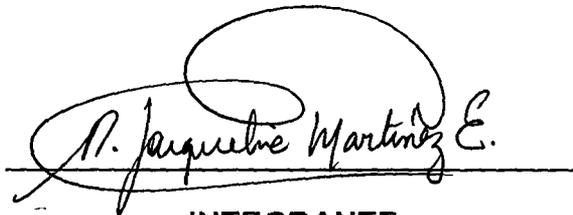
2015

JURADO CALIFICADOR



PRESIDENTA

MG. CARMEN RODRÍGUEZ MORE



INTEGRANTE

DRA. JACQUELINE MARTÍNEZ ESPINOZA



SECRETARIA

LIC. MIRIAM BUENO SOTO

DEDICATORIA

A Dios

Por brindarme fortaleza y perseverancia para lograr mis objetivos día a día, siendo su voluntad el camino que me permitió seguir.

A mis padres

Por su apoyo incondicional y comprensión que permitieron hacer de mí una profesional.

A mis hermanos

Julio, Jaime, Henry, Hernán y Diego por el ejemplo que me dieron y todo su apoyo incondicional en el logro de formar en mí una profesional.

Janett

DEDICATORIA

A Dios

Por todo lo que tengo, por la vida que me concede, por su abundante gracia día a día y la fuerza para culminar esta etapa académica.

A mis padres

Por su amor, su comprensión y apoyo incondicional que me brindan cada día para seguir luchando y cumplir mis metas.

A mi fraternidad JUFRA

Por su apoyo espiritual, porque cuento con sus oraciones, y siempre me acompañan en mis logros.

Rosmery

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Agustín, en especial a la Escuela de Ciencias de la Nutrición por los conocimientos impartidos durante nuestra época estudiantil.

A nuestro asesor, Phd. Azael Paz Aliaga por brindarnos su asesoría y la información requerida para lograr los objetivos trazados en este proyecto.

ÍNDICE

CAPITULO I: GENERALIDADES	1
1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 ANTECEDENTES	3
1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
1.4 OBJETIVOS	6
1.4.1 OBJETIVO GENERAL	6
1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
1.5 HIPÓTESIS	6
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	7
2.1 BOLDO	7
2.1.1 DESCRIPCIÓN	7
2.1.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	8
2.1.3 PROPIEDADES BIOLÓGICAS	8
2.1.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA	9
2.1.5 ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA	11
2.2 HÍGADO	12
2.2.1 ANATOMÍA Y UBICACIÓN	12
2.2.2 HISTOLOGÍA	13
2.2.3 IRRIGACIÓN DEL HÍGADO	16
2.2.4 FISIOLOGÍA DEL HÍGADO	17
2.2.4.1 FUNCIONES VASCULARES	18
2.2.4.2 FUNCIONES METABÓLICAS	18
2.2.4.3 FUNCIONES EXCRETORAS Y SECRETORAS	20
2.3 CIRROSIS HEPÁTICA	21
2.3.1 DEFINICIÓN	21
2.3.2 EPIDEMIOLOGÍA	22
2.3.3 ETIOLOGÍA	22
2.3.4 PATOGENIA	24
2.3.5 HISTORIA NATURAL	26

2.3.5.1 CIRROSIS COMPENSADA	26
2.3.5.2 CIRROSIS DESCOMPENSADA	27
2.3.6 DIAGNÓSTICO	29
2.4 PARACETAMOL	29
2.4.1 DESCRIPCIÓN	30
2.4.2 FARMACOCINÉTICA	30
2.4.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS	30
2.5 FENOBARBITAL	31
2.5.1 DESCRIPCIÓN	31
2.5.2 MECANISMO DE ACCIÓN	31
2.5.3 FARMACOCINÉTICA	32
2.6 SILIMARINA	33
2.6.1 DESCRIPCIÓN	33
2.6.2 ACCIÓN TERAPÉUTICA	33
2.6.3 INDICACIONES	34
2.6.4 MECANISMO DE ACCIÓN	34
2.7 PRUEBAS BIOQUÍMICAS	35
2.7.1 TRANSAMINASAS	35
2.7.2 ALBÚMINA	36
2.7.3 BILIRRUBINA TOTAL	36
2.7.4 FOSFATASA ALCALINA	36
2.7.5 PROTEÍNAS TOTALES	37
2.8 EXAMEN ANATOMOPATOLÓGICO	37
CAPITULO III: DISEÑO METODOLÓGICO	38
3.1 DISEÑO	38
3.2 ÁMBITO DE ESTUDIO	38
3.3 MUESTRA DE ESTUDIO	38
3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL	39
3.5 TÉCNICAS	40
3.5.1 ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES	40
3.5.2 TÉCNICA PARA DETERMINAR EL EFECTO PROTECTOR	40
DEL EXTRACTO ACUOSO DE BOLDO	

3.5.3 TÉCNICA PARA LA INDUCCIÓN DE CIRROSIS HEPÁTICA EN LAS UNIDADES EXPERIMENTALES	41
3.5.4 ELABORACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE BOLDO	42
3.5.5 DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN	43
3.5.6 DETERMINACIÓN DE LA DOSIS DE EXTRACTO ACUOSO DE BOLDO	43
3.6 MÉTODOS	44
3.6.1 EXTRACCIÓN DE SANGRE Y ANÁLISIS DE LABORATORIO	44
3.6.2 DETERMINACIÓN DE TRANSAMINASA GLUTÁMICO OXALACÉTICA	44
3.6.3 DETERMINACIÓN DE BILIRRUBINA TOTAL	46
3.6.4 DETERMINACIÓN DE ALBÚMINA	47
3.6.5 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES	48
3.6.6 DETERMINACIÓN DE FOSFATASA ALCALINA	49
3.6.7 EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA POR MÉTODO DE HARRIS	50
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	54
3.8 RECURSOS	54
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES	56
CAPITULO V: CONCLUSIONES	78
CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES	79
CAPITULO VII: BIBLIOGRAFÍA	80
ANEXOS	87

ÍNDICE DE IMÁGENES

IMAGEN N° 1: Detalle de hojas y flores del <i>Peumus boldus</i> (boldo).	8
IMAGEN N° 2: Estructura molecular de boldina.	10
IMAGEN N° 3: Localización y anatomía del hígado.	12
IMAGEN N° 4: Estructura básica del lobulillo hepático con las placas celulares hepáticas, los vasos sanguíneos, el sistema colector de la bilis y el sistema linfático compuesto por los espacios de Disse y los vasos linfáticos interlobulillares.	13
IMAGEN N° 5: Esquema de lobulillos hepáticos clásico, portal y del ácino de Rappaport	15
IMAGEN N° 6: Esquema de la irrigación sanguínea hepática.	17

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: Evolución a través del tiempo del efecto hepatoprotector de la administración de 160mg/Kg de peso de <i>Peumus boldus</i> (boldo), observado a través de Aspartatoaminotransferasa (AST).	56
TABLA 2: Evolución a través del tiempo del efecto hepatoprotector de la administración de 160mg/Kg de peso de <i>Peumus boldus</i> (boldo), observado a través de Alaninaminotransferasa (ALT).	59
TABLA 3: Evolución a través del tiempo del efecto hepatoprotector de la administración de 160mg/Kg de peso de <i>Peumus boldus</i> (boldo), observado a través de la concentración sérica de bilirrubina total.	62
TABLA 4: Evolución a través del tiempo del efecto hepatoprotector de la administración de 160mg/Kg de peso de <i>Peumus boldus</i> (boldo), observado a través de la concentración sérica de albúmina	65
TABLA 5: Evolución a través del tiempo del efecto hepatoprotector de la administración de 160mg/Kg de peso de <i>Peumus boldus</i> (boldo), observado a través de la concentración sérica de proteínas totales.	68
TABLA 6: Evolución a través del tiempo del efecto hepatoprotector de la administración de 160mg/Kg de peso de <i>Peumus boldus</i> (boldo), observado a través de la concentración sérica de fosfatasa alcalina.	71

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N° 1	57
GRÁFICO N° 2	60
GRÁFICO N° 3	63
GRÁFICO N° 4	66
GRÁFICO N° 5	69
GRÁFICO N° 6	72

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	74
FIGURA 2	75
FIGURA 3	76
FIGURA 4	77

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto protector del extracto acuoso de *Peumus boldus* (boldo) frente a la inducción de cirrosis hepática con paracetamol y fenobarbital en ratas comparado con la silimarina.

Se realizó un estudio experimental, para el cual se utilizó 20 ratas machos *Rattus norvegicus* de tres meses de edad, las cuales fueron distribuidas en cuatro grupos de 5 ratas cada uno: control negativo, recibieron agua destilada (1ml/kg de peso) y suero fisiológico (1ml/kg de peso); control positivo, recibieron a diario Agua destilada (1ml/kg de peso); experimental protector, recibieron a diario el extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* (**boldo**) (160mg/Kg de peso); patrón, recibieron a diario la Silimarina (25mg/kg de peso), A los 3 últimos grupos, después de 30 minutos se les administró la dosis tóxica de fenobarbital (0.5mg/ml) el primer día y paracetamol (250mg/Kg de peso) los días 5, 10 y 15 ambos fármacos vía intraperitoneal. Se tomó pruebas del perfil hepático los días 1, 5, 10 y 15 en sangre, y se estudió la anatomopatología de los hígados.

Al finalizar los procedimientos experimentales se encontró que, el control positivo tuvo elevación de transaminasas TGO ($119 \pm 8,6$), TGP ($61 \pm 8,1$), bilirrubina total ($1,49 \pm 0,15$), y fosfatasa alcalina ($168 \pm 35,2$); disminución de albúminas ($3,1 \pm 0,21$) y proteínas totales ($5,1 \pm 0,3$); mientras que el grupo protector (boldo), tuvo una disminución significativa de transaminasas TGO ($73 \pm 9,7$), TGP ($31 \pm 5,4$), bilirrubina total ($1,23 \pm 0,13$) y fosfatasa alcalina ($121 \pm 19,5$), y un aumento significativo de albúmina ($3.82 \pm 0,40$).

El extracto acuoso de *Peumus boldus* (boldo) a una dosis de 160 mg/kg de peso, tiene efecto hepatoprotector frente a la injuria producida por el fenobarbital y paracetamol según parámetros bioquímicos y anatomopatológicos.

CAPITULO I

GENERALIDADES

1.1 INTRODUCCIÓN

La cirrosis hepática es causa importante de morbilidad y mortalidad en el mundo. En algunos países de América Latina, como Chile y México ocupa entre el 5° y 6° lugar como causa de muerte general. En el Perú, la cirrosis hepática tiene una tasa de mortalidad de 9,48 por 100,000 habitantes, ocupando el 5° lugar en orden de magnitud entre las defunciones generales, el 2° lugar entre las enfermedades digestivas y hepatobiliares y es la 2° causa de muerte entre las defunciones registradas para el grupo etáreo de 20 a 64 años. ¹

Se ha demostrado que al ingerir dosis grandes de paracetamol, el citocromo P450 (CYP2E1, CYP1A2 y CYP3A) genera cantidades de NAPQI (N-acetil-p-benzoquinonemina) capaces de agotar las reservas hepáticas de glutatión. Este metabolito tóxico se acumula fijándose por enlace covalente a aminoácidos de enzimas y otras proteínas hepáticas

a las cuales inactiva, produciendo radicales libres y desarrollando necrosis hepática².

El fenobarbital es un potente estimulante hepático que in vivo produce hipertrofia e hiperplasia a este nivel. Asimismo, se ha comunicado que el tratamiento a largo plazo en ratas resulta en atrofia, disminución y pérdida de regeneración hepática³.

El uso de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha venido utilizando desde tiempo inmemorial. Éstas tienen la mayoría de los antioxidantes, principalmente polifenoles y flavonoides, los cuales poseen gran actividad antioxidante, dentro de ellos el boldo, un arbusto que crece en los Andes de Chile, Argentina y sur del Perú, es un producto natural utilizado tradicionalmente como hepatoprotector. Mediante la utilización de cromatografía líquida de alto rendimiento se han logrado identificar diversos compuestos activos en esta planta y dentro de ellos un alcaloide llamado Boldina, al cual se le atribuye la propiedad hepatoprotectora y antioxidante⁴, por lo que el daño hepático producido por la administración de fenobarbital y paracetamol podría evitarse por las propiedades antioxidantes de la boldina⁵.

El efecto protector de fármacos como la silimarina ha sido demostrado por diversos estudios, sin embargo, estos productos comerciales suelen no encontrarse al alcance de la población general debido a sus elevados costos por lo que este estudio propone incrementar el conocimiento científico acerca de un producto natural, cuyo costo se encuentra al alcance de la población general⁶.

Por lo anteriormente mencionado este trabajo pretende contribuir a incrementar los conocimientos del nutricionista con la finalidad de que obtenga más herramientas a su favor y pueda plantear, en este caso, un enfoque fitoterapéutico que coadyuve a solucionar diversas patologías hepáticas o a mejorar los efectos colaterales de la medicina convencional.

1.2 ANTECEDENTES

Según Olivares J., en su investigación titulada "Efecto protector del extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* "boldo" en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas holtzman hembra, Lima 2015", se reconoce que el estrés oxidativo es uno de los mecanismos implicados en la hepatotoxicidad, por ello se postula que los productos naturales con capacidades antioxidantes, como el *Peumus boldus*, podrían reducir e incluso revertir el daño hepático cuando 24 ratas Holtzman hembra son sometidos por 14 días a la administración de extracto acuoso de las hojas de boldo; fueron divididas, aleatoriamente, en 4 grupos: A (control), B (rifampicina 100 mg/kg), C (silimarina 200 mg/kg y rifampicina 100 mg/kg) y D (boldo 160 mg/kg y rifampicina 100 mg/kg); las ratas del grupo B perdieron más peso, tuvieron mayor elevación de bilirrubinas totales, bilirrubina directa, TGP y sus hígados fueron más congestivos, pesaron y midieron más. Las proteínas totales y albúmina del grupo B fueron menores comparados con los grupos C y D. No se halló diferencia significativa en cuanto a la bilirrubina indirecta, globulina y TGO. Los hígados del grupo B mostraron mayores cambios histopatológicos en comparación con los demás grupos.

Según Yovera E., en su investigación titulada "Efecto protector del extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* "boldo" en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas holtzman hembra, Lima 2015" utilizaron 24 ratas Holtzman hembra, divididas en 4 grupos: Se halló que el grupo B (isoniazida 50 mg/kg) disminuyó más de peso, presentó mayor elevación de bilirrubinas totales, bilirrubina directa, TGO y TGP, en comparación con el grupo A(control), C(silimarina 200 mg/kg e isoniazida 50 mg/kg) y D(boldo 160 mg/kg e isoniazida 50 mg/kg). Se halló también menor elevación de proteínas totales y albúmina en el grupo B, en comparación con los demás grupos. No se halló diferencia significativa entre los grupos en cuanto a la variación de bilirrubina indirecta y globulinas. Los hígados del grupo B mostraron un aspecto

congestivo de mayor vacuolización perinuclear, congestión sinusoidal y desorganización de la arquitectura celular.

Según Arroyo J. et. al., en su investigación titulada “Efecto protector en cirrosis hepática inducida en ratas del extracto etanólico de las hojas de matico (*Piper aduncum*) comparado con silimarina, Lima 2012” se concluyó que el extracto y el fitomedicamento a 200 mg/kg disminuyeron los valores de TGP, bilirrubina total y bilirrubina directa e incrementaron las proteínas totales y albúmina, similar al grupo silimarina. El colágeno, la fibrosis y el nivel de daño hepático se vieron aumentados con tetracloruro de carbono; estos indicadores se redujeron con los diferentes tratamientos y la silimarina. El marcador de estrés oxidativo se redujo con los tratamientos aplicados⁹.

La silimarina ha sido ampliamente estudiada como hepatoprotectora en diversos modelos animales. Es así que en el estudio realizado por M Singh et. al., se halló reversión significativa del daño hepático en los grupos a los que se les aplicó silimarina. Estos resultados se atribuyen a: 1) reversión del daño a la membrana celular observado en el microscopio de fase de contraste, 2) supresión del daño mitocondrial observado en el microscopio focal y 3) disminución en la apoptosis. Además la silimarina logra revertir alteraciones morfológicas en los cultivos de células hepáticas y protege contra las lesiones por isquemia/reperfusión al prevenir el deterioro de la función mitocondrial. Por último, los resultados de este estudio corroboran que la silimarina inhibe diversas isoformas del citocromo P450 (CYP450), potencia la capacidad antioxidante del hígado e inhibe la síntesis de citoquinas proinflamatorias¹⁰.

Otra investigación titulada: “Efectos del *Silybum marianum* (Cardo mariano) en *Rattus norvegicus* variedad Sprague dawley con daño hepático inducido por tetracloruro de carbono, Arequipa 2011”, evidenció el poder fitoterapéutico ante el daño hepático, los resultados mostraron disminución significativa en la actividad de la TGO y TGP en dos grupos

experimentales que recibieron vía oral *Silybum marianum* (cardo mariano) a dosis de 10 y 20 mg/kg/día. El grupo que recibió *Silybum marianum* (cardo mariano) a dosis de 10 mg/kg/día, respondió de manera más efectiva al tratamiento registrando los menores niveles de TGO y TGP en plasma, a nivel histopatológico el grupo experimental (20mg/kg/día de *Silybum marianum*) y el grupo control (1.5 mg/kg/día de hepabionta) mostraron mejoría en el grado de estasis y en disposición arquitectural de los hepatocitos en relación al grupo blanco y experimental (10mg/kg/día de *Silybum marianum*)¹¹.

En la investigación realizada por Troncoso L. y Guija E., titulada: "Efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petroselinum sativum* (perejil) en ratas, con intoxicación hepática inducida por paracetamol, Lima 2007" concluyeron que: el perejil ejerce mayor defensa que el FHP (hepatoprotector farmacológico), frente a la acción nociva del paracetamol, evaluado por AST (aspartatoaminotransferasa), ALT (alaninaaminotransferasa) y GGT (gamma glutamiltransferasa). Histopatológicamente, no se observó signos de necrosis severa en el grupo tratado con perejil, hecho que sí ocurrió con el grupo tratado sólo con paracetamol y en el grupo al que se administró adicionalmente FHP, por lo tanto el perejil ejerce un mayor efecto antioxidante y hepatoprotector que el FHP¹².

Según Luque K. y Pizarro R. (2013) en su investigación titulada "Efecto protector y regenerativo del extracto acuoso de las hojas de *Schinus molle* (molle) en ratas *Rattus norvegicus* con daño hepático inducido por paracetamol, Arequipa 2012" concluyeron que: el tratamiento con el extracto acuoso de molle ejerce un efecto protector y regenerativo del hígado de ratas intoxicadas con paracetamol, siendo la dosis de 2.0 g/kg la que manifestó tener un mayor efecto evidenciado a través de la disminución significativa de TGO, TGP y GGT comparados con los niveles del grupo control. Histopatológicamente se observó una mejoría de grado severo a moderado en el grupo regenerativo y de grado severo a ligero en el grupo protector¹³.

1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Existe efecto protector del extracto acuoso de *Peumus boldus* (boldo) frente a la inducción de cirrosis hepática con paracetamol y fenobarbital en ratas, comparado con la silimarina, Arequipa 2015?

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto protector del extracto acuoso de *Peumus boldus* (boldo) frente a la inducción de cirrosis hepática con paracetamol y fenobarbital en ratas, comparado con la silimarina, Arequipa 2015

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar el perfil hepático (TGO, TGP, bilirrubina total, albúmina, proteínas totales, fosfatasa alcalina) y realizar el estudio anatomopatológico basal del hígado de *Rattus norvegicus normales*.
- 2) Determinar el efecto protector del extracto acuoso de *Peumus boldus* (boldo) frente a la inducción de cirrosis hepática con paracetamol y fenobarbital a través de la lectura de los niveles del perfil hepático y estudio anatomopatológico.
- 3) Determinar el efecto protector de la silimarina frente a la inducción de cirrosis hepática con paracetamol y fenobarbital a través de la lectura de los niveles del perfil hepático y estudio anatomopatológico, comparado con el extracto acuoso del *Peumus boldus* (boldo).

1.5 HIPÓTESIS

El extracto acuoso de *Peumus boldus* (boldo) tiene efecto protector frente a la inducción de cirrosis hepática con paracetamol y fenobarbital en ratas, comparado con la silimarina, Arequipa 2015”

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 BOLDO

2.1.1 DESCRIPCIÓN

El *Peumus boldus* (boldo), pertenece a la familia Monimiácea, procedente de Chile, donde crece en lugares secos de las regiones montañosas. También crece silvestre en las laderas de la región Andina, principalmente del Perú¹⁴.

Arbusto dioico, perenne, hasta 7 metros de altura, muy ramificado; con olor a menta o alcanfor. Hojas aromáticas, opuestas, quebradizas, ovaladas a elípticas, enteras, ligeramente dobladas hacia abajo; pecíolo corto; limbo hasta de 6 cm de longitud por 3 cm de ancho en la parte media; haz cubierto de protuberancias glandulares claras, envés liso con nervaduras notorias¹⁵.

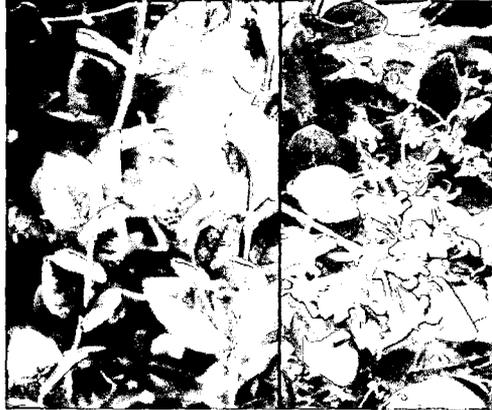


IMAGEN N° 1: Detalle de hojas y flores del boldo (*Peumus boldus*)
Fuente: <http://www.arbolesornamentales.com/Peumusboldus.htm>

2.1.2 CLASIFICACION TAXONÓMICA

TAXONOMÍA	PERTENENCIA
DIVISIÓN	<i>Magnoliophyta</i>
CLASE	<i>Magnoliopsida</i>
SUBCLASE	<i>Magnolidiae</i>
ORDEN	<i>Lurales</i>
FAMILIA	<i>Monimiaceae</i>
GÉNERO	<i>Peumus</i>
ESPECIE	<i>Peumus boldus</i> Molina.

Fuente: Herbario San Marcos del museo de historia natural, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

2.1.3 PROPIEDADES BIOLÓGICAS

Se han aislado hasta 20 alcaloides, considerados los principios activos de las hojas del boldo, entre los que destaca la boldina (abundante también en la corteza del arbusto). Contiene aceite esencial, flavonoides y taninos. Todas estas sustancias confieren la acción digestiva y protectora hepática.

Dado el contenido en sustancias con acción aperitiva, colerética y colagoga, el empleo de hojas de boldo se usa con notable eficacia para tratar dispepsias, trastornos gastrointestinales leves

(flatulencia, aerofagia) y disfunciones hepatobiliares menores como insuficiencia hepática (hígado y vesícula perezosos, hepatitis, estreñimiento y migrañas provocadas por malas digestiones.

El consumo de boldo estimula la producción de bilis (puede duplicar el flujo de la bilis) y la salida del fluido desde la vesícula, lo cual favorece la digestión y combate los síntomas derivados de un mal funcionamiento del hígado o de la vesícula (flatulencia y espasmos intestinales).¹⁶

No obstante, a pesar de que los preparados de boldo son beneficiosos para conseguir una buena función hepática, no hay que abusar de su ingestión ni tomarlo sin prescripción o supervisión médica. Conviene que el tratamiento con boldo no supere las cuatro semanas y no se superen las dosis recomendadas, pues se han observado casos de intoxicación¹⁷.

2.1.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA

El *Peumus boldus* (boldo), contiene dentro de su composición el alcaloide llamado **boldina**. Esta sustancia estimula la secreción biliar y la producción de jugos gástricos, debido a esto el boldo posee propiedades digestivas¹⁸.

Además el boldo presenta entre sus componentes aceites esenciales, tales como el eucaliptol y ascaridiol. Estas sustancias son responsables de las propiedades carminativas del boldo, además de ayudar a la desinflamación de los tejidos¹⁸.

Dentro de los componentes del boldo se destacan los flavonoides, los cuales tienen excelentes propiedades, que ayudan a reducir los riesgos de enfermedades cardíacas¹⁸.

Además, se encuentran presentes en la composición del boldo taninos, que se destacan por sus propiedades antioxidantes¹⁸.

Debido a los flavonoides, las sustancias antiinflamatorias, la boldina y los aceites esenciales, el boldo podría presentar propiedades para adelgazar¹⁸.

COMPONENTES DEL BOLDO	
ALCALOIDES ISOQUINOLÍNICOS	0.2 a 0.5 %: Boldina, isocoridina, laurotetanina, norisocoridina y 15 alcaloides más.
ACEITE ESENCIAL	2%: Cineol, cimol, ascardol, eugenol, pineno y terpineol.
TANINOS	1-2%
GLICOSIDOS FLAVÓNICOS	Peumósido, boldósido, fragósido, boldoglucina, taninos, oxalato de calcio, sustancia aromáticas.
FLAVONOIDES	Ramnetol, isoramnetol, kempferol.

Boldina: Este compuesto posee como estructura principal la siguiente: (S)-2.9-dihydroxy-1, 10-dimethoxyaporphine¹⁹.

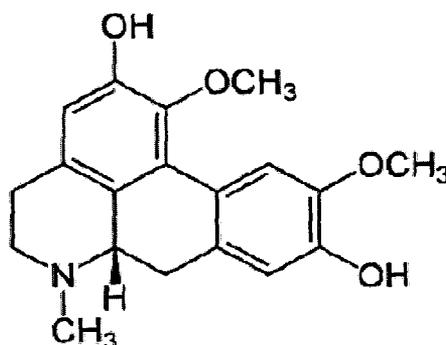


IMAGEN N°2: BOLDINA (principio activo de *Peumus boldus*)

Fuente: ESTRUCTURA MOLECULAR DE BOLDINA.

[Http://es.wikipedia.org/wiki/Boldina](http://es.wikipedia.org/wiki/Boldina)

La boldina, le da el sabor amargo característico a la planta e intensa fragancia, que puede transmitir a la orina si se toma durante un tiempo prolongado.

Se ha identificado mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HLPC) a la boldina, la cual se encuentra ampliamente en las hojas y corteza de *Peumus boldus*²⁰. Este compuesto posee propiedades hepatoprotectoras, colagogas, antiespasmódicas, sedativas, antioxidantes, reguladoras de la función hepática, antimicrobianas sobre patógenos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*²⁰ y antitripanosomales (*Trypanosoma*

brucei brucei) y *citotóxicas* (sobre células HeLa en cultivos in vitro)
21.

Se ha demostrado también que la boldina es capaz de disminuir la toxicidad hacia los sistemas biológicos producida por los radicales libres, mediante la reducción de la peroxidación lipídica de membranas celulares utilizando vías enzimáticas y no enzimáticas⁴.

Se describe también que el boldo es capaz de estimular los sistemas de detoxificación hepática como los sistemas enzimáticos de catalasa y superóxido dismutasa⁴.

Sin embargo, aunque existe evidencia acerca de los efectos benéficos de esta planta, no es recomendable su utilización en el embarazo y la lactancia debido a que no existe evidencia que sugiera que no produce enfermedades en el lactante ni abortos espontáneos. Asimismo, algunos reportes han sugerido un efecto neurotóxico asociado al consumo de boldo²².

2.1.5 ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA

La actividad hepatoprotectora se refiere a la regeneración de las células hepáticas. Esto quiere decir que aceleran la función natural del hígado de reemplazar las células dañadas²³.

Hay plantas hepatoprotectoras que pueden estimular los sistemas de detoxificación del hígado para eliminar los compuestos tóxicos que pudieran haber ingresado al mismo (ya sea alimentos en mal estado las toxinas como fármacos muy potentes). Uno de los mecanismos más importantes de detoxificación lo constituyen los sistemas enzimáticos de las catalasas y superóxido-dismutasa. Estos mecanismos son muy importantes para permitir la eliminación de radicales libres del organismo. Entre las plantas que cumplen con este rol figuran:

- El boldo (*Peumus boldus*)
- El cardo mariano (*Silybum marianum*) es una de las especies más reputadas, conteniendo entre sus activos la Silimarina, de gran poder detoxificante y regenerador de las células hepáticas²⁴.

2.2 HÍGADO

Localización y Anatomía del Hígado

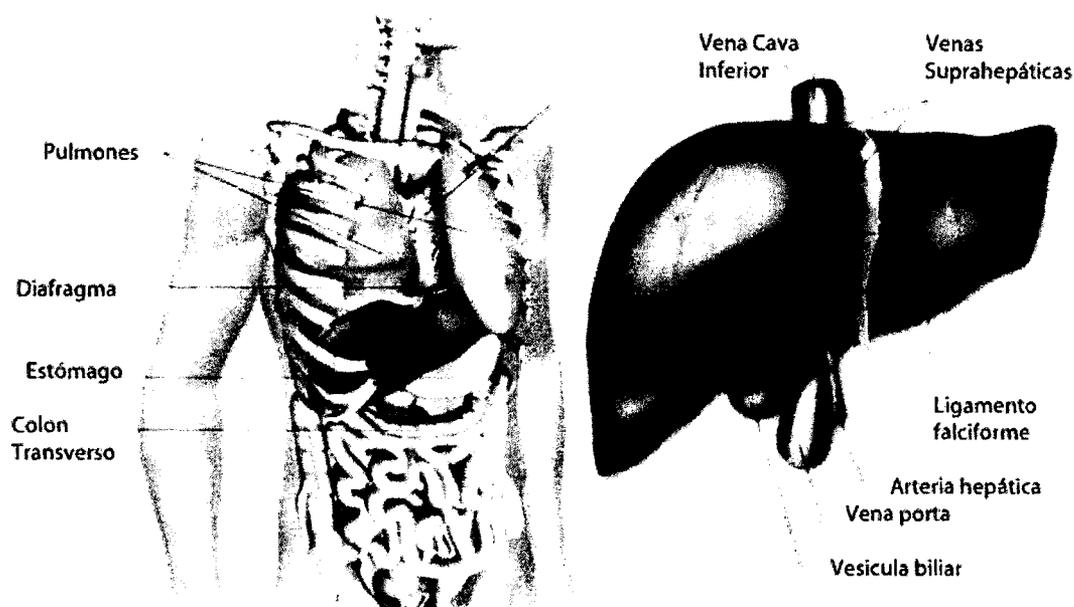


IMAGEN N° 3: Localización y anatomía del hígado

Fuente: <http://blog.casapia.com/cuales-son-los-sintomas-de-un-higado-inactivo-como-podemos-ayudarlo/>

2.2.1 ANATOMÍA Y UBICACIÓN

El hígado es el órgano más voluminoso del cuerpo y representa el 2% del peso corporal total, es decir 1.5 kg para un adulto tipo²⁵. Se encuentra en el cuadrante superior derecho del abdomen (hipocondrio derecho), por debajo del diafragma. Es una enorme glándula anfícina, de secreción tanto exocrina como endocrina²⁶.

La unidad funcional básica es el lobulillo hepático, una estructura cilíndrica de varios milímetros de longitud y de 0.8 a 2 milímetros de diámetro. El hígado humano contiene entre 50000 y 100000 lobulillos²⁵.

2.2.2 HISTOLOGÍA

El parénquima del hígado se dispone en una estructura con forma hexagonal denominada lobulillo hepático, la unidad histofuncional del órgano.

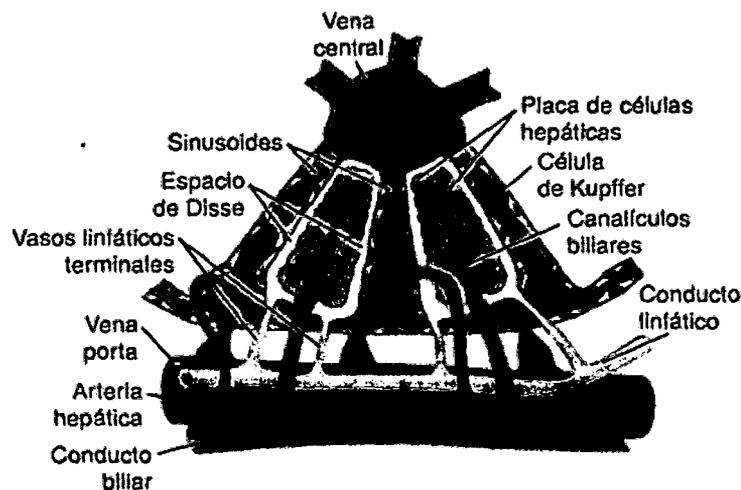


IMAGEN N° 4: Estructura básica del lobulillo hepático con las placas celulares hepáticas, los vasos sanguíneos, el sistema colector de la bilis y el sistema linfático compuesto por los espacios de Disse y los vasos linfáticos interlobulillares²⁶.

- **Lobulillo hepático:** Consiste en trabéculas de hepatocitos, que se asemejan a paredes en disposición laberíntica entre el centro y la periferia, llamadas trabéculas de Remak; generalmente, estas trabéculas son de una célula de espesor, aunque pueden ser más, y están separadas por capilares sinusoides²⁶.
- **Triada portal:** Compuesto por las ramas de la arteria

hepática, la vena porta y los conductos del árbol biliar²⁶.

- **Sinusoides:** Son espacios vasculares delimitados por hileras de hepatocitos. La arteria hepática y la vena porta drenan la sangre en estos espacios para irrigar el hepatocitos²⁶. Los sinusoides están tapizados por otros dos tipos de células: 1) células endoteliales típicas y 2) las grandes células de Kupffer, que son macrófagos que fagocitan las bacterias y otros cuerpos extraños de la sangre de los sinusoides²⁵.
- **Espacio de Disse:** Es el espacio existente entre la membrana del hepatocito y la membrana de las células endoteliales y de las células de Kupffer del capilar sinusoides, que contiene microvellosidades, fibras reticulares, fibroblastos y células de Ito²⁶.
- **Células de Ito:** Es una célula estrellada, que se encuentra entre dos hepatocitos por fuera de su canalículo y protruye hacia el espacio de Disse. En estas células se almacena vitamina A dentro de inclusiones lipídicas citoplasmáticas²⁶.
- **Hepatocitos:** El hepatocito es una célula poliédrica, tiene una vida media de alrededor de 5 meses, además de una gran capacidad regenerativa. Es una célula con polaridad bien definida ya que sus caras no son todas equivalentes, y por ello la distribución de organelas e inclusiones citoplasmáticas concuerda con la zona de la célula que se analice. La zona del hepatocito que contacta con el espacio de Disse, la cara o polo vascular, hacia donde se proyectan múltiples microvellosidades, y donde el citoplasma cercano a esa cara es rico en todo tipo de organoides, ya que por esa cara se cumplen las funciones de secreción endocrina; allí se metabolizan los nutrientes y fármacos o tóxicos y por esa cara se liberan las lipoproteínas²⁶.
- **Lobulillos hepáticos:** La unidad funcional del hígado es el

lobulillo, que según la función considerada, se clasifica en tres tipos: lobulillo clásico, lobulillo portal y ácino hepático.

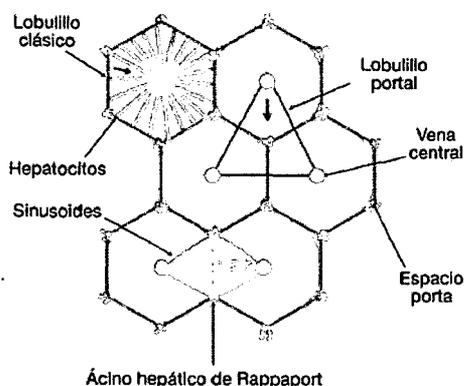


IMAGEN N° 5: Esquema de lobulillos hepáticos clásico, portal y del ácino de Rappaport

- **Lobulillo clásico:** Se fundamenta en la organización estructural del parénquima hepático, pone de relieve la función endocrina y la circulación sanguínea hacia la vena centrolobulillar²⁶.
- **Lobulillo portal:** Dado que la principal función exocrina del hígado es la secreción de bilis, el lobulillo portal toma como eje morfológico al conducto biliar interlobulillar que está en la tríada portal del lobulillo clásico²⁶.
- **Ácino hepático de Rappaport:** Es una estructura romboidal que tiene como eje menor el límite entre dos lobulillos clásicos, comprendido entre dos espacios porta, y el eje mayor es un segmento imaginario que une las dos venas centrolobulillares de los lobulillos clásicos contiguos. La zona cercana al eje menor, que corresponde a los hepatocitos ubicados en la periferia del lobulillo clásico, que reciben la mezcla de sangre proveniente de la arteria hepática y de la vena porta. Estos hepatocitos son más activos metabólicamente, reciben la sangre más

oxigenada, pero también son los que primero reciben nutrientes y toxinas²⁶.

Asimismo son los primeros en exhibir alteraciones morfológicas si hay una obstrucción de la vía biliar, pero también son los últimos en morir cuando hay trastornos circulatorios y los que primero se regeneran. En la zona 1 de la figura, se encuentran hepatocitos stem cells, con capacidad migratoria hacia las otras zonas. En cambio, los hepatocitos de la zona más cercana a las venas centrolobulillares son menos activos metabólicamente. Estos hepatocitos son los últimos en responder a los tóxicos y a la obstrucción biliar. Y son los primeros en morir cuando hay trastornos circulatorios, ya que la oxigenación pobre se ve aún más disminuida. Su principal función es la detoxificación²⁶.

2.2.3 IRRIGACIÓN DEL HÍGADO

En el hígado hay una irrigación doble: el 75% del aporte sanguíneo proviene de un componente venoso, la vena porta, que lleva sangre con poco oxígeno pero muy rica en nutrientes desde el intestino; el 25% restante proviene de un componente arterial (la arteria hepática), que lleva sangre rica en oxígeno. Los dos vasos entran al hígado por el hilio, por donde salen también las vías biliares y los vasos linfáticos²⁶.

La sangre que lleva al hígado la vena porta proviene de capilares presentes en la mucosa del intestino (sobre todo del intestino delgado), donde los finos capilares presentes en la mucosa reciben los nutrientes, fármacos y tóxicos que fueron absorbidos por las células absortivas del intestino. Esta red capilar drena en la vena porta, que al llegar al hígado vuelve a capilarizarse, formándose los capilares sinusoides que permiten que esas sustancias lleguen al hepatocito, que puede metabolizarlas²⁶.

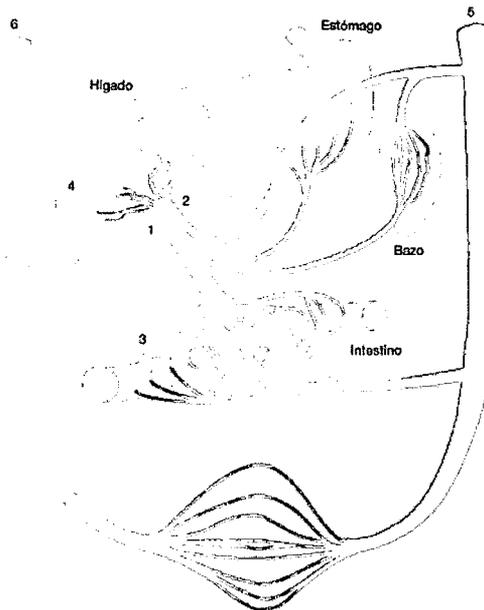


IMAGEN N° 6: Esquema de la irrigación sanguínea hepática. 1, vena porta; 2, arteria hepática; 3, capilares y vénulas de la mucosa intestinal; 4, capilares sinusoides del parénquima hepático que desembocan en la vena suprahepática; 5, aorta; 6, vena cava inferior²⁶.

2.2.4 FISIOLÓGÍA DEL HÍGADO

El hígado tiene una posición estratégica en la circulación; es el primer órgano que contacta la sangre proveniente del intestino. Esto no sólo implica que la superficie hepática absorba nutrientes, toxinas y microorganismos derivados del intestino, sino que también sugiere el papel hepático en la secreción de compuestos en la luz intestinal. Podemos precisar entonces que a este órgano le atañen tres tipos de funciones básicas que son:

- a. Funciones vasculares (almacenamiento y filtración)
- b. Funciones metabólicas
- c. Funciones secretoras y excretoras encargadas de formar bilis.

2.2.4.1 Funciones vasculares²⁵.

Las características vasculares del hígado, hacen posible que el mismo se comporte como un reservorio importante de sangre y además, que actúe como un filtro para la sangre procedente del intestino.

Función de almacenamiento.

El hígado es un órgano expansible y sus vasos pueden almacenar grandes cantidades de sangre. El volumen normal de sangre tanto de las venas hepáticas como de los sinusoides, es de 450 mililitros, es decir casi un 10% de del volumen sanguíneo total del organismo; de modo que puede albergar hasta un litro de sangre en casos en los que la volemia se vuelve excesiva y también le permite suplir sangre extra cuando la volemia disminuye.

Función de filtración.

La sangre que fluye por los capilares intestinales recoge muchas bacterias del intestino. De hecho, antes de su entrada en el hígado, una muestra de sangre de la vena porta casi siempre contendrá bacilos cólicos si se cultiva. La acción de las células de Kupffer, han puesto de relieve su eficiencia depuradora de la sangre, ya que cuando una bacteria entra en contacto momentáneo con una célula de Kupffer, en menos de 0,01 segundos atraviesa la pared de esta célula y queda atrapada de forma permanente hasta su digestión. Es muy probable que menos del 1% de las bacterias que pasan a la sangre portal desde el intestino logren atravesar el hígado y lleguen a la circulación general.

2.2.4.2 Funciones metabólicas²⁵.

El hígado es un gran depósito de células, con capacidad de reacción química, que realizan un metabolismo intenso,

puesto que los sistemas metabólicos comparten sustratos y energía, y además en este órgano se procesan y se sintetiza numerosas sustancias transportadas a otras regiones del organismo que cumplen miles de funciones metabólicas diferentes.

Metabolismo de los carbohidratos.

Las funciones específicas del hígado en el metabolismo de los carbohidratos son:

1. Depósito de grandes cantidades de glucógeno.
2. Conversión de la galactosa y de la fructosa en glucosa.
3. Gluconeogenia
4. Formación de muchos compuestos químicos a partir de los productos intermedios del metabolismo de los hidratos de carbono.

El hígado resulta decisivo para mantener la glucemia dentro de los límites normales.

Metabolismo de los lípidos.

Aunque el metabolismo de las grasas puede ocurrir en casi todas las células, pero algunos aspectos de este metabolismo tienen lugar sobre todo en el hígado. Las funciones del hígado en el metabolismo de la grasa son:

1. Oxidación de los ácidos grasos para proveer energía destinada a otras funciones corporales.
2. Síntesis de grandes cantidades de colesterol, fosfolípidos y casi todas las lipoproteínas.
3. Síntesis de grasa a partir de las proteínas y de los hidratos de carbono

Metabolismo proteínico

El organismo no puede prescindir de la contribución del hígado al metabolismo proteínico más allá de unos días, sin que de ello se deriven consecuencias mortales.

Las funciones más importantes del hígado en dicho metabolismo son:

1. Desaminación de aminoácidos.
2. Formación de urea para suprimir el amoniaco de los líquidos corporales.
3. Formación de aproximadamente el 90% de todas las proteínas plasmáticas.
4. Interconversión de los distintos aminoácidos y síntesis de otros compuestos a partir de los aminoácidos.

2.2.4.3 Funciones excretoras y secretoras encargadas de formar bilis²⁵.

Una de las tantas funciones hepáticas es la formación y secreción de bilis. La bilis es una secreción acuosa que posee componentes orgánicos e inorgánicos cuya osmolaridad es semejante a la del plasma y normalmente un humano adulto secreta entre 600 y 1200 ml diarios.

El hígado secreta bilis en dos etapas, en la etapa inicial los hepatocitos producen una secreción que contiene grandes cantidades de ácidos biliares, colesterol y otros constituyentes orgánicos que se vierten a los canalículos biliares situados en los hepatocitos, en la segunda etapa, la bilis fluye por los canalículos hacia los tabiques interlobulillares, donde los canalículos desembocan en los conductos biliares terminales continuando por conductos biliares de tamaño progresivamente mayor, y finalmente hacia el conducto hepático y el colédoco, desde el cual se

vacía directamente al duodeno o se desvía por el conducto cístico hacia la vesícula biliar.

A lo largo de los conductos biliares se va añadiendo a la bilis inicial una segunda porción de secreción, constituida por una solución acuosa de iones de sodio y bicarbonato.

2.3 CIRROSIS HEPÁTICA

2.3.1 DEFINICIÓN

La cirrosis hepática es el estadio final de todas las enfermedades hepáticas crónicas progresiva. Es una alteración histopatológica difusa del hígado caracterizada por pérdida del parénquima hepático, formación de septos fibrosos y nódulos de regeneración estructuralmente anormales, dando lugar a una distorsión de la arquitectura hepática normal y a una alteración de la anatomía de la vascularización hepática y de la microcirculación²⁷.

El término cirrosis fue propuesto por Laennec hace más de 180 años. Deriva de la palabra en latín scirro que se traduce tanto por “amarillo grisáceo” como por “duro” y se refiere a la coloración y consistencia que adquiere el hígado en este proceso. En 1977, expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), partiendo de los datos morfológicos consideraron los siguientes criterios para definir la cirrosis: a) que el proceso sea difuso para excluir lesiones locales o focales; b) que exista necrosis, con lo que queda excluida la fibrosis hepática congénita; c) debe existir regeneración nodular y fibrosis difusa, quedando excluida la hiperplasia nodular regenerativa y d) debe haber distorsión del patrón arquitectural y alteración vascular. Estos dos últimos criterios son importantes porque constituyen la base del diagnóstico histopatológico en las biopsias, y porque motivan en gran medida la fisiopatología de la enfermedad.

Las complicaciones de la cirrosis son las mismas, independientemente de la causa. La hipertensión portal es una de las complicaciones más importantes de la cirrosis

descompensada e interviene en la aparición de ascitis y hemorragia por varices esofagogástricas. La disfunción hepatocelular origina ictericia, trastornos de la coagulación e hipoalbuminemia y contribuye a la encefalopatía porto-sistémica. La cirrosis hepática predispone al desarrollo de hepatocarcinoma.

2.3.2 EPIDEMIOLOGÍA

La cirrosis hepática es una enfermedad frecuente en el mundo, y su prevalencia es variable de un país a otro dependiendo de los factores etiológicos. La cirrosis suele manifestarse hacia la cuarta o quinta década de la vida, aunque hay casos juveniles e incluso infantiles, y no es excepcional que un paciente sea portador de una cirrosis durante muchos años, y ésta se manifieste en la senectud o incluso sea un hallazgo de autopsia. La cirrosis es una enfermedad más frecuente en el sexo masculino, probablemente porque la infección por los virus de las hepatitis y el etilismo son más frecuentes en el varón²⁸. La raza negra, el hábitat urbano y el menor nivel económico parecen ser factores significativos de riesgo del desarrollo de cirrosis. Un aspecto interesante es la posible predisposición genética a padecer la enfermedad, habiéndose excluido las enfermedades hepáticas genético-hereditarias.

2.3.3 ETIOLOGÍA

Aproximadamente el 90% de las causas de cirrosis hepática en países occidentales son el abuso de alcohol, la enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHnA) y la hepatitis crónica vírica²⁹. A escala mundial, la hepatitis crónica por el virus de la hepatitis B (vHB) y C (vHC) con más de 400 millones de enfermos infectados representa la etiología más importante²⁹. La causa de la cirrosis permanece desconocida en cerca del 10% de los casos (cirrosis criptogénica) y aproximadamente el 70% de estos casos se cree

que en la actualidad están relacionados con la EHnA dentro del contexto de resistencia a la insulina y síndrome metabólico, mientras que el resto puede estar en relación con mecanismos autoinmunes. Varios factores etiológicos tales como hemocromatosis y alcohol, o alcohol y hepatitis C pueden acelerar la progresión a cirrosis.

Etiología de la cirrosis hepática

Metabólica-tóxica

- Alcohol
- Enfermedad de hígado graso no alcohólico (resistencia a la insulina, síndrome metabólico)
- Cirrosis infantil de la India

Infeciosa

- Virus de las hepatitis VHB, VHC y VHD
- Eschistosomiasis

Autoinmune

- Hepatitis autoinmune
- Cirrosis biliar primaria
- Colangitis autoinmune
- Síndromes de solapamiento o superposición

Genético-hereditaria

- Hemocromatosis hereditaria
- Enfermedad de Wilson
- Déficit de α 1-antitripsina
- Porfiria cutánea tarda
- Enfermedades por depósito de glucógeno
- Galactosemia
- Tirosinemia
- Abetalipoproteinemia

- Fibrosis quística

Enfermedades biliares

- Cirrosis biliar secundaria (obstrucción biliar por estenosis, litiasis de larga evolución)
- Colangitis esclerosante primaria
- Colangitis asociada IgG4
- Colangiopatía isquémica
- Ductopenia
- Atresia de vías biliares
- Síndrome de Alagille

Vascular

- Insuficiencia cardíaca crónica derecha ("cirrosis cardíaca")
Pericarditis constrictiva crónica
- Síndrome de Budd-Chiari
- Síndrome de obstrucción sinusoidal (enfermedad venooclusiva)
- Telangiectasia hemorrágica hereditaria (enfermedad Rendu-Osler-Weber)

Criptogenética*

- *Aproximadamente el 70% de las cirrosis criptogenéticas se desarrollan en el contexto de resistencia a la insulina y síndrome metabólico.

Inducido por fármacos

La incidencia anual de hepatocarcinoma por el vHB en pacientes con cirrosis hepática oscila entre el 2-5% y varía según el área geográfica^{30, 31}.

2.3.4 PATOGENIA

Los siguientes mecanismos fisiopatológicos son importantes en el desarrollo de cirrosis hepática de cualquier etiología: a) necrosis o

lisis de hepatocitos con pérdida del parénquima hepático e inflamación; b) fibrogénesis (depósito de matriz extracelular); c) cambios en el crecimiento celular (hiperplasia, regeneración) y d) alteraciones vasculares y circulatorias.

La necrosis y lisis de hepatocitos e inflamación crónica y continua constituyen un estímulo y factor perpetuador de proliferación y crecimiento de los hepatocitos y del proceso de fibrogénesis^{32, 33}. En la cirrosis se producen citocinas profibrogénicas tales como factor transformante del crecimiento $\beta 1$ (tGF- $\beta 1$ -transforming growth factor beta-1) que inician y perpetúan la activación de las células estrelladas hepáticas transformadas en el fenotipo de miofibroblastos. Los miofibroblastos se contraen, proliferan y producen colágeno y otros componentes de la matriz extracelular. El desarrollo de cirrosis se acompaña de un marcado incremento en el contenido de colágeno y depósito de matriz extracelular producida principalmente por las células estrelladas activadas y transformadas en miofibroblastos^{32,33}.

Inicialmente la fibrosis aparece en las zonas periportales y pericentrales. Si la fibrogénesis se perpetúa se producen puentes o septos de fibrosis que conectan los espacios portales y los espacios porta con las venas centrolobulillares alterando la arquitectura hepática y formándose nódulos de regeneración hepatocitaria^{32, 33}. El depósito de matriz extracelular y colágeno en el espacio de Disse conlleva la formación de pseudomembranas localizadas en el endotelio sinusoidal, lo que se conoce como "capilarización de los sinusoides". Esto produce una barrera adicional creada entre la luz sinusoidal y los hepatocitos que impide el intercambio de sustancias entre la sangre sinusoidal y las células parenquimatosas, siendo los hepatocitos más vulnerables al daño isquémico y nutritivo. Un proceso de angiogénesis acompaña al proceso fibrogénico produciendo en el hígado "neovasos" que pueden desempeñar un papel en la patogénesis de la hipertensión portal. La destrucción del parénquima combinada con la regeneración e hiperplasia de

células parenquimatosas, la estrangulación fibrótica del tejido hepático y las alteraciones vasculares contribuyen a la transformación nodular del hígado.

2.3.5 HISTORIA NATURAL

La cirrosis hepática es el estadio final de todas las enfermedades hepáticas crónicas. Su historia natural se caracteriza por una fase asintomática, denominada cirrosis compensada, de duración variable. En esta fase los pacientes pueden llegar a tener hipertensión portal y varices esofágicas^{34, 35}. A medida que la enfermedad progresa con el desarrollo de mayor hipertensión portal y mayor deterioro de la función hepática aparecen las complicaciones de la denominada cirrosis descompensada como ascitis, hemorragia por varices, encefalopatía hepática o ictericia³⁵. El desarrollo de cualquiera de estas complicaciones marca la transición de la fase compensada a la descompensada³⁵. La progresión de la enfermedad parece que se acelera, con riesgo de muerte con el desarrollo de complicaciones tales como el resangrado, insuficiencia renal (ascitis refractaria, síndrome hepatorenal), síndrome hepatopulmonar y sepsis (peritonitis bacteriana espontánea). El desarrollo de hepatocarcinoma puede acelerar el curso de la enfermedad tanto en la fase compensada como descompensada³⁵.

La clasificación de la cirrosis en estadio compensado y descompensado como se ha realizado en una revisión sistemática³⁵ es simple y reproducible e identifica a pacientes en una similar tasa de progresión de la enfermedad y supervivencia.

2.3.5.1 Cirrosis compensada

El curso clínico de la cirrosis compensada no se conoce con exactitud debido al carácter asintomático u oligosintomático de esta fase. Los factores pronósticos de

mortalidad que se identifican con una mayor frecuencia en esta fase compensada están relacionados con la presencia de hipertensión portal (recuento de plaquetas, tamaño del bazo o presencia de varices)³⁵. Probablemente, estos factores pronósticos identifican a los pacientes con mayor riesgo de desarrollo de complicaciones características de la fase descompensada de la enfermedad. La transición de estadio compensado a descompensado ocurre en una tasa de 5-7% por año³⁵. Durante un seguimiento de 10 años de pacientes con cirrosis hepática compensada de origen vírico, el hepatocarcinoma se desarrolló en el 21-32% de los casos, seguido por ascitis 19,5-23%, ictericia 17%, hemorragia digestiva alta 4,5-6% y encefalopatía hepática 1-2%²¹.

2.3.5.2 Cirrosis descompensada

La cirrosis descompensada se define por la presencia de ascitis, hemorragia por varices, encefalopatía hepática y/o la aparición de ictericia³⁵. La ascitis es la complicación que marca el inicio de la fase de cirrosis descompensada en la mayoría de los casos; por lo tanto, se considera el signo clave de cirrosis descompensada³⁵. Una vez alcanzada esta fase, el pronóstico con respecto a la supervivencia marcadamente empeora con una supervivencia al año y a los dos años del 61 y el 50%, respectivamente, y una supervivencia a los 10 años del 7%³⁵.

La identificación de factores pronósticos de mortalidad en la fase descompensada es de gran relevancia, ya que estos pacientes son los que tienen mayor riesgo de muerte. Los factores que se identifican con mayor frecuencia son aquellos asociados a la disfunción circulatoria con deterioro de la función renal, la presencia de hepatocarcinoma y las variables asociadas a mayor deterioro de la función

hepática³⁵. Se pueden identificar 4 estadios clínicos o “estatus” de cirrosis con diferente pronóstico³⁵.

Estadio 1

Se caracteriza por la ausencia de varices esofágicas y de ascitis. Mientras los pacientes permanecen en este estadio, la tasa de mortalidad es inferior al 1% por año. Los pacientes salen de este estadio con una tasa acumulada del 11,4% por año, 7% debido al desarrollo de varices y 4,4% debido al desarrollo de ascitis (con o sin varices).

Estadio 2

Se caracteriza por la presencia de varices esofágicas sin ascitis y sin sangrado. Mientras los pacientes permanecen en este estadio, la tasa de mortalidad es del 3,4% por año. Los pacientes pasan a otro estadio por desarrollar ascitis (6,6% por año) o por presentar hemorragia por varices antes o al tiempo que el desarrollo de ascitis (tasa 4% por año).

Estadio 3

Se caracteriza por la presencia de ascitis con o sin varices esofágicas en un paciente que nunca ha sangrado. Mientras los pacientes están en este estadio, la tasa de mortalidad es del 20% por año, significativamente más elevada que en los otros estadios. Los pacientes salen de este estadio generalmente por hemorragia por varices (7,6% por año).

Estadio 4

Se caracteriza por hemorragia digestiva por varices con o sin ascitis. En este estadio la tasa de mortalidad anual es del 57% (alrededor de la mitad de estos fallecimientos

ocurren en las 6 semanas posteriores al episodio inicial de sangrado digestivo).

Los estadios 1 y 2 corresponden a pacientes con cirrosis compensada, mientras que los estadios 3 y 4 se refieren a cirrosis descompensada. El hepatocarcinoma puede aparecer en cualquier estadio de cirrosis con una tasa constante del 3% por año.

El trasplante hepático mejora significativamente la supervivencia y calidad de vida de pacientes con cirrosis en estadio terminal, no obstante, una proporción de pacientes importante fallece en la lista de espera de trasplante, debido al insuficiente número de donantes. La predicción adecuada de la expectativa de vida en estos pacientes es muy importante.

2.3.6 DIAGNÓSTICO

Actualmente la cirrosis hepática puede diagnosticarse atendiendo a una serie de hallazgos clínicos, resultados bioquímicos y ecográficos. No obstante el diagnóstico de certeza pasa por el examen histológico del hígado previa biopsia³⁷. El significado del llamado "perfil hepático" analiza una serie de fenómenos bioquímicos de la célula hepática normal y enferma³⁸.

2.4 PARACETAMOL

2.4.1 DESCRIPCIÓN

El paracetamol es un fármaco muy eficaz como analgésico y antipirético que no posee acción antiinflamatoria y que en general es bien tolerado y seguro en dosis terapéuticas. De hecho se considera el tratamiento de elección como antipirético y analgésico frente a otros AINE y, ya que no presenta los efectos adversos que éstos producen. Sin embargo, hay que señalar que la sobredosis aguda de paracetamol produce una lesión hepática muy grave³⁹.

2.4.2 FARMACOCINÉTICA DEL PARACETAMOL

El paracetamol se absorbe rápidamente por el intestino delgado. La velocidad de absorción depende del vaciado gástrico. Difunde bien por los tejidos y atraviesa las barreras. Es metabolizado principalmente en el hígado por tres rutas: a) conjugación con glucurónico (40-70%), b) conjugación con sulfato (25-45%) o c) oxidación por los sistemas de oxidasas de función mixta CYP2E1, 2A2 y 3A4 seguido de conjugación³⁹.

La oxidación del paracetamol produce la formación del metabolito altamente reactivo N-acetil-p-benzoquinoneimida (NAPQI). El NAPQI se combina rápidamente con glutatión (GSH) y con otros compuestos que contienen tioles, formando conjugados no tóxicos, que son eliminados por orina. Cuando la formación de NAPQI sobrepasa la concentración de GSH, el NAPQI libre se une a las proteínas intracelulares del hepatocito y causa toxicidad³⁹.

Cuando las reservas de glutatión hepático descienden por debajo de un 30%, el NAPQI libre ejerce su acción tóxica sobre el hepatocito uniéndose mediante un enlace covalente al locus neutrofílico de determinadas proteínas intracelulares, pudiendo producir la muerte celular. La necrosis inicialmente se concentra en la zona III centrolobulillar ya que es aquí donde hay un mayor metabolismo oxidativo extendiéndose al restante parénquima hepático en los casos más severos³⁹.

2.4.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Si bien las manifestaciones tempranas de toxicidad por paracetamol son leves e inespecíficas (y no predicen la gravedad de la hepatotoxicidad), son importantes de reconocer tempranamente.

Etapas I (primeras 24 h): Puede haber náuseas, vómitos, letargia, aunque puede ser completamente

asintomático.

Etapa II (24 a 72 h): Comienzan las evidencias de hepatotoxicidad en los exámenes de laboratorio, al mismo tiempo que los síntomas iniciales pueden cambiar por dolor en hipocondrio derecho, con hepatomegalia. Puede aparecer concomitantemente oliguria y pancreatitis.

Etapa III (72 a 96 h): Se llega al máximo de elevación de transaminasas, llegando en ocasiones a exceder de 10.000 IU/mL. Clínicamente puede haber ictericia, encefalopatía y coagulopatía. El 25 a 50% de los afectados presenta concomitantemente insuficiencia renal por necrosis tubular aguda.

Etapa IV (4 días a 2 semanas): Los pacientes que sobreviven la etapa anterior entran a una etapa de recuperación cuya duración depende de la gravedad del compromiso inicial. Los cambios histológicos afectan preferentemente a la zona III (centrolobulillar), que es la de mayor concentración de CYP2E1. No hay casos reportados de daño hepático crónico por paracetamol⁴⁰.

2.5 FENOBARBITAL

2.5.1 DESCRIPCIÓN

El fenobarbital es un barbitúrico con propiedades depresoras del sistema nervioso central. Se utiliza como sedante e hipnótico, y en dosis subhipnóticas como anticonvulsivante. También es conocido con el nombre de fenobarbitona³⁹.

2.5.2 MECANISMO DE ACCIÓN

Los barbitúricos, incluyendo al fenobarbital, tienen un efecto depresor del sistema nervioso central que es dependiente de la dosis. Actúan uniéndose al receptor GABA facilitando la neurotransmisión inhibitoria.

El canal de GABA es un canal para el cloruro que tiene cinco células en su entrada. Cuando los barbitúricos se fijan al canal de GABA ocasionan la apertura prolongada del canal, lo que permite el paso de iones cloruro en las células en el cerebro, aumentando la carga negativa y alterando el voltaje en las neuronas. Este cambio en el voltaje hace a las neuronas resistentes a los impulsos nerviosos ocasionando su depresión.

El fenobarbital no afecta a la función hepática normal, pero induce las enzimas microsomales hepáticas, aumentando y alterando el metabolismo de numerosos medicamentos.

2.5.3 FARMACOCINÉTICA⁴¹

El fenobarbital se absorbe bastante bien por vía oral, parenteral o rectal. Las sales se absorben más rápidamente que los ácidos. La tasa de absorción se incrementa si la sal sódica se ingiere como una solución diluida o se ingiere con el estómago vacío.

La duración de la acción, que está relacionada con la velocidad a la que el fenobarbital se redistribuye todo el cuerpo, varía entre personas y en la misma persona de vez en cuando. El fenobarbital tiene inicio de acción de 1 hora o más tiempo y la duración es de 10 a 12 horas.

El fenobarbital es un ácido débil que se absorbe y distribuye rápidamente a todos los tejidos y fluidos ocasionando altas concentraciones en el cerebro, el hígado y los riñones.

El fenobarbital es el barbitúrico menos liposoluble, el que menos se une a las proteínas del plasma, a las proteínas del cerebro, el que tarda más tiempo en ejercer su efecto y el de mayor duración.

El fenobarbital tiene una semi-vida de 53 a 118 horas (media: 79 horas) en el plasma. En los niños recién nacidos la semi vida plasmática es de 60 a 180 horas (media: 110 horas).

El fenobarbital se metaboliza principalmente por el sistema microsomal de enzimas hepáticas, excretándose la mayor parte de los productos de su metabolismo en la orina, y en menor cuantía en las heces. Aproximadamente 25 a 50 por ciento de la dosis de fenobarbital se elimina inalterado en la orina, mientras que la cantidad de otros barbitúricos excreta sin cambios por la orina es despreciable. La excreción de barbitúricos sin metabolizar es una característica que distingue a la categoría de acción prolongada de las pertenecientes a otras categorías que se metabolizan casi en su totalidad. Los metabolitos inactivos de los barbitúricos son excretados como conjugados de ácido glucurónico.

2.6 SILIMARINA

2.6.1 DESCRIPCIÓN

La silimarina, es un flavonoide antioxidante aislado del cardo mariano (*Silybum marianum (L.) Gaertn*) y se utiliza clínicamente como un desintoxicante del hígado y hepatoprotector. Varios estudios recientes han demostrado efectos anticancerígenos de la silimarina.

Se conoce que la silimarina es un compuesto de cuatro isómeros flavonolignanicos, conocidos como silibina, isosilibina, silidianina y silicristina, cuya fórmula empírica es C₂₅H₂₂O₁₀. El isómero silibina es el componente mayor y más activo, representando entre 60 y 70% del compuesto, seguido por silicristina (20%), silidianina (10%) e isosilibina (5%). Silipida es un compuesto de fosfatidilcolina de silibina el que asegura la biodisponibilidad de silibina⁹.

2.6.2 ACCIÓN TERAPÉUTICA

La silimarina actúa a nivel del hepatocito como estabilizador de la membrana celular lesionada y hace efectiva una compleja protección del hígado frente a influencias nocivas, logrando la

recuperación de las células hepáticas ya lesionadas, que se manifiesta en una mejoría del estado general, disminución de las molestias digestivas, aumento del apetito y peso, mejora de la sintomatología hepática y normalización de los valores en los análisis clínicos. Las vitaminas del complejo B constituyen una unidad funcional en el metabolismo intermedio. Influyen sobre la función enzimática en el metabolismo de la albúmina y de los hidratos de carbono. Poseen también una acción hepatoprotectora, acelerando la recuperación del parénquima hepático dañado y facilitando la función desintoxicadora del hígado. Además, si se considera la significativa disminución de las vitaminas del complejo B que se presenta en las hepatopatías por la pérdida de la capacidad de almacenamiento, la administración de vitaminas del complejo B está indicada⁴².

2.6.3 INDICACIONES

Está indicado en la terapia hepática. Lesiones de origen tóxico-metabólico, especialmente aquellos que se caracterizan por una intensa peroxidación, como por ejemplo las provocadas por la ingesta crónica del alcohol y de medicamentos hepatotóxicos: esteatosis hepática, hepatitis alcohólica, cirrosis hepática⁴².

2.6.4 MECANISMO DE ACCION DE LA SILIMARINA

La Silimarina es el principio activo de la planta *Silybum marianum*, conocida por todos como Cardo Mariano, es a la vez una de las sustancias más poderosas y protectoras que se conocen.

Su poderoso efecto protector contra intoxicaciones resulta ser eficaz incluso contra la grave intoxicación producida por la seta venenosa *Amanita falloides*, siendo capaz de contrarrestar los efectos tóxicos, prevenir la muerte y reducir considerablemente el daño hepático⁴³.

El efecto más interesante de la Silimarina sobre el hígado sea su capacidad de estimular la síntesis de proteínas. Esta estimulación

favorece la capacidad del hígado para reemplazar las células dañadas por las nuevas, regeneración hepática, pero también es interesante saber que la Silimarina no produce el mismo efecto estimulador sobre los tejidos malignos⁴⁴.

La Silimarina aumenta más de 35% los niveles de glutatión en el hígado, un aminoácido muy necesario para desintoxicar la sangre de las sustancias nocivas que se toman con los alimentos, como el alcohol, sustancias contaminantes, medicamentos y hormonas que a largo plazo pueden causar mayores daños. El Glutatión neutraliza los radicales libres, además de los residuos metabólicos y hormonales y actúa como poderoso Antioxidante, sobre todo en combinación con el Selenio, para formar la potente enzima Glutatión Peroxidasa⁴⁴.

Se ha postulado para la Silimarina un triple mecanismo de acción:

- a) Modificación de la membrana celular externa de los hepatocitos impidiendo el ingreso de las toxinas al interior de las células;
- b) Estimulación de la actividad de la polimerasa A nucleolar, aumentando la síntesis ribosomal de proteínas y la capacidad de regeneración del hígado y la formación de nuevos hepatocitos y c)
- c) un efecto antioxidante que contrarresta la acción de los radicales libres que se forman como metabolitos reactivos por acción de las toxinas y que dañan las membranas celulares⁴⁴.

2.7 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

2.7.1 TRANSAMINASAS

Son enzimas ampliamente difundidas en el organismo, que cataliza la transferencia de un grupo amino de un aminoácido, en una de las más importantes reacciones del metabolismo proteico.

El interés clínico está centrado especialmente en dos de ellas TGO (Transaminasa Glutámico Oxalacético) y TGP (Transaminasa Glutámico Pirúvica). Estas enzimas tienen acción eminentemente intracelular por lo que la actividad sérica en condiciones normales es baja o nula⁴⁵.

Un aumento de la actividad será evidencia de un deterioro de los tejidos en que se encuentran, de los cuales resulta particularmente importantes hígado y corazón.

En hepatitis virales y otras formas de enfermedad hepática que involucra necrosis de tejido, habrá también un incremento considerable de la actividad sérica de transaminasa, incluso antes de la aparición de síntomas clínicos de ictericia. En este caso. TGP será la enzima predominante debida a su gran concentración en el tejido hepático⁴⁶.

2.7.2 ALBÚMINA

Es sintetizada exclusivamente por el hígado. De ahí que sus niveles descieran a medida que la función hepática se deteriora. Debe considerarse que una tasa baja de albumina puede verse también en la insuficiencia cardiaca congestiva, en el síndrome nefrótico y en la enteropatía pierde proteínas⁴⁷.

2.7.3 BILIRRUBINA TOTAL

Los niveles de bilirrubina pueden ser normales en la cirrosis compensada pero, a medida que la enfermedad progresa se elevan de un modo gradual. De hecho la bilirrubina es uno de los parámetros utilizados en la clasificación de child-pugh para evaluar el estado de la función hepática. En los pacientes con cirrosis biliar primaria, la elevación de los niveles de bilirrubina constituye un indicador de mal pronóstico y una indicación para plantear el trasplante de hígado⁴⁷.

2.7.4 FOSFATASA ALCALINA

Esta enzima suele estar elevada pero menos de dos o tres veces el rango normal. Elevaciones más altas deben sugerir una cirrosis de origen biliar (colangitis esclerosante primaria o cirrosis biliar

primaria) también se observa elevación de la fosfatasa alcalina en casos de hepatocarcinoma⁴⁷.

2.7.5 PROTEÍNAS TOTALES

Las proteínas totales de nuestro organismo son un conjunto de compuestos orgánicos macromoleculares, de un peso molecular elevado, que están formadas por moléculas llamadas aminoácidos que se unen entre sí por enlaces peptídicos. El descenso de los niveles de proteínas totales es propio del fallo hepático terminal y de la enfermedad renal⁴⁷.

2.8 EXAMEN ANATOMOPATOLÓGICO

Actualmente la cirrosis hepática puede diagnosticarse atendiendo a una serie de hallazgos clínicos, resultados analíticos y ecográficos. No obstante, el diagnóstico de certeza pasa por el examen histológico del hígado previa biopsia.

Esta prueba, a pesar de su invasividad, se considera el estándar de oro desde la perspectiva diagnóstica.

La ecografía abdominal y la elastometría son dos pruebas complementarias muy usadas actualmente dada su escasa invasividad:

- La ecografía abdominal tiene el inconveniente de que existe una considerable variabilidad entre diferentes observadores.
- La elastometría es una técnica que mide la rigidez hepática, que depende del grado de fibrosis hepática existente⁴⁸.

Los estudios histopatológicos nos permiten determinar la patología exacta de las enfermedades hepáticas así como los verdaderos cambios celulares debido al tratamiento. En el análisis histopatológico de un hígado de rata normal se observan venas centrolobulillares permeables, definidas y con pared regular. La presencia de hematíes en las venas es mínima y el parénquima hepático se nota uniforme y es posible observar los lobulillos hepáticos con los espacios sinusoidales permeables⁴⁸.

CAPITULO III

DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 DISEÑO:

El estudio es de tipo experimental, prospectivo y longitudinal.

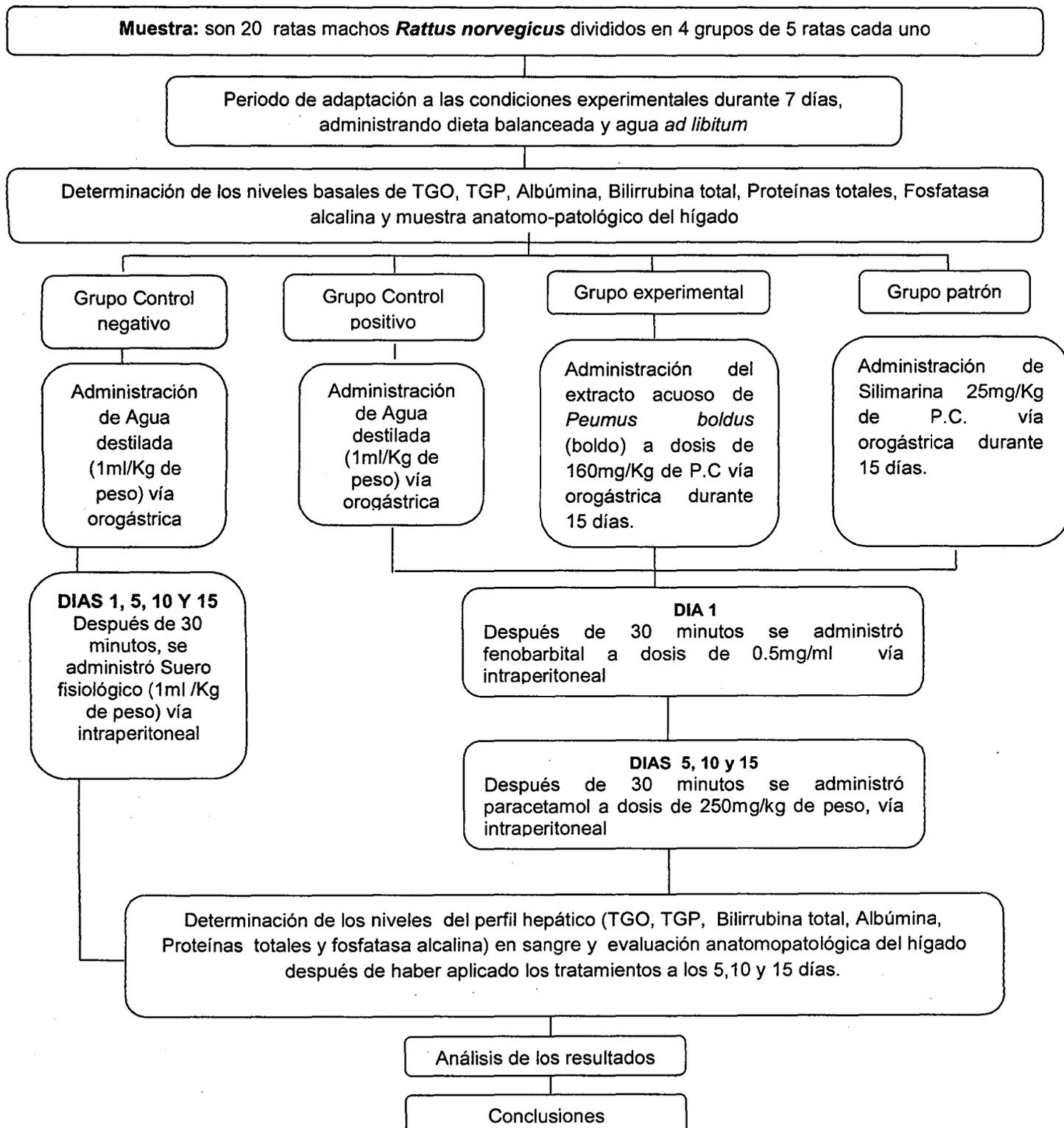
3.2 ÁMBITO DE ESTUDIO

El presente estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo Científico de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de San Agustín (CIDEC-U.N.S.A.).

3.3 MUESTRA DE ESTUDIO

La muestra consistió en 20 ratas albinas (*Rattus norvegicus*), machos sanos, de 3 meses de edad provenientes del bioterio del Centro de Investigación y Desarrollo Científico de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de San Agustín (CIDEC-U.N.S.A.), mantenidos en un régimen de libre acceso al alimento y al agua, con un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas respectivamente.

3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL



3.5 TÉCNICAS

3.5.1 Estandarización de las condiciones ambientales

Los animales fueron mantenidos en jaulas metálicas en uno de los bioterios pertenecientes a la Facultad de Medicina de la U.N.S.A.

Los animales tuvieron un periodo de aclimatación de 7 días antes de iniciado el experimento, con ciclos alternados de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, en un ambiente estándar con temperatura constante ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) y $55 \pm 5\%$ de humedad. Los rangos de temperatura fueron mantenidos mediante la utilización de un calefactor conectado a un termostato que se apagaba automáticamente cuando se excedía del rango.

Se alimentaron a las ratas con agua ad libitum y 15 gramos de concentrado para pollos de la marca TOMASINO al día, obtenido del Mercado Palomar.

Posteriormente los animales fueron divididos en 4 grupos homogéneos y equitativos de manera aleatoria.

3.5.2 Técnica para determinar el efecto protector del extracto acuoso de *Peumus boldus* (boldo).

Grupo control negativo: Constituido por 5 ratas, que recibieron agua destilada (1ml/kg de peso) durante 15 días por vía orogástrica, después de 30 minutos se les administró suero fisiológico (1ml/kg de peso) vía intraperitoneal, los días 1, 5, 10 y 15.

Grupo control positivo: Constituido por 5 ratas, que recibieron Agua destilada (1ml/kg de peso) durante 15 días por vía orogástrica, después de 30 minutos se les administró fenobarbital (0.5mg/ml) el primer día y paracetamol (250mg/Kg de peso) vía intraperitoneal, los días 5, 10 y 15.

Grupo experimental protector: Constituido por 5 ratas, a las cuales se les administró extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* (boldo) a dosis de 160mg/Kg de peso por vía orogástrica, durante los 15 días y después de 30 minutos se les administró la dosis tóxica de fenobarbital (0.5mg/ml) el primer día y paracetamol (250mg/Kg de peso), los días 5, 10 y 15 vía intraperitoneal.

Grupo patrón Constituido por 5 ratas, que recibieron un tratamiento con Silimarina (25mg/kg de peso) por vía orogástrica durante 15 días y después se administró la dosis tóxica de fenobarbital (0.5mg/ml) el primer día y paracetamol (250mg/Kg de peso), los días 5, 10 y 15 por vía intraperitoneal.

3.5.3 Técnica para la inducción de cirrosis hepática en las unidades experimentales

Fundamento

El fenobarbital es un potente estimulante hepático que in vivo produce hipertrofia e hiperplasia a este nivel. Asimismo, se ha comunicado que el tratamiento a largo plazo en ratas resulta en atrofia, disminución y pérdida de regeneración hepática³.

El paracetamol presenta efectos tóxicos dependientes de la dosis, causando necrosis de los hepatocitos. Las bases de la toxicidad por paracetamol están bien estudiadas. Al ingerir dosis grandes de la droga, el citocromo P450 (CYP2E1, CYP1A2 y CYP3A) genera cantidades de NAPQI (N-acetil-p-benzoquinonemina) capaces de agotar las reservas hepáticas de glutatión. Este metabolito tóxico se acumula fijándose por enlace covalente a aminoácidos de enzimas y otras proteínas hepáticas a las cuales inactiva, produciendo radicales libres, desarrollando necrosis hepática².

Procedimiento

La inducción de cirrosis hepática en las unidades experimentales fue con fenobarbital a dosis de 0.5mg/ml diluida en agua destilada administrado vía intraperitoneal el día 1, y paracetamol a dosis de 250mg/Kg de peso corporal administrado vía intraperitoneal los días 5, 10 y 15.

3.5.4 Elaboración del extracto acuoso de *Peumus boldus* (boldo):

Fundamento

El procedimiento que se utilizó es un método de extracción que se trabajó con un disolvente (agua) a temperatura de ebullición, en el que se introdujo hojas de boldo pulverizadas y a continuación se dejó enfriar el conjunto hasta temperatura de ambiente.

Procedimiento

Para la elaboración del extracto acuoso de boldo, se obtuvo las hojas secas de boldo de la tienda naturista "Renacer", el cual recolecta la planta de la Selva Central.

Las hojas secas de boldo se las micropulverizó en un molino de martillo marca Thomas, empleando el tamiz No. 000. Luego se almacenó el polvo en un frasco de color caramelo, en un refrigerador a 4°C hasta el día que se utilizó.

El extracto acuoso se preparó mediante el método de infusión. Para ello una vez que alcanzó su hervor 400ml de agua contenida en un matraz, se lo retiró del fuego, se le añadió 20g del pulverizado de boldo y se dejó en reposo por 30 minutos.

Luego del tiempo de reposo, se dejó por 30 minutos con agitación permanente para una mejor digestión a temperatura de 40°C, se filtró y se procedió a evaporar el solvente a baño maría durante aproximadamente 24 horas. Esta etapa finalizó cuando el volumen total del filtrado se redujo hasta la cuarta parte.

3.5.5 Determinación de la dosis del extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* (boldo)

Se usó la dosis de 160mg/Kg de peso corporal para poder determinar el efecto protector del hígado en las unidades experimentales.

Procedimiento

Cuando el volumen total del filtrado se redujo a la cuarta parte luego de la evaporación se determinó la concentración del extracto en mg/ml, se añadió a una luna de reloj previamente pesada 1 ml de la solución, luego se procedió a su secado total en una estufa, y seguidamente se pesó la luna de reloj con el material seco y expresó la concentración de 50mg/ml, de esta solución estándar se fueron extrayendo las dosis a administrar según protocolo a los animales de acuerdo a sus respectivos pesos, calculando la dosis de 160 mg/Kg de peso corporal.

3.5.6 Determinación del rendimiento de la extracción

Fundamento

La determinación del porcentaje de sólidos solubles conocido como %RE (de porcentaje de rendimiento de extracción) se basó en el método gravimétrico. El cuál consistió en la determinación de la diferencia de peso al evaporar todo el solvente del extracto obtenido.

Procedimiento

El extracto obtenido contenido en un beaker, previamente pesado, se lo llevó a baño maría hasta su sequedad total a peso constante. Luego se volvió a pesar y así se determinó mediante la siguiente fórmula, el rendimiento por diferencia de peso.

$$\%RE = \frac{\text{Peso del extracto seco}}{\text{Peso de planta seca}} \times 100$$

3.6 MÉTODOS

3.6.1 Extracción de sangre y análisis de laboratorio

Antes de la administración de tratamientos, se determinó los niveles basales del perfil hepático, para ello se sometieron a las unidades experimentales a previo ayuno de 12 horas, para posteriormente sacrificar a una rata de cada grupo y se extrajo la muestra de sangre de la arteria aorta en un capilar.

Durante la aplicación de los tratamientos a los 5, 10 y 15 días del periodo experimental, los animales, fueron sometidos a previo ayuno de 24 horas y se les extrajo la sangre por el método anteriormente mencionado. Luego se procedió a determinar las concentraciones de TGO, TGP, bilirrubina total, albúmina, proteínas totales y fosfatasa alcalina.

3.6.2 Determinación de Transaminasa Glutámico-oxalacética (TGO) y Transaminasa glutámico-pirúvica (TGP)

Método

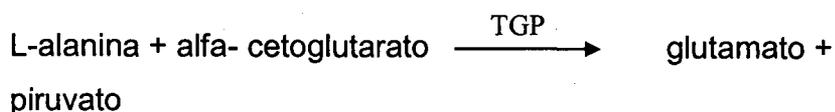
Método colorimétrico según Reitman y Frankel para la determinación de la transaminasa glutámica-oxalacética (TGO) y transaminasas glutámica pirúvica (TGP) en suero.

Fundamento del método

La TGO cataliza la siguiente reacción:



La TGP cataliza la siguiente reacción:



El piruvato o el oxalacetato formado, reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidrazina produciendo en medio alcalino, un compuesto coloreado que se mide a 505nm.

Preparación de reactivos

Sustrato TGO: solución conteniendo 100 mmol/L de L-aspartato y 2 mmol/L de alfa-cetoglutarato en buffer fosfato 100 mmol, pH 7,4

Reactivo 2,4-DNFH: solución conteniendo 1mmol/L de 2,4 DNFH en HCl 1mmol/L listo para usar.

Diluyente para enzimas concentrado: solución de Na(OH) 0,4 mol/L, preparar diluyendo a 1 litro con agua destilada según las instrucciones del rótulo. Es estable a temperatura ambiente. Estándar: listo para usar.

Procedimiento

En dos tubos de fotocolorímetro marcados B (blanco) y D (desconocido) colocar:		
	B	D
Sustrato (TGO o TGP)	100 µl	100 µl
Incubar 5 minutos a 37 °C en Baño María y agregar:		
Suero	-	20 µl
agua	20 µl	
Incubar 30 minutos a 37 °C en Baño María y agregar:		
Reactivo de color (2,4-DNFH)	100 µl	100 µl
Incubar 10 minutos a 37 °C en Baño María, luego agregar:		
NaOH 0,4 mol/L	1 ml	1 ml

Mezclar por inversión y retirar del baño. Después de 2 minutos, leer en fotocolorímetro con filtro verde (500-550nm) en espectrofotómetro a 505nm, llevando el aparato a cero D.O con agua destilada.

Cálculo de los resultados empleando tablas de conversión

Este cálculo se basa en la absorptividad del cromógeno y los valores de actividad enzimática, pueden deducirse de las tablas de conversión, siempre que las lecturas se efectúen en cubetas de caras paralelas y que los aparatos que cumplan las siguientes condiciones de medida:

- Longitud de onda : 505nm
- Semiancho de banda : ≤ 8 nm
- Espesor de cubeta : 1,00 cm

Valores normales en ratas (según Altman y Raymund, 1969)

TGO= Valor Promedio 55.4 Valor referencial 5-80 UI/L

TGP= Valor Promedio 25.2 Valor referencial 5-80 UI/L

3.6.3 Determinación de bilirrubina total

Método: Reactivo de bilirrubina total (Winkelman y colaboradores)

Fundamento: La solución de ácido sulfanílico en ácido clorhídrico diluido se combina con una solución de nitrito de sodio, se forma ácido nitroso. Este ácido inestable, que debe ser preparado en el momento para cada grupo de ensayos, reacciona para formar ácido sulfanílico diazotizado. Este, se une con la bilirrubina para producir azobilirrubina, la intensidad de color es proporcional a la concentración de la bilirrubina.

Debido a que los estándares de bilirrubina sufren un alto grado de inestabilidad, el presente método utiliza una solución acuosa de N-1-naftiletilendiamina diclorhídrica como un calibrador. Esta

amina aromática pura, estable, se une con el ácido sulfanílico diazotizado bajo las condiciones de la prueba para dar un tinte (colorante) azo con cada prueba.

Procedimiento

Pipetear en celdillas marcadas como RB 1(reactivo blanco), K (calibrador), y S (muestra) los siguientes volúmenes (ml), excepto el oxidante que es una gota, mezcle bien después de cada adición.

	RB	K	S
Reactivo "Total"	1.0	1.0	1.0
Oxidante (Gota)	1	1	1
Agua	0.05	-	-
Calibrador	-	0.05	-
Muestra	-	-	0.05

Dejar que las celdillas incuben a temperatura ambiente por un mínimo de 5 minutos.

Leer el calibrador (K) y la muestra (S) contra el reactivo blanco (RB) a 540nm antes de 30 minutos.

Valor normal de bilirrubina en ratas: 0.3 a 1.9 mg/dL.

3.6.4 Determinación de albúmina

Método: Reactivo de albúmina (método BCG)

Fundamento: El compuesto verde de Bromocresol (BCG) fue reportado como útil en la determinación cuantitativa de Albúmina en suero, el método es lineal hasta 5 g/dL, con una mínima interferencia de lípidos, Hemoglobina y Bilirrubinas. Aumentando evidentemente la especificidad y sensibilidad, con excelente correlación para los valores de Albumina, se utiliza un buffer de

citrate a baja concentración y lectura final del color a 550 nm en lugar de 630nm.

Procedimiento:

Se pipetea a cada celdilla los siguientes volúmenes (ml) y se mezcla bien.

	Reactivo Blanco (RB)	Estándar (S)	Muestra (U)
Reactivo	1.0	1.0	1.0
Estándar	-	0.01	-
Muestra	-	-	0.01

NOTA: los volúmenes pueden ser incrementados al doble si el instrumento requiere volúmenes mayores de 1.0ml.

Se mezcla el contenido de cada celdilla. Desarrollo de color inmediato

Se lee S y U contra RB a 550nm antes de 15 minutos

Valor normal de Albúmina en ratas: 3.4 a 5.4 g/dL.

3.6.5 Determinación de Proteínas totales

Método: Reactivo Proteínas Totales (Reacción de Biuret)

Fundamento

Las moléculas de proteínas contienen un largo número de péptidos unidos. Cuando se tratan con iones de cobre (Cu^{+2}) en solución alcalina, se forma un complejo coloreado entre el cobre y el Carbonil y grupos aminos de estos péptidos. Una reacción igual ocurre con el Biuret. El color violeta desarrollado es proporcional al número de uniones peptídicas de la proteína y relativamente independiente de la concentración de Albumina y Globulina.

Procedimiento

Se pipetea en celdillas perfectamente marcadas los siguientes volúmenes (mL) y se mezcla bien.

	Muestra (U)	Estandar (S)	Reactivo Blanco (RB)
Reactivo	1.0	1.0	1.0
Muestra	0.01	-	-
Estándar	-	0.01	-

NOTA: Para instrumentos que requieran más de 1.0ml el reactivo y la muestra puede usarse al doble.

Se deja los tubos incubar por lo menos 5 minutos

Se lee S y U contra RB a 550nm antes de 1 hora

Valor normal de Proteínas totales en ratas: 6.0 a 8.3 gm/dL

3.6.6 Determinación de fosfatasa alcalina

Método: Determinación Cinética-cuantitativa de la Fosfatasa Alcalina en suero

Fundamento: Los niveles de fosfatasa alcalina en suero (ALP) se puede medir utilizando varios ésteres fosfatásicos, como substratos. El procedimiento para la Fosfatasa Alcalina de Stanbio, mide la actividad de la ALP en el suero, por medio de un método cinético.



La Fosfatasa alcalina hidroliza el p-nitrofenil fosfato, para formar el p-nitrofenol y fosfatos. El p-nitrofenol es de color amarillo cuando tiene un Ph de 10.4 con una absorbancia máxima a 405 nm. La

proporción a la cual el p-nitrofenol se forma, es directamente proporcional con la actividad de la Fosfatasa Alcalina.

Procedimiento

Para cada muestra y control, se añade 1.0 ml del reactivo reconstituido dentro de la cubeta o en un tubo de prueba y se incuba por 3 minutos a 37°C.

Se agrega 20 μ L (0.020ml) de suero a sus respectivos tubos y se mezcla suavemente.

Se lee y se anota el cambio en la absorbancia cada minuto. Se continúa incubando a 37°C y se anota a los 2 y 3 minutos. Los valores deben ser constantes.

Se determina el promedio de la absorbancia por minuto(A/Min), se multiplica por el factor 2764 para obtener resultados en U/L.

Valor normal de fosfatasa alcalina en ratas: 44 a 147 UI/L

3.6.7. Evaluación histo-patológica por método de Harris

a) Obtención de la muestra

Los animales fueron sacrificados por inhalación de éter. Inmediatamente después de sacrificado el animal, se procedió a diseccionar y extraer el hígado.

b) Fijación

El proceso de fijación preserva los tejidos deteniendo la autólisis y a la vez permite que los tejidos permanezcan sin cambios apreciables luego de subsecuentes tratamientos. La fijación se realizó inmediatamente después de obtenidos los trozos de los órganos ya que cualquier demora seca el tejido y acelera la autólisis.

Las muestras se fijaron en formol al 10%, seguidamente se hicieron los cortes necesarios, los cuales tuvieron un grosor de 3 a 5 mm, los mismos que fueron colocados nuevamente en formol

al 10% por una hora, debidamente etiquetados o rotulados para su fijación.

c) Deshidratación y aclaración

❖ **Deshidratación**

Para remover toda el agua de las muestras (tejidos), se tuvo el siguiente recorrido:

Agua corriente,	1 hora
Alcohol 70%	1 hora
Alcohol 80%	1 hora
Alcohol 90%	1 hora
Alcohol 95%	1 hora
Alcohol 100%	1 hora
Alcohol 100%	1 hora

❖ **Aclaración:**

En Xilol puro I	por 1 hora
En Xilol puro II	por 1 hora

d) Inclusión

Las muestras procedentes del xilol II se sumergieron en recipientes con parafina, este proceso de sumergir el tejido en una sustancia firme tal como la parafina es el medio de inclusión más utilizado con más frecuencia. Una vez incluidos los tejidos en la parafina I se llevó la muestra a la estufa a una temperatura de 60° C por espacio de 1 hora se trasladaron a la parafina II, también a temperatura de 60° C por espacio de 1 hora para luego proceder al bloqueo de las muestras.

e) Corte

Una vez extraídos los tejidos de la parafina, se procedió a la orientación e inclusión de tejidos en los moldes (placas de Leukart) con parafina diluida (caliente), para la orientación de la muestra se usó pinzas.

Los bloques formados fueron llevados a refrigeración por espacio de 1 hora, para endurecer la parafina lo cual favorece con el corte

de las muestras, se procedió al corte mediante el micrótopo deslizante.

El corte de las muestras nos permitió obtener "las cintas" de las mismas. Estas cintas mediante pinzas se colocaron en un flotador de tejidos (que contenía agua caliente: Baño María 50°C). El Baño María extiende los cortes histológicos (evitar la presencia de arrugas y aire atrapado); una vez bien extendidos los cortes, estos se colocaron en las láminas portaobjetos recubiertas con albumina de Mayer (que favorece la adhesión de los cortes).

f) Coloración con Hematoxilina – Eosina

Para teñir los cortes histológicos adheridos en los portaobjetos se siguieron los siguientes pasos:

Se empezó colocando las láminas portaobjetos en el xilol (xilol I) por 15 minutos para eliminar la parafina de los cortes; luego se pasó al otro recipiente con xilol (xilol II) para completar la eliminación de la parafina. Después las láminas se trasladaron a los alcoholes de una batería de hidratación:

Alcohol 100%	1 minuto
Alcohol 100%	1 minuto
Alcohol 95%	1 minuto
Alcohol 90%	1 minuto
Alcohol 80%	1 minuto
Alcohol 70%	1 minuto
Agua corriente,	1 minuto

Luego se procedió a la coloración siguiendo los siguientes pasos:

Hematoxilina de Mayer,	5 minutos
Agua corriente,	10 minutos
Agua destilada,	1 minuto
Eosina,	20 segundos
Alcohol 70%	1 minuto
Alcohol 80%	1 minuto

Alcohol 90%	1 minuto
Alcohol 95%	1 minuto
Alcohol 100%	1 minuto
Alcohol 100%	1 minuto

Finalmente se procedió al montaje (final de los cortes teñidos) usando unas gotas de bálsamo de Canadá y laminillas cubreobjetos. Se dejó secar el bálsamo para luego hacer las evaluaciones correspondientes y etiquetar las láminas⁵⁰.

g) Diagnóstico anatomopatológico

El diagnóstico anatomopatológico de las muestras obtenidas del hígado se realizó en el laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de San Agustín por la Doctora Rocío Quequezana.

EVALUACIÓN DEL DAÑO HEPÁTICO SISTEMA SCHEUER

GRADO	ACTIVIDAD PORTAL PERIportal	ACTIVIDAD LOBULILLAR	FIBROSIS
0	Ninguna o mínima	Ninguna	
1	Inflamación portal	Inflamación sin necrosis	Ninguna
2	Necrosis leve	Necrosis focal	portal
3	Necrosis moderada	Daño celular focal intensa	Fibrosis con distorsión de la arquitectura
4	Necrosis severa	Necrosis en puentes	cirrosis

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresaron como promedios. Se aplicó ANOVA para establecer las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los promedios de TGO, TGP, bilirrubina total, albúmina, proteínas totales y fosfatasa alcalina en los diferentes tratamientos evaluados y se aplicó la prueba de significación de Tukey para establecer el mejor tratamiento según los efectos de *Peumus boldus* (boldo) en *Rattus norvegicus* frente a la inducción de cirrosis hepática con fenobarbital y paracetamol. Se utilizó el paquete estadístico computarizado SPSS versión 12 para Windows 2008.

3.8 RECURSOS

a) Recursos humanos

- Bachilleres de Ciencias de la Nutrición
- Asesor

b) Recursos biológicos

- Hojas de *Peumus boldus* (boldo)
- *Rattus norvegicus* variedad Sprague Dawley.

c) Equipos

- Balanza analítica
- Centrífuga
- Microcentrífuga
- Estufa
- Cocina Eléctrica
- Microscopio
- Rotavapor
- Agitador

d) Recursos de laboratorio

- Bagueta
- Embudo
- Hojas de bisturí
- Tubos de ensayo
- Espátula
- Gradilla

- Mortero
- Papel filtro
- Pipetas de 1, 5 y 10 ml
- Soporte universal
- Termómetro
- Vaso precipitado
- Matríz
- Micropipetas
- Fiolas
- Probeta
- Luna de reloj
- Frasco color caramelo

e) Reactivos

- Kit para TGP, TGO. Sensibilidad 95%, especificidad 98%.
- Fenobarbital
- Paracetamol
- Silimarina
- Éter
- Formol al 10%

f) Material anexo

- Jaula metálica
- Algodón
- Agua destilada
- Alcohol
- Esparadrapo
- Jeringa antituberculina de 1ml
- Toallas

g) Recursos Financieros

- Autofinanciado

CAPITULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIONES

TABLA 1

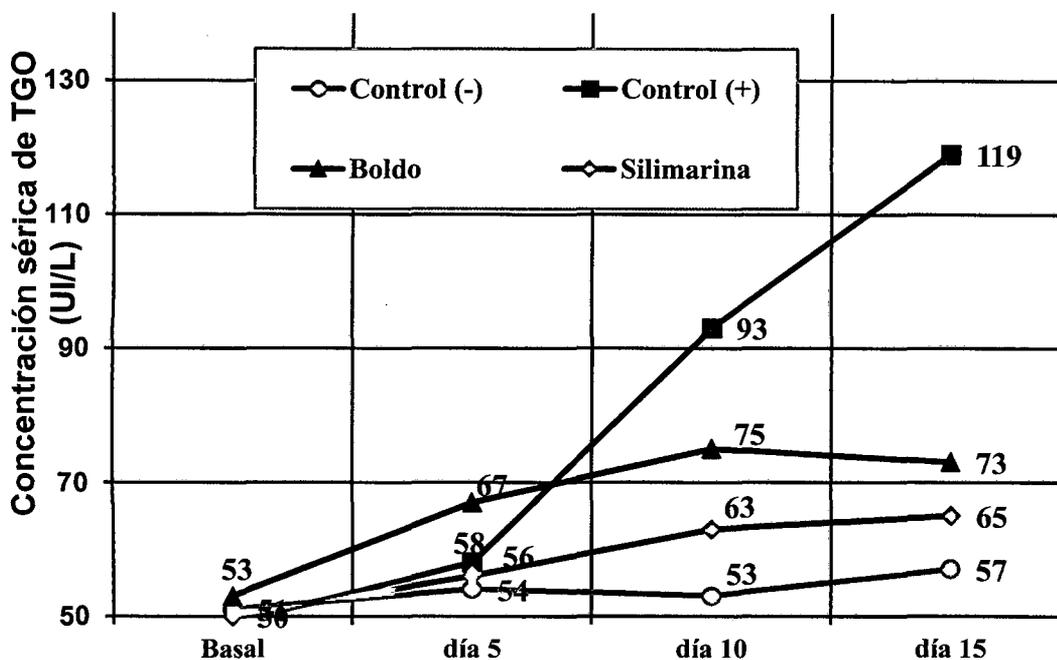
Evolución a través del tiempo del efecto hepatoprotector de la administración de 160mg/Kg de peso de *Peumus boldus* (boldo), observado a través de Aspartatoaminotransferasa (AST).

GRUPOS	TIEMPO DE ESTUDIO				N
	Basal	Día 5	Día 10	Día 15	
Control (+)	49 ± 6,7	58 ± 7,9	93 ± 12	119 ± 8,6	5
Experimental Boldo 160mg/Kg	53 ± 5,9	67 ± 8,2	75 ± 6,4	73 ± 9,7 ^{&}	5
Patrón Silimarina 25mg/Kg	50 ± 8,0	56 ± 7,4	63 ± 8,2 ^{&}	65 ± 5,1 [*]	5
Control (-)	51 ± 7,5	54 ± 4,5	53 ± 5,2 ^{&}	57 ± 7,2 [*]	5

- La actividad de la transaminasa AST/TGO se expresó en unidades internacionales por litro (UI/L) de suero ± Desviación Estándar.

- El análisis estadístico se realizó entre las medias para cada día, mediante el análisis de varianza y la prueba de significación de Tukey modificada con una exigencia del 99%.
- *, altamente significativo ($p < 0,01$) con respecto al valor control (+);
- &, significativo ($p < 0,05$) con respecto al valor control.

GRÁFICO N° 1



Describe la curva de la Transaminasa Glutámica Oxalacética (TGO), hoy denominada Aspartatoaminotransferasa (AST), en la cual se observa que:

No hay diferencia significativa en los grupos control negativo, protector y patrón, durante los 15 días de experimentación, sin embargo en el grupo control positivo, a partir del día 5 hasta el día 15, la enzima se elevó significativamente comparada con los otros grupos. Ello se podría explicar debido a que la injuria hepática inducida por paracetamol conlleva a la pérdida de la integridad de la membrana hepatocelular y por lo tanto a la salida de las enzimas hepáticas a la circulación, produciendo la elevación de sus niveles séricos.

Los niveles elevados de TGO en el grupo control positivo podría explicarse como un indicador de daño hepático, como el causado por hepatitis viral, sin embargo

también pueden indicar infarto cardiaco y daño muscular debido a que ésta enzima se encuentra en otros órganos como el músculo cardiaco, músculo esquelético, riñones, cerebro, páncreas, pulmones, eritrocitos leucocitos, además la acción del paracetamol en uso continuo o una sobredosis, pueden ocasionar hepatotoxicidad y nefropatía, debidas a la producción de un metabolito oxidativo en el hígado y el riñón, que ocasiona necrosis celular al unirse con proteínas que contengan azufre.

Según Coaquira R y Orellano N, en su investigación titulada "Efectos del *Silybum marianum* (Cardo mariano) en *Rattus norvegicus* variedad Sprague dawley con daño hepático inducido por tetracloruro de carbono, Arequipa 2011", se evidenció el poder fitoterapéutico ante el daño hepático, los resultados mostraron disminución significativa en la actividad de la TGO y TGP en dos grupos experimentales que recibieron vía oral *Silybum marianum* (cardo mariano) a dosis de 10 y 20 mg/kg/día. El grupo que recibió *Silybum marianum* (cardo mariano) a dosis de 10 mg/kg/día, respondió de manera más efectiva al tratamiento registrando los menores niveles de TGO y TGP en plasma, a nivel histopatológico el grupo experimental (20mg/kg/día de *Silybum marianum*) y el grupo control (1.5 mg/kg/día de hepabionta) mostraron mejoría en el grado de esteatosis y en disposición arquitectural de los hepatocitos en relación al grupo blanco y experimental (10mg/kg/día de *Silybum marianum*) .

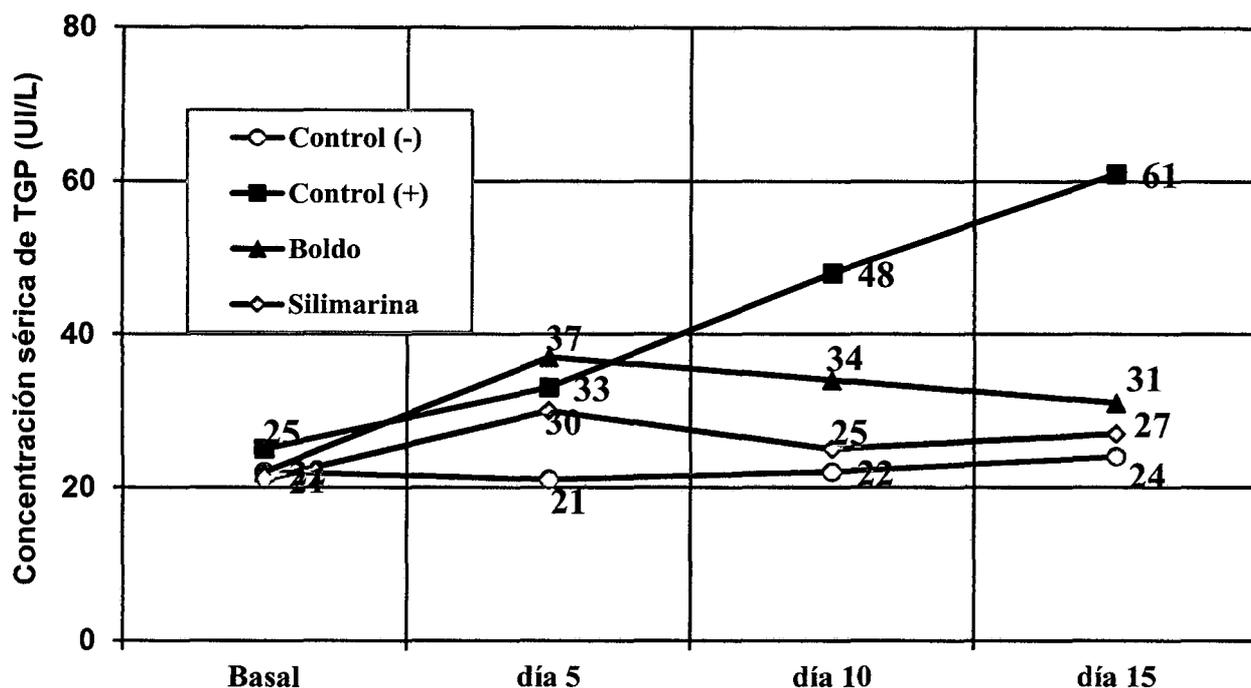
TABLA 2

Evolución a través del tiempo del efecto hepatoprotector de la administración de 160mg/Kg de peso de *Peumus boldus* (boldo), observado a través de Alaninaminotransferasa (ALT).

GRUPOS	TIEMPO DE ESTUDIO				N
	Basal	Día 5	Día 10	Día 15	
Control (+)	25 ± 5,1	33 ± 5,8	48 ± 6,9	61 ± 8,1	5
Experimental Boldo 160mg/Kg	22 ± 5,7	37 ± 7,3	34 ± 7,1&	31 ± 5,4*	5
Patrón Silimarina 25mg/Kg	21 ± 6,0	30 ± 6,6	25 ± 7,3*	27 ± 6,1*	5
Control (-)	22 ± 4,1	21 ± 7,3	22 ± 6,6*	24 ± 6,8*	5

- La actividad de la transaminasa ALT/TGP se expresó en unidades internacionales por litro (UI/L) de suero ± Desviación Estándar.
- El análisis estadístico se realizó entre las medias para cada día, mediante el análisis de varianza y la prueba de significación de Tukey modificada con una exigencia del 99%.
- *, altamente significativo ($p < 0,01$) con respecto al valor control (+);
- & significativo ($p < 0,05$) con respecto al valor control.

GRÁFICO N° 2



Describe la curva de la Transaminasa Glutámica Pirúvica (TGP), hoy denominada Alaninaminotransferasa (ALT), en la cual se observa que:

No hay diferencia significativa en los grupos, control negativo, protector (boldo) y patrón, durante los 15 días de experimentación.

En el grupo control positivo, a partir del día 5 hasta el día 15, la enzima se elevó significativamente comparada con los otros grupos.

Los resultados muestran que la TGP es más específica que la TGO, debido a que la primera se localiza casi exclusivamente en el citosol del hepatocito, mientras que la TGO, además del citosol y mitocondria se encuentra en el corazón, músculo esquelético, riñones, cerebro, páncreas, pulmón, eritrocitos y leucocitos.

Según Luque K. y Pizarro R. (2013) en su investigación titulada "Efecto protector y regenerativo del extracto acuoso de las hojas de *Schinus molle* (molle) en ratas *Rattus norvegicus* con daño hepático inducido por paracetamol, Arequipa 2012" encontraron las siguientes conclusiones: el tratamiento con el extracto acuoso de

molle ejerce un efecto protector y regenerativo del hígado de ratas intoxicadas con paracetamol, siendo las dosis de 2.0 g/kg la que manifestó tener un mayor efecto evidenciado a través de la disminución significativa de TGO, TGP y GGT comparados con los niveles del grupo control. Histopatológicamente se observó una mejoría de grado severo a moderado en el grupo regenerativo y de grado severo a ligero en el grupo protector.

El extracto acuoso de Boldo basa su potencia antioxidante en compuestos importantes como los flavonoides y las catequinas que se conservan ambos solubles en agua; diversos estudios demuestran los efectos colagogos y coleréticos además de ser considerado como estimulante y protector hepático frente a diversos agentes potencialmente nocivos

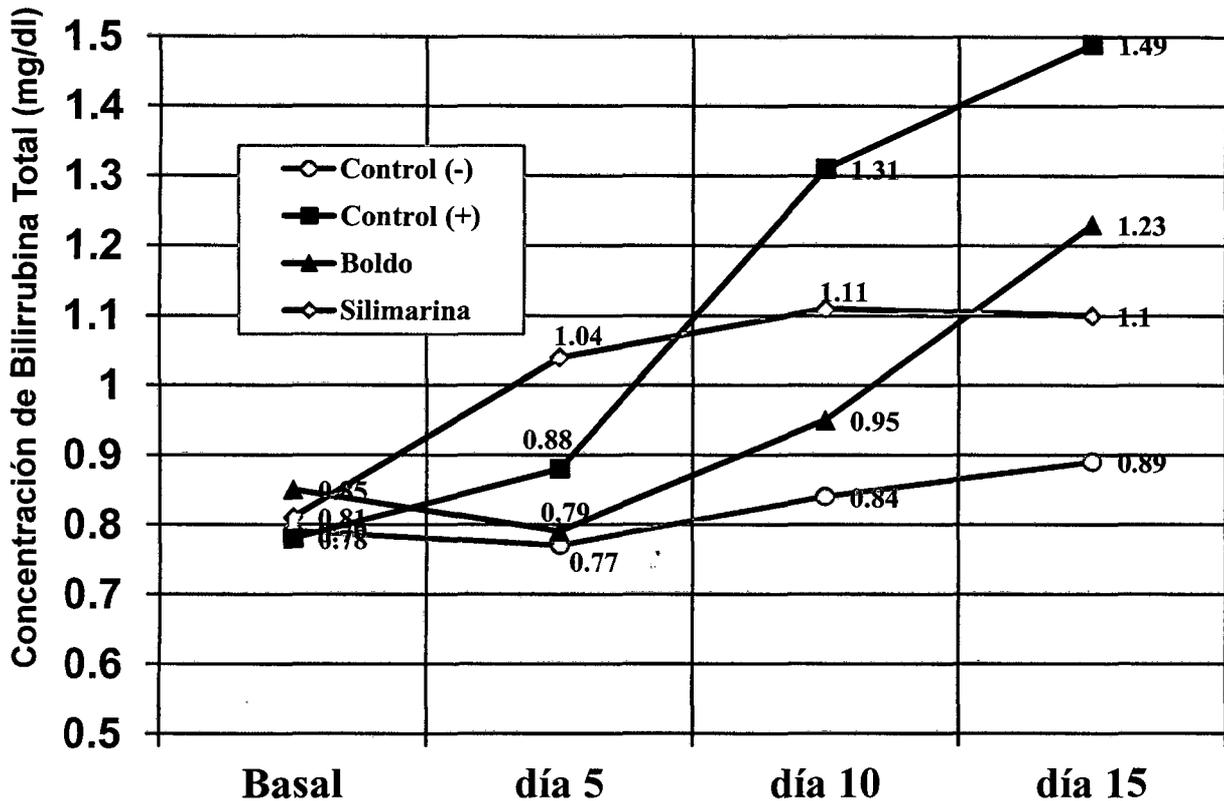
TABLA 3

Evolución a través del tiempo del efecto hepatoprotector de la administración de 160mg/Kg de peso de *Peumus boldus* (boldo), observado a través de la concentración sérica de bilirrubina total.

GRUPOS	TIEMPO DE ESTUDIO				N
	Basal	Día 5	Día 10	Día 15	
Control (+)	0,78 ± 0,07	0,88 ± 0,03	1,31 ± 0,12	1,49 ± 0,15	5
Experimental Boldo 160mg/Kg	0,85 ± 0,09	0,79 ± 0,02	0,95 ± 0,09	1,23 ± 0,13	5
Patrón Silimarina 25mg/Kg	0,81 ± 0,1	1,04 ± 0,07	1,11 ± 0,13	1,10 ± 0,12	5
Control (-)	0,79 ± 0,06	0,77 ± 0,04	0,84 ± 0,07	0,89 ± 0,09 ^{&}	5

- La actividad de bilirrubina total se expresó en miligramos por decilitro (mg/dl) de suero ± Desviación Estándar.
- El análisis estadístico se realizó entre las medias para cada día, mediante el análisis de varianza y la prueba de significación de Tukey modificada con una exigencia del 99%.
- *, altamente significativo ($p < 0,01$) con respecto al valor control (+);
- & significativo ($p < 0,05$) con respecto al valor control.

GRÁFICO N° 3



Describe la curva de Bilirrubina total, en la cual se observa que:

Los promedios de la medición basal de ésta fueron similares en todos los grupos, no encontrándose diferencia significativa. A partir del día 5 hasta finalizar el experimento la medición final y la variación de bilirrubinas totales fue mayor en el grupo control positivo, comparado con los demás grupos.

En el grupo protector (boldo) la elevación de bilirrubina total indica que existe también un componente colestásico, junto con el hepatocelular.

La bilirrubina es un producto de la destrucción de los glóbulos rojos, que es eliminado de la circulación mediante su conjugación hepática y secretado en la bilis. Sin embargo, los niveles de ésta pueden incrementarse cuando disminuye su captación hepática, disminuye su conjugación, su secreción o existe un bloqueo en las vías biliares.

El consumo de boldo estimula la producción de bilis (puede duplicar el flujo de la bilis) y la salida del fluido desde la vesícula, lo cual favorece la digestión y

combate los síntomas derivados de un mal funcionamiento del hígado o de la vesícula (flatulencia y espasmos intestinales). Por lo mencionado anteriormente, se puede inferir que la administración de extracto acuoso de boldo provocó la elevación de niveles de bilirrubinas totales gracias a su propiedad colerético.

Según Olivares J., en su investigación titulada "Efecto protector del extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* "boldo" en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas holtzman hembra, Lima 2015" encontró los siguientes resultados: Los promedios de la medición basal de éstas fueron similares en todos los grupos experimentales, no encontrándose diferencia significativa. Al finalizar el experimento la medición final y la variación de bilirrubinas totales fue mayor en el grupo B (rifampicina 100 mg/kg de peso), comparado con los demás grupos, hallándose diferencia significativa entre los grupos experimentales ($p=0.00$).

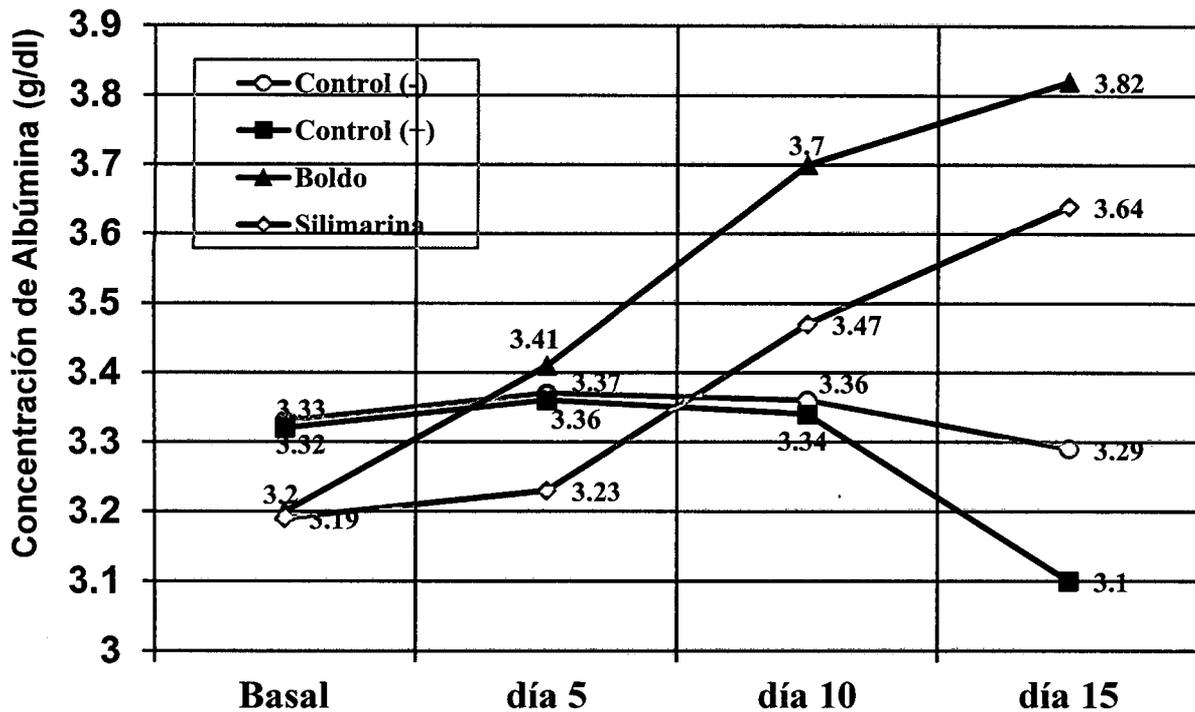
TABLA 4

Evolución a través del tiempo del efecto hepatoprotector de la administración de 160mg/Kg de peso de *Peumus boldus* (boldo), observado a través de la concentración sérica de albúmina.

GRUPOS	TIEMPO DE ESTUDIO				N
	Basal	Día 5	Día 10	Día 15	
Control (+)	3,32 ± 0,2	3,36 ± 0,4	3,34 ± 0,18	3,1 ± 0,21	5
Experimental Boldo 160mg/Kg	3,2 ± 0,26	3,41 ± 0,5	3,70 ± 0,63*	3,82* ± 0,40	5
Patrón Silimarina 25mg/Kg	3,19 ± 0,28	3,23 ± 0,18	3,47 ± 0,52	3,64 ^{&} ± 0,27	5
Control (-)	3,33 ± 0,18	3,37 ± 0,36	3,36 ± 0,42	3,29 ± 0,34	5

- La actividad sérica de albúmina se expresó en gramos por decilitro (g/dl) de suero ± Desviación Estándar.
- El análisis estadístico se realizó entre las medias para cada día, mediante el análisis de varianza y la prueba de significación de Tukey modificada con una exigencia del 99%.
- *, altamente significativo ($p < 0,01$) con respecto al valor control (+);
- & significativo ($p < 0,05$) con respecto al valor control.

GRÁFICO N° 4



Describe la curva de albúmina, en la cual se observa que:

La concentración de albumina en los grupos control negativo y control positivo fueron similares desde sus niveles basales hasta el día 10, posteriormente los niveles del grupo positivo disminuyeron significativamente.

Los grupos patrón (silimarina) y protector (boldo) tuvieron un incremento desde sus niveles basales hasta el término de la experimentación, debido al aumento en la asimilación de las proteínas proporcionadas por la dieta.

Los niveles de albúmina fueron menores en el grupo control positivo comparado con los otros grupos. Ello se podría explicar debido a que la injuria hepática inducida por fenobarbital y paracetamol conlleva a la pérdida de la integridad de la membrana hepatocelular y por lo tanto a la salida de las enzimas hepáticas a la circulación, produciendo la elevación de sus niveles séricos.

Ello se corrobora por los hallazgos encontrados en el trabajo realizado por Yovera E., en su investigación titulada "Efecto protector del extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* "boldo" en la toxicidad hepática inducida por

isoniazida en ratas holtzman hembra, Lima 2015" encontró los siguientes resultados: se utilizaron 24 ratas Holtzman hembra, divididas en 4 grupos: A (control), B (isoniazida 50 mg/kg), grupo C (silimarina 200 mg/kg e isoniazida 50 mg/kg) y D (boldo 160 mg/kg e isoniazida 50 mg/kg). Se halló que el grupo B disminuyó más de peso (16,41 +/-17,94 gr), presentó mayor elevación de bilirrubinas totales (0,25 +/-0,13), bilirrubina directa (0,2 +/-0,11), TGO (51.83 +/-18.55) y TGP (29 +/- 13,72), en comparación con el grupo A, C y D. Se halló también menor elevación de proteínas totales (0,49 +/-0,62) y albuminas (0,33 +/-0,35) en el grupo B, en comparación con los demás grupos. No se halló diferencia significativa entre los grupos en cuanto a la variación de bilirrubina indirecta ($p = 0,104$) y globulinas ($p = 0,144$).

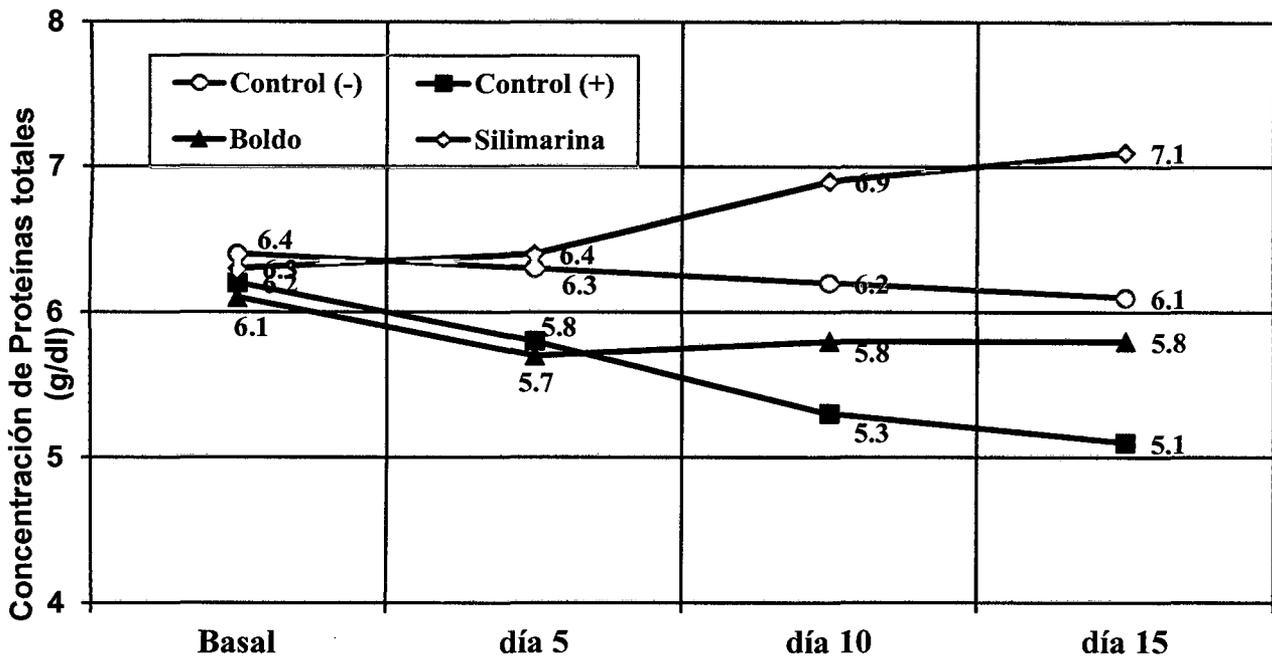
TABLA 5

Evolución a través del tiempo del efecto hepatoprotector de la administración de 160mg/Kg de peso de *Peumus boldus* (boldo), observado a través de la concentración sérica de proteínas totales.

GRUPOS	TIEMPO DE ESTUDIO				N
	Basal	Día 5	Día 10	Día 15	
Control (+)	6,2 ± 0,5	5,8 ± 0,7	5,3 ± 0,9	5,1 ± 0,3	5
Experimental Boldo 160mg/Kg	6,1 ± 0,38	5,7 ± 0,3	5,8 ± 0,6	5,8 ± 0,7	5
Patrón Silimarina 25mg/Kg	6,3 ± 0,34	6,4 ± 0,51	6,9 ± 0,6 ^{&}	7,1 ± 0,62 [*]	5
Control (-)	6,4 ± 0,4	6,3 ± 0,47	6,2 ± 0,58	6,1 ± 0,44	5

- La actividad sérica de proteína se expresó en gramos por decilitro (g/dl) de suero ± Desviación Estándar.
- El análisis estadístico se realizó entre las medias para cada día, mediante el análisis de varianza y la prueba de significación de Tukey modificada con una exigencia del 99%.
- *, altamente significativo ($p < 0,01$) con respecto al valor control (+);
- & significativo ($p < 0,05$) con respecto al valor control.

GRÁFICO N° 5



Describe la curva de proteínas totales, en la cual se observa que:

Los valores basales de este marcador fueron similares en todos los grupos y no se halló diferencia significativa entre ellos.

Al finalizar los tratamientos los grupos patrón (silimarina) y control negativo fueron elevados, en el grupo protector (boldo) se halló menor incremento comparados con el grupo control positivo, el cual disminuyo progresivamente hasta finalizar el tratamiento.

La toxicidad hepática producida por la administración de paracetamol ha sido descrita por diversos autores. Existen estudios que muestran que el paracetamol se metaboliza a nivel hepático por varias vías, conduciendo una de ellas a la reacción de conjugación con el ácido glucurónico, mientras que la segunda vía se conjuga con el sulfato, reacciones que toman inocuo al paracetamol, en cambio, existe otra reacción que lo conduce a la formación de N-acetil imidoquinona, compuesto que tiene la propiedad de realizar un ataque nucleofílico a diversos componentes celulares.

Según Arroyo J. et. al., en su investigación titulada “Efecto protector en cirrosis hepática inducida en ratas del extracto etanólico de las hojas de matico (*Piper aduncum*) comparado con silimarina, Lima 2012” encontraron los siguientes resultados: El extracto y el fitomedicamento a 200 mg/kg disminuyeron los valores de TGP ($p < 0,621$), bilirrubina total ($p < 0,385$) y bilirrubina directa ($p < 0,283$) e incrementaron las proteínas totales ($p < 0,539$) y albúmina ($p < 0,114$), similar al grupo silimarina. El colágeno, la fibrosis y el nivel de daño hepático se vieron aumentados con tetracloruro de carbono; estos indicadores se redujeron con los diferentes tratamientos y la silimarina. El marcador de estrés oxidativo se redujo con los tratamientos aplicados ($p < 0,002$). La silimarina ha ratificado su efecto protector sobre el daño inducido en el hígado, como se evidenció en esta investigación.

Por su parte, la silimarina ha sido ampliamente estudiada como hepatoprotectora en diversos modelos animales. Es así que en el estudio realizado por M Singh *et. al.*, se halló reversión significativa del daño hepático en los grupos a los que se les aplicó silimarina.

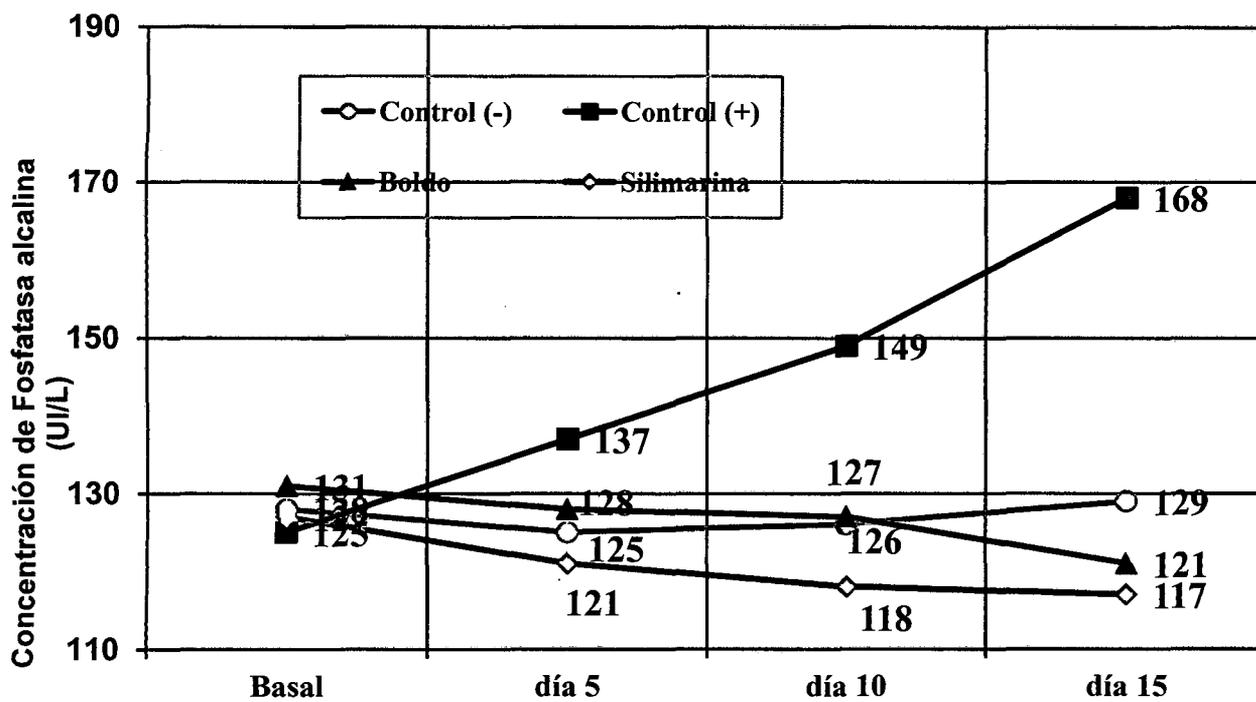
TABLA 6

Evolución a través del tiempo del efecto hepatoprotector de la administración de 160mg/Kg de peso de *Peumus boldus* (boldo), observado a través de la concentración sérica de fosfatasa alcalina.

GRUPOS	TIEMPO DE ESTUDIO				N
	Basal	Día 5	Día 10	Día 15	
Control (+)	125 ± 23,8	137 ± 18,7	149 ± 26,3	168 ± 35,2	5
Experimental Boldo 160mg/Kg	131 ± 22,6	128 ± 17,6	127 ± 25,9	121 ± 19,5*	5
Patrón Silimarina 25mg/Kg	127 ± 18,7	121 ± 15,6	118 ± 11,3&	117 ± 12,4*	5
Control (-)	128 ± 20,0	125 ± 18,9	126 ± 23,3	129 ± 19,7	5

- La actividad sérica de proteína se expresó en unidades internacionales por litro (UI/L) de suero ± Desviación Estándar.
- El análisis estadístico se realizó entre las medias para cada día, mediante el análisis de varianza y la prueba de significación de Tukey modificada con una exigencia del 99%.
- *, altamente significativo ($p < 0,01$) con respecto al valor control (+);
- & significativo ($p < 0,05$) con respecto al valor control.

GRÁFICO N° 6



Describe la curva de fosfatasa alcalina, en la cual se observa que:

En el grupo control positivo los niveles de fosfatasa alcalina se elevan progresivamente durante el tiempo de tratamiento, mientras los valores de los grupos patrón, control negativo y grupo protector se mantienen por debajo de su valor inicial.

El efecto protector del boldo se observa a partir del día 5, disminuyendo los valores de fosfatasa alcalina cercanos a los obtenidos por el grupo patrón.

El paracetamol es un medicamento que, administrado a elevadas dosis, causa daño hepático. Este proceso se realiza por generación de radicales libres. En tal sentido, la administración de sustancias con propiedades antioxidantes podría evitar o disminuir el efecto tóxico de la mencionada droga.

Al estudiar los investigadores en un grupo de ratas el efecto hepatotóxico del tetracloruro de carbono, se observó una disminución en la albúmina sérica y

proteínas totales acompañadas de un incremento en AST, ALT y fosfatasa alcalina; también, hubo alteraciones hepáticas, como esteatosis, degeneración hidrópica y necrosis. Al mismo tiempo, administraron a otro grupo de ratas, CCl₄ y un extracto de *Centella asiática* y observaron una acción hepatoprotectora, que fue atribuida a la presencia de asiaticósido (14,5%) en el extracto⁵¹.

Por lo mencionado anteriormente, se puede inferir que la administración de Extracto Acuoso de Boldo revirtió significativamente la elevación de marcadores séricos como las enzimas TGO, TGP, niveles de bilirrubinas totales y fosfatasa alcalina e incrementó la síntesis hepática de proteínas (proteínas totales y albúmina) y con ello sus niveles séricos.

En las enfermedades hepáticas suelen presentarse en dos diferentes formas: agudas y crónicas. En las enfermedades agudas hay un repentino daño que afecta al hígado entero. A corto plazo, la falla hepática amenaza la vida, pero si el paciente sobrevive, el poder de regeneración del hígado le da una buena oportunidad de que se restablezcan las funciones normales.

Desde 1975, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido la importancia de las medicinas tradicionales en el control de la salud y ha generado un programa orientado a la promoción de la medicina tradicional en los países desarrollados⁵².

Diversas investigaciones han descubierto compuestos que presentan efectos protectores hepáticos y cuyo uso sería fundamental en diversas patologías como las hepatopatías inducidas por fármacos, hepatopatías virales, entre otras. Dentro de éstos tenemos una amplia gama de plantas medicinales, en la que destacamos a la planta del boldo (*Peumus boldus*)⁵³.

Las infusiones acuosas de hojas secas de boldo (*Peumus boldus*) se han utilizado por mucho tiempo como un digestivo casero y como terapia coadyuvante para las enfermedades crónicas de hígado. Entre las muchas cualidades medicinales que se le atribuye a las hojas del boldo se incluyen propiedades coleréticas y colagogas, además de ser considerado como estimulante y protector hepático frente a diversos agentes potencialmente nocivos⁵³.

Figura 1

Hígado normal del Grupo Control Negativo (coloración Hematoxilina-eosina)
(40x)

1. No se observa necrosis.
2. Disposición de los hepatocitos en columna (sinusoides normales)

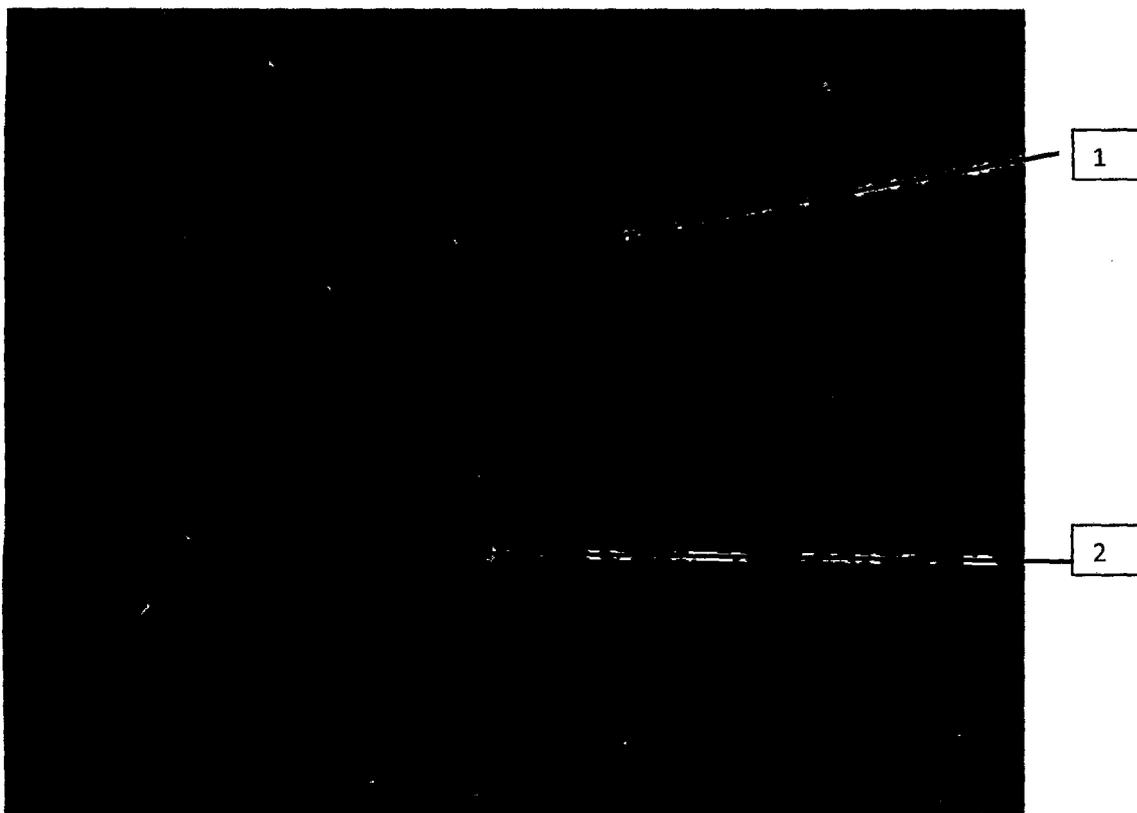


Figura 2

Hígado del Grupo Control Positivo (Coloración Hematoxilina-Eosina) (40x)

1. Se observa necrosis severa.
2. Espacio portal alterado.
3. Se observa destrucción de hepatocitos con restos nucleares.
4. Presencia de hipertrofia de células de Kupffer

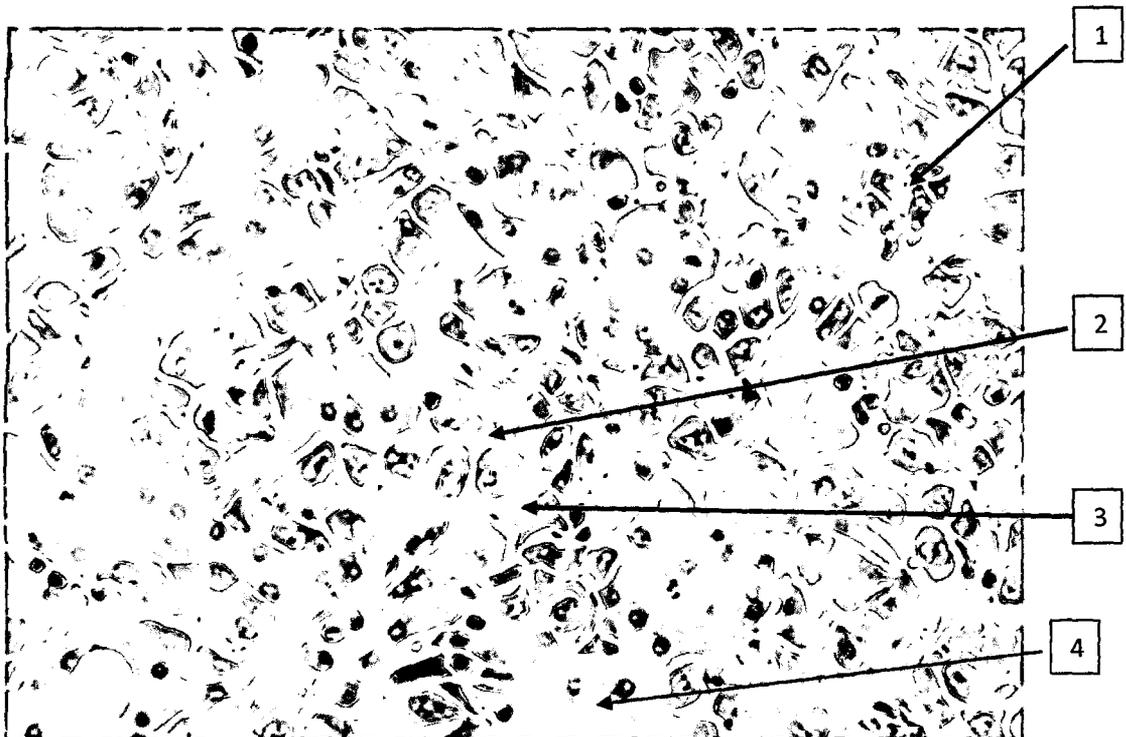


Figura 3

Hígado del Grupo Protector - Boldo (Coloración hematoxilina-Eosina) (40x)

1. Presencia de ligera necrosis.
2. Espacio portal prácticamente normal.
3. Células de kupffer de histología normal.
4. Existencia de hepatocitos binucleados. Señal de regeneración.

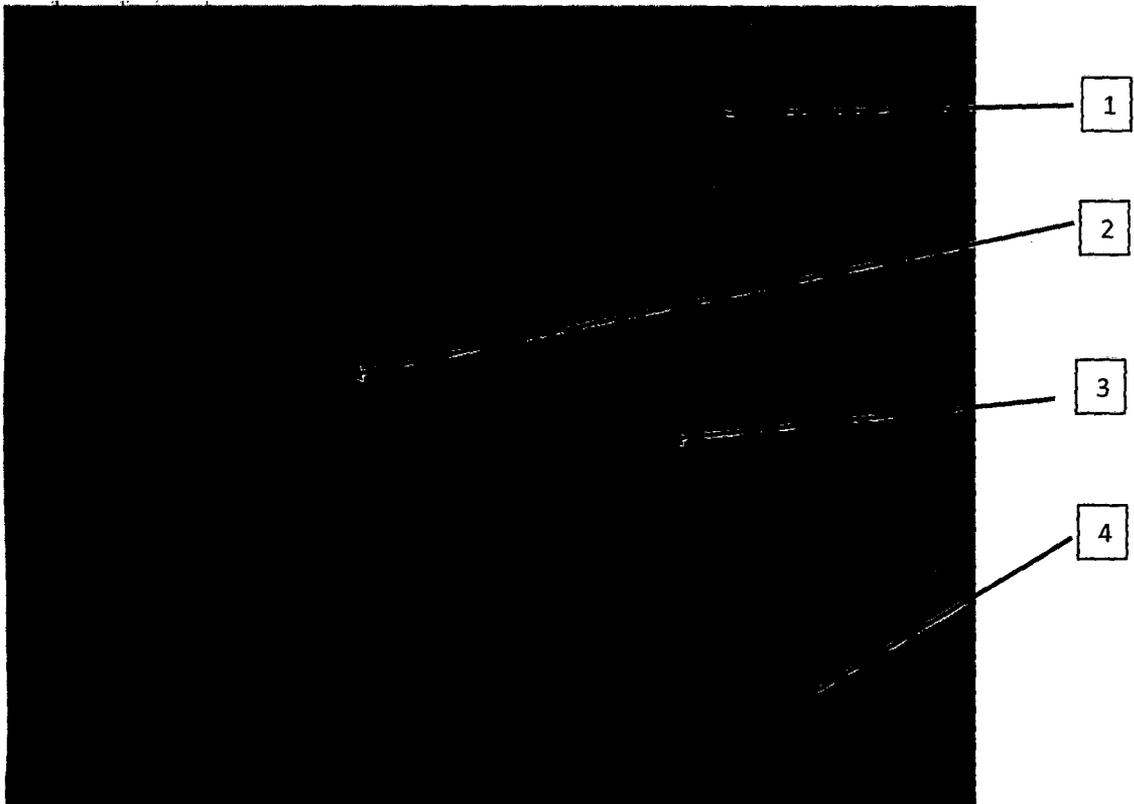
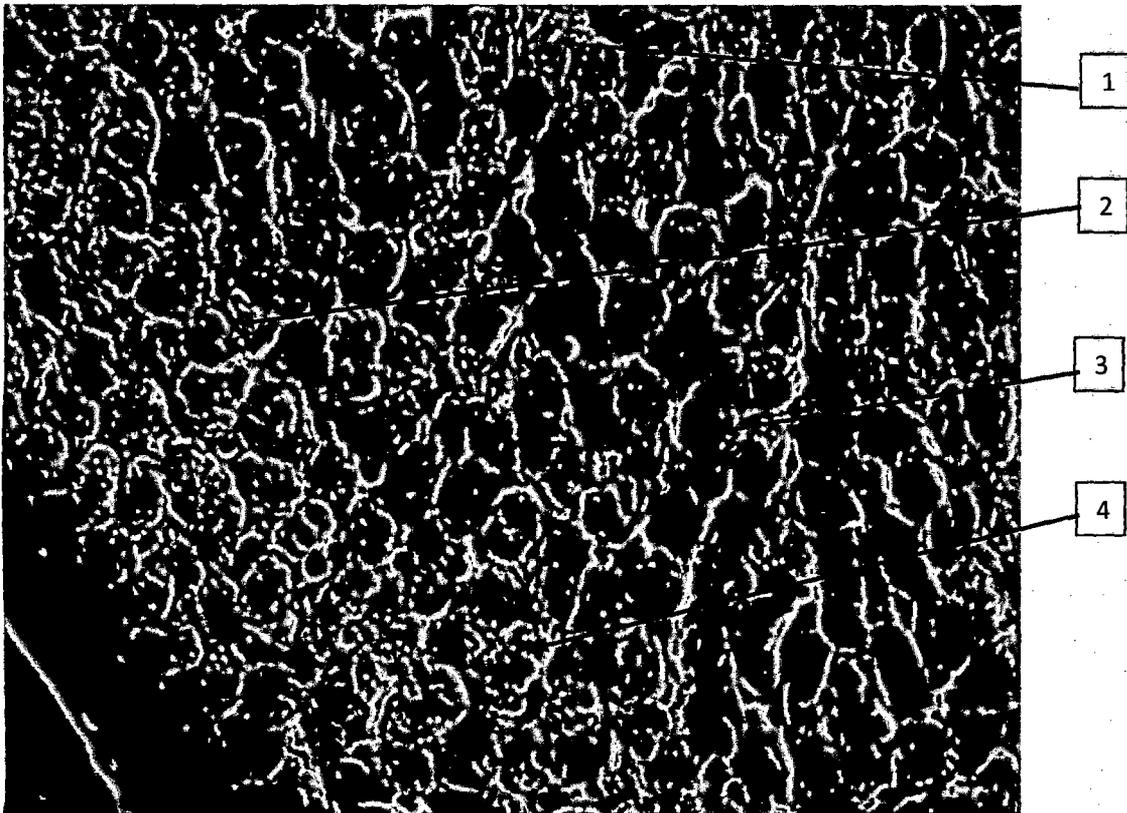


Figura 4

Hígado del Grupo Patrón - Silimarina (Coloración hematoxilina-Eosina) (40x)

1. Presencia de ligera necrosis.
2. Espacio portal prácticamente normal.
3. Células de kupffer de histología normal.
4. Existencia de hepatocitos binucleados. Señal de regeneración.



CAPITULO V

CONCLUSIONES

Primero: El extracto acuoso de *Peumus boldus* (boldo) a una dosis de 160 mg/kg de peso, tiene efecto hepatoprotector frente a la injuria producida por el fenobarbital y paracetamol según parámetros bioquímicos y anatomopatológicos.

Segundo: El tratamiento con el extracto acuoso de *Peumus boldus* (boldo) evidenció una disminución de transaminasas TGO, TGP y fosfatasa alcalina, así mismo un incremento de bilirrubina total y albúmina; mientras que las proteínas totales se mantuvo constante sin variación significativa. A nivel anatomopatológico el extracto acuoso de *Peumus boldus* (boldo) demostró un daño hepático moderado, el grupo patrón (silimarina) mostró daño leve.

Tercero: La silimarina a una dosis de 25 mg/kg de peso, tiene mayor efecto hepatoprotector frente a la injuria producida por el fenobarbital y paracetamol según parámetros bioquímicos y anatomopatológicos, comparado con el extracto acuoso del *Peumus boldus* (boldo).

CAPITULO VI

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda difundir la utilización en infusión de las hojas de boldo a una dosis de 9 g/L como tratamiento preventivo en personas con antecedentes de enfermedades hepáticas como una alternativa a largo plazo.

2. Difundir los datos obtenidos en la investigación a la población ya que es un aporte importante, conocer las dosis de administración del Boldo utilizado como hepatoprotector debido a que si se utiliza en dosis inadecuadas podría causar dificultades en la salud de los seres humanos.

3. Se recomienda evitar tratamientos farmacológicos, ya que éstos alteran la fisiología normal del hígado, y preferir los tratamientos fitoterapéuticos.

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFÍA

1. Aliaga J. Características Epidemiológicas y Clínicas de la Cirrosis Hepática en la Unidad de Hígado del HNERM Es-Salud [en línea]. Lima: Sociedad de Gastroenterología del Perú; 2007. [fecha de acceso 15 de abril del 2015]. URL disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1022-51292007000300003&script=sci_arttext
2. William, M. Drug induced hepatotoxicity. Rev. New England journal of medicine. [en línea]. 2003. [fecha de acceso 15 de abril del 2015] No 349: 474 – 85. Disponible en: http://gastro.dom.uab.edu/Fellow_Articles/fellowsreadinglisthep/drug%20hepatotoxicity.pdf
3. Hashimoto M, Kothary P, Raper S. Phenobarbital in comparison with carbon tetrachloride and phenobarbital - induced cirrhosis in rat liver regeneration. Journal of Surgical Research. [en línea]. 1999. [fecha de acceso 15 de abril del 2015] No 81(2):164-9. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022480498954245>
4. Pamplona J. Salud por las plantas medicinales. [en línea]. Madrid: Talleres gráficos Peñalara; 2006. [fecha de acceso 20 de abril del 2015] Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=nqPa43luMDcC&pg=PA198&dq=boldo&hl=es-419&sa=X&ved=0CC4Q6AEwBGoVChMI6drO5rf4yAIVSBUECh1FYg4W#v=onepage&q=boldo&f=false>
5. Gerhardt D, Horn A, Gaelzer M, Frozza R, Delgado A, Pelegrini A, Henriques A, Lenz G, Salbego C. Boldine: a potential new antiproliferative drug against glioma cell lines. Invest New Drugs. [en línea]. 2009. [fecha de acceso 22 de abril del 2015] No 27(6): 517-25. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?cmd=search&term=%22Gerhardt%20D%22%5Bau%5D&dispmax=50>

6. Torres E. El efecto protector de la Melatonina en la cirrosis hepática experimental. [Tesis para optar el grado de médico cirujano]. Córdoba: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba; 2009.
7. Olivares J. Efecto protector del extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* "boldo" en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas holtzman hembra. [Tesis para optar grado de médico cirujano]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/4026/1/Olivares_hj.pdf
8. Yovera E. Efecto protector del extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* "boldo" en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas holtzman hembra. [Tesis para optar grado de médico cirujano]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/4025/1/Yovera_le.pdf
9. Arroyo J. et al. Efecto protector en cirrosis hepática inducida en ratas del extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum* (matico) comparado con silimarina. Anales de la Facultad de medicina. [en línea]. 2012 [citado el 20 de abril del 2015] No 73 (2): 85-91. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/817/653>
10. Singh M, Sasi P, Gupta V, Rai G, Amarapurkar D, Wangikar P. Protective effect of curcumin, silymarin and N-acetylcysteine on antitubercular drug-induced hepatotoxicity assessed in an in vitro model. Hum Exp Toxicol. [en línea]. 2012 [citado el 22 de abril del 2015] No 31(8):788-97. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22318308>.
11. Coaquira R. y Orellano N. Efectos del *Silybum marianum* (Cardo mariano) en *Rattus norvegicus* variedad Sprague dawley con daño hepático inducido por tetracloruro de carbono, Arequipa 2011. [tesis de licenciatura]. Arequipa. Universidad Nacional de San Agustín; 2011.
12. Troncoso L. y Guija E. Efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petroselinum sativum* (perejil) en ratas, con intoxicación hepática inducida por paracetamol. [versión electrónica] *Anales de la Facultad de*

- medicina* (Lima); 2007 68(4), 333-343. Disponible en:
URL:http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832007000400008&lng=es&nrm=iso>.
13. Luque K. y Pizarro R. Efecto protector y regenerativo del extracto acuoso de las hojas de *Schinus molle* (molle) en ratas *Rattus norvegicus* con daño hepático inducido por paracetamol, Arequipa 2012. [tesis de licenciatura]. Arequipa. Universidad Nacional de San Agustín; 2013
 14. Fonnegra R, Jiménez S. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. 2ª.ed. Antioquía: Editorial Universidad de Antioquía; 2007
 15. Pamplona J. Plantas que curan. [en línea]. Madrid: Safeliz; 1995. [fecha de acceso 20 de junio del 2015]. URL disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=55KAD9Qj8dWC&pg=PA98&dq=Plantas+que+curan++Pamplona&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjQx4rowJXKAhVC2B4KHfAoAuUQ6wEIJDA#v=onepage&q=Plantas%20que%20curan%20%20Pamplona&f=false>
 16. Innatia. Propiedades biológicas del boldo. [en línea]. 2003. [fecha de acceso 20 de junio del 2015]. Disponible en: <http://remedios.innatia.com/c-boldo-propiedades/a-planta-boldo-propiedades.html>
 17. Dueñas R. Laboratorio de remedios herbolarios. [en línea]. [fecha de acceso 20 de junio del 2015]. Disponible en: <http://redsa.com.mx/PDF/Boldo%20Compuesto.pdf>
 18. Osorio D. Plantas Aromáticas y Medicinales. Bogotá: Grupo Latino; 2003.
 19. Tejada, C. Hepatotoxicidad por Fármacos. Rev Clin Med Fam. [en línea]. 2010. [fecha de acceso 21 de junio del 2015]. No 3(3): 177-191. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4321/S1699-695X2010000300006>.
 20. Ríos D, Sandoval D, Pineda A, Gómez C. Detection of boldine via HPLC in *Peumus boldus* Molina propagated by in vitro culture. Molecular Medicinal Chemistry. [en línea]. 2010. [fecha de acceso 21 de junio del 2015]. No 21: 113-116. Disponible en: <http://www.idecefyn.com.ar/MMC21PDF/mmcV2124FIN.pdf>
 21. Gerhardt D, Horn A, Gaelzer M, Frozza R, Delgado A, Pelegrini A, Henriques A, Lenz G, Salbego C. Boldine: a potential new

- antiproliferative drug against glioma cell lines. Invest New Drugs. [en línea]. 2009. [fecha de acceso 21 de junio del 2015]. No 27(6): 517-25. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10637-008-9203-7>
22. Mejía J, Mendoza D, Moreno E, Gonzales C, Remuzgo F, Morales L, Monje R. Efecto neurotóxico del extracto acuoso de boldo (*Peumus boldus*) en un modelo animal. Rev Peru Med Exp Salud Pública. [en línea]. 2014. [fecha de acceso 23 de junio del 2015]. No 31(1): 62-8. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v31n1/a09v31n1.pdf>
23. EFECTO HEPATOPROTECTOR
http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/cimel/v13_n1/pd/a05v13n1.pdf
1234567820 12/10/28.
24. PLANTASHEPATOPROTECTORAS.12345678<http://www.remediosnaturales.org/Noticias/Muestra.?l=70&IdCategoria=4123456782013/01/08>
25. Guyton A, Hall J. Tratado de fisiología médica. 12ª. Ed. Barcelona: Elsevier; 2010.
26. Brusco H, López J, Loidl C. Histología médico práctica. Barcelona: Elsevier; 2014.
27. Anthony P, Ishak G, Nayak C, Poulsen E, Scheuer J, Sobin H. The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. J. Clin Pathol. [en línea]. 1978. [fecha de acceso 30 de junio del 2015] No 31 (5): 395-414. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1145292/>
28. Lefton B, Rosa A, Cohen M. Diagnosis and epidemiology of cirrhosis. Med Clin north Am. [en línea]. 2009. [fecha de acceso 30 de junio del 2015] No 93:787-99. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19577114>
29. Hatzakis A, Wait S, Bruix J, Buti M, Carballo M, Cavaleri M, Colombo M. et al. The state of hepatitis B and C in Europe: report from the hepatitis B and C summit conference. J viral Hepat. [en línea]. 2011. [fecha de acceso 30 de junio del 2015] No 18:1-16. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21824223>

30. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. *J Hepatol.* [en línea]. 2009. [fecha de acceso 12 de julio del 2015] No 50: 227-42. Disponible en: <http://www.easl.eu/research/our-contributions/clinical-practice-guidelines/detail/management-of-chronic-hepatitis-b-virus-infection>
31. Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol.* [en línea]. 2008. [fecha de acceso 12 de julio del 2015] No 48: 335-52. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016882780700637X>
32. Lee E, Friedman L. Mechanisms of hepatic fibrogénesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* [en línea]. 2011. [fecha de acceso 20 de julio del 2015] No 25: 195-206. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508508004290>
33. Friedman L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology.* [en línea]. 2008. [fecha de acceso 20 de julio del 2015] No 134: 1655-69. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508508004290>
34. Benvegnú L, Gios M, Boccato S, Alberti A. Natural history of compensated viral cirrhosis: a prospective study on the incidence and hierarchy of major complications. [en línea]. 2004. [fecha de acceso 30 de julio del 2015] No 53:744-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15082595>
35. D'Amico G, García G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol.* [en línea]. 2006. [fecha de acceso 25 de agosto del 2015] No 44:217-31. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16298014>
36. Runyon A. Management of adult patients with ascites due to cirrhosis. Practice Guidelines Committee Hepatology. [en línea]. 2009. [fecha de acceso 2 de Setiembre de 2015]. URL disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.22853/pdf>

37. Jara M. Romero F. Actividad de la transaminasas glutámico pirúvica y gamma glutamil transpeptidasa plasmática en ratas albinas sometidas a la ingesta de un extracto de coca. [Tesis para optar el grado de licenciatura]. Arequipa: Universidad Nacional de San Agustín; 1997.
38. Gómez A. Cirrosis Hepática. [en línea] España: Farmacia Abierta; 2012. [fecha de acceso 21 de Setiembre de 2015]. URL disponible en: www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-pdf-90150227-S300
39. Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, Leza J, Moro M y Portolés A. Farmacología básica y clínica. [en línea]. Madrid: Médica Panamericana; 2008. [fecha de acceso 11 de Octubre de 2015]. URL disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=BeQ6D40wTPQC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
40. Paracetamol. [en línea] [fecha de acceso 11 de Octubre de 2015] URL disponible en: <http://pediamecum.es/wp-content/farmacos/Paracetamol.pdf>
41. Fenobarbital. [en línea] [fecha de acceso 11 de Octubre de 2015] URL disponible en: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/f080.htm>
42. Silimarina. [en línea] [fecha de acceso 11 de Octubre de 2015] URL disponible en: <http://www.pharmabrand.com.ec/es/producto-simarin12345678>
43. Mecanismo de acción de la silimarina. [en línea]. [fecha de acceso 12 de Octubre de 2015]. URL disponible en: <http://www.plmfarmacias.com/ecuador/DEF/PLM/productos/25979.htm>
44. Silimarina propiedades y beneficios de una planta con efectos desintoxicantes y protectores. [en línea]. [fecha de acceso 12 de Octubre de 2015]. URL disponible en: <http://www.bionatural.es/2010/01la-silimarina-propiedades-12345678beneficios-html>.
45. Netter F. Colección ciba de ilustraciones medicas tomo III. Lima: Salvat; 1987.
46. Vélez M. et al. Fundamentos de Medicina Gastroenterológica. Hepatología. Colombia: Nutrición; 1990.
47. Bernal V. et al. Cirrosis hepática [en línea]. Barcelona: 2012: 867-890. [fecha de acceso 12 de Agosto de 2015]. URL disponible en:

http://www.aegastro.es/sites/default/files/archivos/ayudas-practicas/60_Cirrosis_hepatica.pdf

48. Munné P, Saenz J, Izura J, Burillo G, Nogué S. Intoxicaciones medicamentosas (II): Analgésicos y anticonvulsivantes. *Anales Sis San Navarra* [en línea]. Pamplona: 2003. [fecha de acceso 26 de Octubre 2015] URL disponible en :
http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272003000200005
49. Sude E, Fikriye U, and Fricket I. Silymarin protects liver against toxic effects of anti-tuberculosis drugs in experimental animals: *Nutr Metab* [en línea]. Londres: 2008. [fecha de acceso 26 de Octubre 2015]. URL disponible en :
<http://download.springer.com/static/pdf/275/art%253A10.1186%252F17437075518.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Fnutritionandmetabolism.biomedcentral.com%2Farticle%2F10.1186%2F17437075518&token2=exp=1452097527~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F275%2Fart%25253A10.1186%2522F17437075518.pdf~-hmac=1efe6d3171cde7a0245ce874a2570c654bba56434cce7f22aae4f6695ae8da6b>
50. Linch, Raphael, Mellor, Sapre, Inwood. *Métodos de laboratorio*. México: Editorial Interamericana; 1979.
51. Antony B, Santhakumari G, Merina B, Sheeba V, Mukkadan J. Hepatoprotective effect of *Centella asiática* (L) in carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. [en línea]. *Indian J Pharm Sci*; 2006. [fecha de acceso 26 de Octubre de 2015] URL disponible en:
<http://ijpsonline.com/article.asp?issn=0250474X;year=2006;volume=68;issue=6;spage=772;epage=776;aulast=Antony>.
52. Rodríguez M. *Anatomía-Fisiología e Higiene*. D.F México: Progreso; 2003.
53. Moore, K., *Anatomía con orientación clínica*., Madrid: Médica Panamericana; 1996.

ANEXOS

