

Universidad Nacional
"Pedro Ruiz Gallo"



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA
Y PARASITOLOGÍA

ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL EFECTO REGENERADOR
DE LA INFUSIÓN DE OVERO(*Cordia lutea*) EN EL HÍGADO
GRASO DE RATAS CONSUMIENDO ALCOHOL CRÓNICAMENTE.

LAMBAYEQUE, MAYO 2013 - JULIO 2014.

TESIS

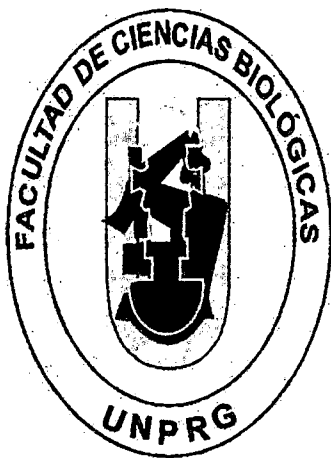
PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIOLOGO

AUTOR:

Bach. EDWIN FERNANDO VÁSQUEZ VÁSQUEZ

LAMBAYEQUE - PERÚ
2015

**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DECANATO**



**ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL EFECTO
REGENERADOR DE LA INFUSIÓN DE OVERO (*Cordia
lutea*) EN EL HÍGADO GRASO DE RATAS
CONSUMIENDO ALCOHOL CRÓNICAMENTE.
LAMBAYEQUE, Mayo 2013 – Julio 2014.**

**TESIS
PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO**

AUTORES:

Bach. EDWIN FERNANDO VÁSQUEZ VÁSQUEZ

LAMBAYEQUE – PERU

2015

**ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL EFECTO
REGENERADOR DE LA INFUSIÓN DE OVERO (*Cordia
lutea*) EN EL HÍGADO GRASO DE RATAS
CONSUMIENDO ALCOHOL CRÓNICAMENTE.
LAMBAYEQUE.**

**TESIS
PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIOLOGO**

PRESENTADO POR

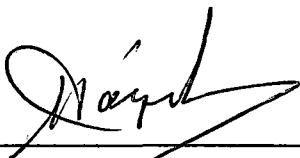
Bach. EDWIN FERNANDO VÁSQUEZ VÁSQUEZ

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado


**Dra. Adela Chamberg Lllontop
Presidente**



**Dr. Ántero Vásquez García
Secretario**

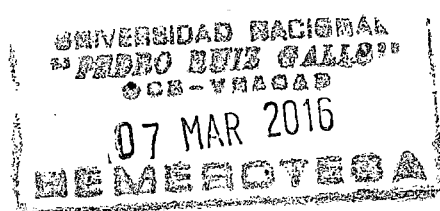


**M.Sc. José Reupo Periche
Vocal**



**M.Sc. Consuelo Rojas Idrogo
Patrocinadora**





ÍNDICE

TÍTULO DEL CAPÍTULO	PAG.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
III. ANTECEDENTES	4
a) Referente a hígado graso	4
b) Referente al tratamiento del hígado graso	6
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	9
1. Lugar de ejecución	9
2. Material vegetal	9
3. Animales de experimentación	10
4. Otros materiales	10
5. Metodología	10
5.1. Preparación de la infusión de flor de "Overo"	10
5.2. Preparación de la solución de alcohol etílico	11
5.3. Tratamiento experimental	11
5.4. Histología	12
5.5. Análisis Estadístico	13
V. RESULTADOS	14
1. Temperatura	14
2. Peso de las unidades experimentales	14
3. Consumo de Alcohol	14
4. Consumo de Flor de "Overo"	16
5. Análisis Histológico del Efecto Regenerador de la Infusión de "Overo"	19
6. Comportamiento de las unidades experimentales	21
VI. DISCUSIÓN	23
VII. CONCLUSIONES	25
VIII. RECOMENDACIONES	26
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

ÍNDICE DE TABLAS

NÚMERO DE TABLA	PAG.
Tabla 01: ANOVA mixta con mediciones repetidas para diferencia en peso a través del tiempo	15
Tabla 02: Anova mixta de mediciones repetidas para la diferencia de consumo de alcohol (GII, GIII) y agua (GI) a través del tiempo en g/kg/día.	17
Tabla 03: Prueba de Games-Howell de Comparaciones múltiples para la diferencia de consumo de alcohol (GII y GIII) y agua (GI)	18
Tabla 04: ANOVA de un factor para medidas repetidas para la diferencia de consumo de infusión de flor de overo en mg/kg/día a través de los 21 días de tratamiento en el Grupo III	18
Tabla 05: ANOVA de un factor y prueba de Tukey para la diferencia de medias del porcentaje de hígado graso entre los grupos I , II , y III.	21

ÍNDICE DE FIGURAS

NÚMERO DE FIGURA	PAG.
Figura 01: Flor de "Overo" <i>Cordia lutea</i> Lam. Familia Boraginaceae.	9
Figura 02: Peso medio de GI (Control), GII (Alcohol), y GIII (Alcohol_Overo) durante 16 semanas.	15
Figura 03: Consumo medio de alcohol (GII, GIII) y agua (GI) en g/kg/día durante 16 semanas.	17
Figura 04: Consumo medio de flor de overo en infusión del Grupo III, en mg/kg/día.	18
Figura 05: Estructura microscópica del hígado de rata.	19
Figura 06: Análisis histológico del efecto del consumo de infusión de flor de overo sobre el hígado graso de ratas que consumieron alcohol crónicamente.	20
Figura 07: Gráfico de cajas del porcentaje de hígado graso de los grupos experimentales.	22

RESUMEN

El consumo de alcohol provoca la enfermedad alcohólica hepática la cual engloba a una serie de patologías iniciando con una infiltración grasa, posterior inflamación hepática, fibrosis, cirrosis y eventual carcinoma hepatocelular. La prevalencia de estos cambios genera gastos en el sistema salud y malestar en el paciente. Se estudió la histología de la regeneración hepática de ratas que consumieron alcohol crónicamente tratadas con infusión de flor de overo (*Cordia lutea*). Ratas (*Rattus norvegicus*, cepa Sprague-Dawley) (n=18), pesando 192.6 \pm 26.74g fueron divididas en tres grupos (n=06) y tratadas durante 120 días: Grupo I, consumió agua ad libitum; Grupo II, consumió alcohol 4% v/v; Grupo III, consumió alcohol 4% v/v y 21 días de infusión de flor de overo. Los hígados fueron perfundidos, fijados y cortes teñidos con eosina-hematoxilina. El consumo medio de alcohol de los grupos II y III fue estadísticamente similar ($p>0.05$), media global = 3.14 \pm 0.44 g/kg/día. La degeneración hepática grasa fue estadísticamente mayor ($p<0.05$) en el grupo II que en los grupos I y III donde esta fue similar ($p>0.05$). El consumo medio de flor de overo fue 222.14 \pm 20.4 mg/kg/día. El consumo de infusión de flor de overo regeneró el hígado graso de ratas que consumieron alcohol crónicamente.

ABSTRACT

Alcohol consumption causes the alcoholic liver disease which includes a serie of pathologies starting with a fatty infiltration, later hepatic inflammation, fibrosis, cirrhosis and eventual hepatocellular carcinoma. The prevalence of these changes generates expenses in the health system and discomfort for the patient. It was studied the histology of the hepatic regeneration in rats which consumed alcohol chronically treated with "overo" flower (*Cordia lutea*) infusion. Rats (*Rattus norvegicus*, strain Sprague-Dawley) (n=18), weighting 192.6 \pm 26.74g were divided in three groups (n=06) and treated for 120 days: Group I, consumed water ad libitum; Group II, consumed alcohol 4% v/v; Group III, consumed alcohol 4% v/v and 21 days of "overo" flower infusion. The livers were perfused, fixed, and cuts were eosine-hematoxiline stained. The average alcohol consumption of groups II and III was statistically similar ($p>0.05$), global mean = 3.14 \pm 0.44 g/kg/day. The hepatic fatty degeneration was statistically higher ($p<0.05$) in group II than in groups I and III were it was similar ($p>0.05$). The average "overo" flower consumption was 222.14 \pm 20.4 mg/kg/day. The consumption of "overo" flower infusion regenerated the fatty liver of rats which consumed alcohol chronically.

ABREVIATURAS

ADH.- Alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1) es una enzima descubierta a mediados de los años 1960. Las alcohol deshidrogenasas son un grupo de siete enzimas que están frecuentemente presentes en muchos organismos y facilitan la interconversión entre alcoholes y aldehídos o cetonas con la reducción de NAD^+ a NADH .

NAD/NADH.- El dinucleótido de nicotinamida y adenina, más conocido como nicotinamida adenina dinucleótido (abreviado NAD^+ en su forma oxidada y NADH en su forma reducida), es una coenzima encontrada en células vivas y compuesta por un dinucleótido, ya que está formada por dos nucleótidos unidos a través de sus grupos fosfatos, siendo uno de ellos una base de adenina y el otro de vitamina B3. Su función principal es el intercambio de electrones e hidrogeniones en la producción de energía de todas las células.

CYP450.- El citocromo P450 (abreviado CYP en inglés, o CIP en español, o simplemente P450) es una enorme y diversa superfamilia de hemoproteínas encontradas en bacterias, archaea y eucariotas. Las proteínas del citocromo P450 usan un amplio rango de compuestos exógenos y endógenos como sustratos de sus reacciones enzimáticas.

CYP2E1.- El citocromo P450 2E1 (EC 1.14.14.1) es una enzima involucrada en el metabolismo oxidativo de un pequeño rango de sustratos (la mayoría moléculas polares pequeñas) entre ellos el alcohol, se sabe que existen muchas interacciones medicamentosas importantes mediadas por el CYP2E1.

ROS.- Las especies reactivas del oxígeno (ROS por reactive oxygen species) incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos. Son generalmente moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada. Su incremento lleva en una situación conocida como estrés oxidativo.

LPS.- Los lipopolisacáridos, también llamados endotoxinas, son polímeros complejos con restos de ácidos grasos como parte lipófila y cadenas características de oligosacáridos y polisacáridos, que forman la parte mayoritaria de la capa externa de la membrana externa de bacterias Gram negativas.

HSC.- Las células de Ito, también llamadas células estrelladas hepáticas (Hepatic Stellate Cells en inglés), o lipocitos hepáticos. Tienen en su citoplasma gotas de vitamina A, a lo cual se le ha añadido la función de células de almacenamiento de Vitamina A, otra función que poseen estas células es la producción de matriz extracelular y colágeno.

NADPH.- La nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (abreviada NADP^+ en su forma oxidada y NADPH en su forma reducida) es una coenzima que interviene en numerosas vías anabólicas. Su estructura química contiene la vitamina B3 y es además análogo de la nicotinamida adenina dinucleótido ($\text{NADH} + \text{H}^+$; NAD^+ en su forma oxidada).

GPT.- La alanina aminotransferasa (ALT) (EC 2.6.1.2), anteriormente conocida como transaminasa glutámico-pirúvica, es una enzima aminotransferasa con gran concentración en el hígado y en menor medida en los riñones, corazón y músculos. Cuando hay una lesión de estos órganos la ALT es liberada a la sangre y aparece elevada en los análisis.

GOT.- La aspartato aminotransferasa (EC 2.6.1.1), antes conocida como transaminasa glutámico-oxalacética (GOT) es una enzima aminotransferasa que se encuentra en varios tejidos del organismo de los mamíferos, especialmente en el corazón, el hígado y el tejido muscular. Se encuentran cantidades elevadas de esta enzima en el suero en casos de infarto agudo de miocardio, hepatopatía aguda, miopatías, por el empleo de determinados fármacos y en cualquier enfermedad o trastorno en el cual resulten seriamente dañadas las células.

ALP.- La fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1) es una enzima hidrolasa responsable de eliminar grupos de fosfatos de varios tipos de moléculas como nucleótidos, proteínas y alcaloides. El proceso de eliminar el grupo fosfático se denomina desfosforilación. Como sugiere su nombre, las fosfatasas alcalinas son más efectivas en un entorno alcalino. Son enzimas que se encuentran presentes en casi todos los tejidos del organismo, siendo particularmente alta en huesos, hígado, placenta, intestinos y riñón. Proceden de la ruptura normal de las células sanguíneas y de otros tejidos.

TBARS.- Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico son formados como un sub producto de la peroxidación lipídica los cuales pueden ser detectados mediante en ensayo TBARS usando el ácido tiobarbitúrico como reactivo.

GSH.- El glutatión es un tripéptido no proteínico constituido por 3 aminoácidos: cisteína, glutamato y glicina. Es el principal antioxidante de las células, es ubicuo y ayuda a protegerlas de las especies reactivas del oxígeno como los radicales libres y los peróxidos.

SOD.- La enzima superóxido dismutasa (SOD), antiguamente hemocupreína y eritrocupreína, cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Debido a esto es una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al oxígeno.

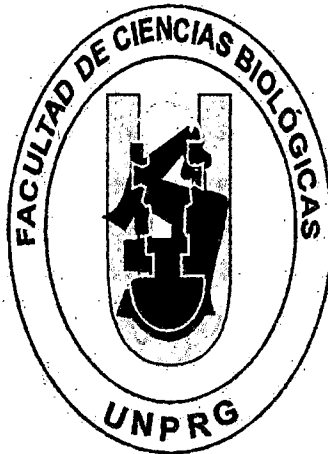
CAT.- La catalasa es una catalaza perteneciente a la categoría de las oxidorreductasas que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua. Esta enzima utiliza como cofactor al grupo hemo y al manganeso.

LC50.- En toxicología, se denomina DL50 (Lethal concentration en inglés) a la dosis de una sustancia o radiación que resulta mortal para la mitad de un conjunto de animales de prueba. Los valores de la DL50 son usados con frecuencia como un indicador general de la toxicidad aguda de una sustancia. De esta forma puede extrapolarse a los seres humanos.

ANAVA.- El análisis de la varianza es una colección de modelos estadísticos y sus procedimientos asociados, en el cual la varianza está particionada en ciertos componentes debidos a diferentes variables explicativas.

AD LIBITUM.- Expresión del latín que significa literalmente «a placer, a voluntad».

**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DECANATO**



**ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL EFECTO
REGENERADOR DE LA INFUSIÓN DE OVERO (*Cordia
lutea*) EN EL HÍGADO GRASO DE RATAS
CONSUMIENDO ALCOHOL CRÓNICAMENTE.
LAMBAYEQUE, Mayo 2013 – Julio 2014.**

**TESIS
PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIOLOGO**

AUTORES:

Bach. EDWIN FERNANDO VÁSQUEZ VÁSQUEZ

LAMBAYEQUE – PERU

2015

**ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL EFECTO
REGENERADOR DE LA INFUSIÓN DE OVERO (*Cordia
lutea*) EN EL HÍGADO GRASO DE RATAS
CONSUMIENDO ALCOHOL CRÓNICAMENTE.
LAMBAYEQUE.**

**TESIS
PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO**

PRESENTADO POR

Bach. EDWIN FERNANDO VÁSQUEZ VÁSQUEZ

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado

**Dra. Adela Chambergo Llontop
Presidente**

**Dr. Ántero Vásquez García
Secretario**

**M.Sc. José Reupo Periche
Vocal**

**M.Sc. Consuelo Rojas Idrogo
Patrocinadora**

ÍNDICE

TÍTULO DEL CAPÍTULO	PAG.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
III. ANTECEDENTES	4
a) Referente a hígado graso	4
b) Referente al tratamiento del hígado graso	6
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	9
1. Lugar de ejecución	9
2. Material vegetal	9
3. Animales de experimentación	10
4. Otros materiales	10
5. Metodología	10
5.1. Preparación de la infusión de flor de “Overo”	10
5.2. Preparación de la solución de alcohol etílico	11
5.3. Tratamiento experimental	11
5.4. Histología	12
5.5. Análisis Estadístico	13
V. RESULTADOS	14
1. Temperatura	14
2. Peso de las unidades experimentales	14
3. Consumo de Alcohol	14
4. Consumo de Flor de “Overo”	16
5. Análisis Histológico del Efecto Regenerador de la Infusión de “Overo”	19
6. Comportamiento de las unidades experimentales	21
VI. DISCUSIÓN	23
VII. CONCLUSIONES	25
VIII. RECOMENDACIONES	26
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

ÍNDICE DE TABLAS

NÚMERO DE TABLA	PAG.
Tabla 01: ANOVA mixta con mediciones repetidas para diferencia en peso a través del tiempo	15
Tabla 02: Anova mixta de mediciones repetidas para la diferencia de consumo de alcohol (GII, GIII) y agua (GI) a través del tiempo en g/kg/día.	17
Tabla 03: Prueba de Games-Howell de Comparaciones múltiples para la diferencia de consumo de alcohol (GII y GIII) y agua (GI)	18
Tabla 04: ANOVA de un factor para medidas repetidas para la diferencia de consumo de infusión de flor de overo en mg/kg/día a través de los 21 días de tratamiento en el Grupo III	18
Tabla 05: ANOVA de un factor y prueba de Tukey para la diferencia de medias del porcentaje de hígado graso entre los grupos I , II , y III.	21

ÍNDICE DE FIGURAS

NÚMERO DE FIGURA	PAG.
Figura 01: Flor de "Overo" <i>Cordia lutea</i> Lam. Familia Boraginaceae.	9
Figura 02: Peso medio de GI (Control), GII (Alcohol), y GIII (Alcohol_Overo) durante 16 semanas.	15
Figura 03: Consumo medio de alcohol (GII, GIII) y agua (GI) en g/kg/día durante 16 semanas.	17
Figura 04: Consumo medio de flor de overo en infusión del Grupo III, en mg/kg/día.	18
Figura 05: Estructura microscópica del hígado de rata.	19
Figura 06: Análisis histológico del efecto del consumo de infusión de flor de overo sobre el hígado graso de ratas que consumieron alcohol crónicamente.	20
Figura 07: Gráfico de cajas del porcentaje de hígado graso de los grupos experimentales.	22

RESUMEN

El consumo de alcohol provoca la enfermedad alcohólica hepática la cual engloba a una serie de patologías iniciando con una infiltración grasa, posterior inflamación hepática, fibrosis, cirrosis y eventual carcinoma hepatocelular. La prevalencia de estos cambios genera gastos en el sistema salud y malestar en el paciente. Se estudió la histología de la regeneración hepática de ratas que consumieron alcohol crónicamente tratadas con infusión de flor de overo (*Cordia lutea*). Ratas (*Rattus norvegicus*, cepa Sprague-Dawley) (n=18), pesando 192.6 \pm 26.74g fueron divididas en tres grupos (n=06) y tratadas durante 120 días: Grupo I, consumió agua ad libitum; Grupo II, consumió alcohol 4% v/v; Grupo III, consumió alcohol 4% v/v y 21 días de infusión de flor de overo. Los hígados fueron perfundidos, fijados y cortes teñidos con eosina-hematoxilina. El consumo medio de alcohol de los grupos II y III fue estadísticamente similar ($p>0.05$), media global = 3.14 \pm 0.44 g/kg/día. La degeneración hepática grasa fue estadísticamente mayor ($p<0.05$) en el grupo II que en los grupos I y III donde esta fue similar ($p>0.05$). El consumo medio de flor de overo fue 222.14 \pm 20.4 mg/kg/día. El consumo de infusión de flor de overo regeneró el hígado graso de ratas que consumieron alcohol crónicamente.

ABSTRACT

Alcohol consumption causes the alcoholic liver disease which includes a serie of pathologies starting with a fatty infiltration, later hepatic inflammation, fibrosis, cirrhosis and eventual hepatocellular carcinoma. The prevalence of these changes generates expenses in the health system and discomfort for the patient. It was studied the histology of the hepatic regeneration in rats which consumed alcohol chronically treated with "overo" flower (*Cordia lutea*) infusion. Rats (*Rattus norvegicus*, strain Sprague-Dawley) (n=18), weighting 192.6 \pm 26.74g were divided in three groups (n=06) and treated for 120 days: Group I, consumed water ad libitum; Group II, consumed alcohol 4% v/v; Group III, consumed alcohol 4% v/v and 21 days of "overo" flower infusion. The livers were perfused, fixed, and cuts were eosine-hematoxiline stained. The average alcohol consumption of groups II and III was statistically similar ($p>0.05$), global mean = 3.14 \pm 0.44 g/kg/day. The hepatic fatty degeneration was statistically higher ($p<0.05$) in group II than in groups I and III where it was similar ($p>0.05$). The average "overo" flower consumption was 222.14 \pm 20.4 mg/kg/day. The consumption of "overo" flower infusion regenerated the fatty liver of rats which consumed alcohol chronically.

ABREVIATURAS

ADH.- Alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1) es una enzima descubierta a mediados de los años 1960. Las alcohol deshidrogenasas son un grupo de siete enzimas que están frecuentemente presentes en muchos organismos y facilitan la interconversión entre alcoholes y aldehídos o cetonas con la reducción de NAD⁺ a NADH.

NAD/NADH.- El dinucleótido de nicotinamida y adenina, más conocido como nicotinamida adenina dinucleótido (abreviado NAD⁺ en su forma oxidada y NADH en su forma reducida), es una coenzima encontrada en células vivas y compuesta por un dinucleótido, ya que está formada por dos nucleótidos unidos a través de sus grupos fosfatos, siendo uno de ellos una base de adenina y el otro de vitamina B3. Su función principal es el intercambio de electrones e hidrogeniones en la producción de energía de todas las células.

CYP450.- El citocromo P450 (abreviado CYP en inglés, o CIP en español, o simplemente P450) es una enorme y diversa superfamilia de hemoproteínas encontradas en bacterias, archaea y eucariotas. Las proteínas del citocromo P450 usan un amplio rango de compuestos exógenos y endógenos como sustratos de sus reacciones enzimáticas.

CYP2E1.- El citocromo P450 2E1 (EC 1.14.14.1) es una enzima involucrada en el metabolismo oxidativo de un pequeño rango de sustratos (la mayoría moléculas polares pequeñas) entre ellos el alcohol, se sabe que existen muchas interacciones medicamentosas importantes mediadas por el CYP2E1.

ROS.- Las especies reactivas del oxígeno (ROS por reactive oxygen species) incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos. Son generalmente moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada. Su incremento lleva en una situación conocida como estrés oxidativo.

LPS.- Los lipopolisacáridos, también llamados endotoxinas, son polímeros complejos con restos de ácidos grasos como parte lipófila y cadenas características de oligosacáridos y polisacáridos, que forman la parte mayoritaria de la capa externa de la membrana externa de bacterias Gram negativas.

HSC.- Las células de Ito, también llamadas células estrelladas hepáticas (Hepatic Stellate Cells en inglés), o lipocitos hepáticos. Tienen en su citoplasma gotas de vitamina A, a lo cual se le ha añadido la función de células de almacenamiento de Vitamina A, otra función que poseen estas células es la producción de matriz extracelular y colágeno.

NADPH.- La nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (abreviada NADP⁺ en su forma oxidada y NADPH⁺ en su forma reducida) es una coenzima que interviene en numerosas vías anabólicas. Su estructura química contiene la vitamina B3 y es además análogo de la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH+H⁺; NAD⁺ en su forma oxidada).

GPT.- La alanina aminotransferasa (ALT) (EC 2.6.1.2), anteriormente conocida como transaminasa glutámico-pirúvica, es una enzima aminotransferasa con gran concentración en el hígado y en menor medida en los riñones, corazón y músculos. Cuando hay una lesión de estos órganos la ALT es liberada a la sangre y aparece elevada en los análisis.

GOT.- La aspartato aminotransferasa (EC 2.6.1.1), antes conocida como transaminasa glutámico-oxalacética (GOT) es una enzima aminotransferasa que se encuentra en varios tejidos del organismo de los mamíferos, especialmente en el corazón, el hígado y el tejido muscular. Se encuentran cantidades elevadas de esta enzima en el suero en casos de infarto agudo de miocardio, hepatopatía aguda, miopatías, por el empleo de determinados fármacos y en cualquier enfermedad o trastorno en el cual resulten seriamente dañadas las células.

ALP.- La fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1) es una enzima hidrolasa responsable de eliminar grupos de fosfatos de varios tipos de moléculas como nucleótidos, proteínas y alcaloides. El proceso de eliminar el grupo fosfático se denomina desfosforilación. Como sugiere su nombre, las fosfatasas alcalinas son más efectivas en un entorno alcalino. Son enzimas que se encuentran presentes en casi todos los tejidos del organismo, siendo particularmente alta en huesos, hígado, placenta, intestinos y riñón. Proceden de la ruptura normal de las células sanguíneas y de otros tejidos.

TBARS.- Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico son formados como un sub producto de la peroxidación lipídica los cuales pueden ser detectados mediante ensayo TBARS usando el ácido tiobarbitúrico como reactivo.

GSH.- El glutatión es un tripéptido no proteínico constituido por 3 aminoácidos: cisteína, glutamato y glicina. Es el principal antioxidante de las células, es ubicuo y ayuda a protegerlas de las especies reactivas del oxígeno como los radicales libres y los peróxidos.

SOD.- La enzima superóxido dismutasa (SOD), antiguamente hemocupreína y eritrocupreína, cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Debido a esto es una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al oxígeno.

CAT.- La catalasa es una catalasa perteneciente a la categoría de las oxidoreductasas que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua. Esta enzima utiliza como cofactor al grupo hemo y al manganeso.

LC50.- En toxicología, se denomina DL50 (Lethal concentration en inglés) a la dosis de una sustancia o radiación que resulta mortal para la mitad de un conjunto de animales de prueba. Los valores de la DL50 son usados con frecuencia como un indicador general de la toxicidad aguda de una sustancia. De esta forma puede extrapolarse a los seres humanos.

ANAVA.- El análisis de la varianza es una colección de modelos estadísticos y sus procedimientos asociados, en el cual la varianza está particionada en ciertos componentes debidos a diferentes variables explicativas.

AD LIBITUM.- Expresión del latín que significa literalmente «a placer, a voluntad».

I. INTRODUCCIÓN

EL hígado es uno de los órganos más largos del cuerpo y está involucrado en varias actividades fisiológicas, entre las se pueden citar al procesamiento de nutrientes de la dieta, fagocitar materia particular en la circulación porta, síntesis de proteínas séricas, biotransformación de metabolitos circulantes, la detoxificación y excreción de residuos endógenos y polutantes xenobióticos en la bilis y regulación inmunológica.

Una de las sustancias que afecta al hígado es el alcohol, provocando la enfermedad alcohólica hepática. La enfermedad alcohólica hepática es un proceso complejo que incluye un espectro amplio de lesiones, desde hígado graso conocido como esteatosis hasta cirrosis, siendo la hepatitis alcohólica la más severa de las lesiones. El tratamiento que actualmente se aplica se basa en la abstinencia de bebidas alcohólicas y una breve exposición a corticosteroides. Sin embargo, a nivel clínico se conoce que una vez establecido el hígado graso este permanece hasta la muerte del individuo o bien en el peor de los casos progresa hasta cirrosis, por lo que se hace necesario investigar para mejorar el tratamiento.

Desde el punto de vista clínico, El etanol es la sustancia hepatotóxica más estudiada debido a su utilización de manera exagerada por el ser humano y al impacto de su consumo en la incidencia de enfermedad hepática. El metabolismo del etanol comienza en la mucosa gástrica, pero es el hígado el órgano que se encarga principalmente de su metabolismo y eliminación, siendo este el más afectado por los residuos tóxicos. A pesar de que las influencias genéticas, inmunológicas y nutricionales juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad hepática alcohólica, se asume que el etanol es hepatotóxico per se, (Cascales et al., 2009).

Estudios realizados en Estados Unidos y Europa demuestran que la ingesta crónica de alcohol con consecuente daño de hígado, es una de las mayores

causas de mortalidad. En Perú el consumo de alcohol es un factor de riesgo para la salud y muerte prematura. Estudios realizados en los últimos años demuestran que el 83% de la población consume bebidas alcohólicas; el 53.5% de los escolares de nivel secundario ha consumido alguna bebida alcohólica en su vida y el 27.4% durante el último mes (DEVIDA 2008). Del total de los bebedores alcohólicos el 80% desarrolla esteatosis, el 10-35% hepatitis y aproximadamente un 10% cirrosis hepática (Adachi & Brenner 2005).

La información etnobotánica sobre el uso de plantas medicinales, en el país es abundante, son numerosas las especies pertenecientes a varias familias botánicas, las que tienen importancia medicinal. De manera especialmente en la región Lambayeque, la especie *Cordia lutea* Lam., más conocida comúnmente como "Overo" es utilizada para tratar afecciones hepáticas. El tratamiento tradicional se basa en la ingesta de infusión de flores de *Cordia lutea*. Esta planta se encuentra formando parte de la vegetación del bosque xerofítico de la costa norte del Perú.

El consumo de infusiones de la flor de "overo", ha ido en aumento en los últimos años, a medida que se ha ido incrementando las afecciones hepáticas, hecho que es corroborado con el interés que existe actualmente por parte de las comunidades campesinas, al propagar masivamente esta planta en suelos no aptos para la agricultura. El presente trabajo brindará un aporte y soporte científico al uso tradicional de la flor de "overo", en el tratamiento de afecciones hepáticas.

II. OBJETIVOS

Principal

- Realizar el análisis histológico del efecto regenerador de la infusión de "overo" (*Cordia lutea*) en el hígado graso de ratas consumiendo alcohol crónicamente.

Secundarios

- Medir el consumo de alcohol de los grupos tratados
- Medir el consumo de infusión de flor de overo del grupo tratado
- Observar el comportamiento de las unidades experimentales a lo largo del experimento.

III. ANTECEDENTES

a) Referente a hígado graso

La fisiopatología de las enfermedades hepáticas causadas por la ingesta de alcohol se inicia cuando el alcohol llega al hígado, en el hepatocito el etanol es metabolizado por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) hasta acetaldehído. La catálisis enzimática de acetaldehído hasta acetato aumenta la proporción NADH/NAD⁺ dirigiendo el metabolismo a **lipogénesis** (Bruha et al., 2012; Karthikeyan et al, (In Press)). Cuando el consumo es crónico se activa el sistema microsómico de oxidación en el retículo endoplasmático por la enzima citocromo P450 específicamente la CYP2E1, que también produce acetaldehído, tanto en hepatocitos como en células de kupffer (Cascales et al, 2009). CYP2E1 produce la mayor cantidad de radicales libres (ROS), (Koop D., 2006). Estos radicales libres son responsables de la disminución del glutatión, daño a estructuras subcelulares, ADN, y la peroxidación lipídica, conduciendo a la muerte celular. Además de activar la respuesta de las proteínas desplegadas inducida también por la acumulación de aductos de acetaldehído-proteínas, (Ji, 2011; Tsedensodnom et al, 2013). Los aductos de acetaldehído y la translocación del lipopolisacárido (LPS) desde el intestino genera una respuesta inmune y consecuente **inflamación**, y daño hepático, (Pinzone, et al., 2012; Fooladi., et al., 2013). La **fibrosis** se presenta cuando las células estelares del hígado (HSC) son activadas por aductos de acetaldehído, ROS, y citoquinas de la respuesta inmune, (Osman et al, 2013). En algunos casos el hígado degenera a cirrosis que es la muerte generalizada de hepatocitos. El cáncer hepatocelular se observa eventualmente. El metabolismo del alcohol y su consecuente daño hepático han sido compilados por Louvet & Mathurin (2015).

El hígado graso alcohólico tiene tres categorías de cambios histopatológicos: Esteatosis, esteatohepatitis, y esteatofibrosis. Los cuales podrían coexistir en un solo paciente, (EASL, 2012). Todos los cambios inician y usualmente son más

prominentes en la región centrolobulillar del lóbulo hepático. Los hepatocitos centrolobulillares están preparados enzimáticamente para metabolizar alcohol. Tales vías metabólicas producen la acumulación de ácidos grasos en los hepatocitos esteatóticos y crean los metabolitos tóxicos que causan inflamación, daño al hepatocito y fibrosis, (Theise, 2013).

El estudio, diagnóstico y progreso del daño hepático o su recuperación después de un tratamiento, se realiza midiendo los niveles de las enzimas transaminasas, aunque con el avance de la genómica y proteómica emergen nuevos biomarcadores (Amacher 2002, Fernández, et al, 2008; Poynard, et al, 2010; Koutsogiannis, et al, 2010; Aithal, et al, 2012). Para la clínica el estado real del hígado es analizado por biopsia (Brunt & Tiniakos 2010, Marra & Lotersztajn 2013).

Cuando un agente daña células o tejidos, el organismo responde activando una serie de eventos que sirven para eliminar estos agentes, contener el daño, y preparar a las células sobrevivientes para replicación. Los eventos conllevan a dos tipos de procesos: **Regeneración**, cuando se restituye la pérdida de tejidos; y **sanación (reparación)**, cuando se reparan las estructuras originales pero también involucra la deposición de colágeno y la formación de cicatrices, (Kumar, et al., 2005). Debido a que el hígado funciona como primera barrera ante diversas sustancias tóxicas, este cuenta con un potencial extremadamente alto para regenerar, (Itoh & Miyajima, 2014), (Miyaoaka & Miyajima, 2013); la cual es considerada única ya que este es capaz de modular su masa de acuerdo a los requerimientos funcionales proliferando o sometándose a apoptosis según sea el caso, (Su, et al., 2002). El término regeneración hepática es usado también refiriéndose a la capacidad que tiene el hígado de recuperar su tamaño después de una hepatectomía parcial. Sin embargo, el término “hiperplasia compensatoria” sería más preciso ya que el hígado no recupera los lóbulos perdidos sino que el remanente tisular hepático incrementa su masa; distinto a cuando el hígado es severamente dañado, sin proliferación hepatocítica y donde se asume que las

células progenitoras/madre del hígado contribuyen a la regeneración, (Miyaoaka & Miyajima, 2013). Para propósitos del trabajo el término regeneración es utilizado en referencia a la recuperación de estructura celular y tisular del hígado graso causado por el consumo crónico de alcohol

b) Referente al tratamiento del hígado graso

Para el tratamiento, recuperación o regeneración del hígado se utilizan fármacos (Bouneva, et al, 2003; EASL 2012), dietas específicas (Nobili, et al., 2011; Devore, et al, 2013) y la medicina tradicional (Bussmann & Glenn, 2010, 2010a); sin embargo no se logra recuperar el hígado completamente, tal vez por la complejidad de reacciones que realiza. En últimos reportes se observó reportan una mortalidad de 30 – 40% 6 meses después del tratamiento con corticosteroides para inflamación hepática, (Louvet & Mathurin, 2015).

Lukivskaya, et al, (2013) estudian el efecto reverso del consumo de aceite de borraja en el hígado graso inducido por etanol. Reportando que el consumo de este aceite disminuyó la quimioluminiscencia inducida por NADPH y el contenido de productos de peroxidación de lípidos. El aceite de borraja normalizó el contenido de CYP450 comparado con el del grupo tratado con etanol, enfatizando que este efecto antioxidante sería la forma de normalización de la actividad hepática en el hígado graso.

En estudios realizados sobre el efecto hepatoprotector del extracto acuoso de hojas de *Moringa oleífera* Familia Moringaceae (6g/kg) en hepatotoxicidad aguda inducida por la administración intragástrica de alcohol (25%) (5g/kg) durante 03 días en ratas y seguido de un tratamiento de 03 días con esta planta; evaluando las enzimas GPT/ GOT y ALP, marcador de peroxidación lipídica mediante el ensayo TBARS y la concentración de vitamina C en su suero, se observó una

disminución significativa de TBARS y no disminución de vitamina C en suero en el grupo tratado (Nadro, et al., 2006).

Por otro lado Singanan et al., (2007) probaron el efecto de la administración intragástrica de hojas trituradas y suspendidas en solución salina de *Aegle marmelos* Familia Rutaceae (1g/kg) en ratas. Durante 40 días se administró alcohol (1ml, 30%) en las tardes a estos animales, seguido del tratamiento en mañana y tarde durante 21 días. En este caso los marcadores de funcionalidad hepática estudiados (TBARS, GSH, SOD y CAT) mostraron un efecto protector del extracto. De igual manera utilizando extracto acuoso de la raíz de *Platycodon grandiflorum* Familia Campanulaceae para observar el efecto hepatoprotector de las saponinas en ratas. Se administró el equivalente calórico de los carbohidratos utilizados en la dieta de las ratas control bajo la forma de alcohol durante 02 semanas y seguido de 02 semanas de tratamiento con el extracto en 0.5, 1.0, o 2.0 mg /kg/día. Se observó la disminución de triglicéridos hepáticos y la reducción de la expresión del citocromo CYP2E1 en el grupo tratamiento, concluyéndose que el extracto es un agente prometedor para el tratamiento de la enfermedad alcohólica grasa, (Khanal, et al., 2009). Otra especie vegetal donde se ha estudiado el efecto hepatoprotector del extracto metílico de hojas es *Tecomella undulata* Familia Bignoniaceae. Las ratas fueron sometidas a una administración oral de alcohol (30%) (1.5g/rata) durante 15 días y seguido de 15 días de tratamiento con 100, 200 mg/kg/día de extracto. No se observó necrosis centrolobular ni vacuolización en los grupos tratados, (Singh & Gupta, 2011).

El "overo", *Cordia lutea* Lamarck perteneciente a la Familia Boraginaceae es un arbusto perenne de hojas simples y escabrosas, flores amarillas y frutos oblongos blanco-opacos, se multiplica por semilla y por estacas, (Llatas S., 2005); Originaria de América tropical, se encuentra en la costa norte en los valles interandinos calurosos y en la selva entre los 0 y 1500 msnm, crece en lugares xerófilos como componente del bosque seco, pero se adapta bien a lugares húmedos, (Vásquez, et al., 2010). Tradicionalmente las flores (Corola, aparato reproductor) son

utilizadas en infusiones contra afecciones del Hígado, (Saavedra, 1995; Monigatti, et al., 2013), hepatitis, (Bussmann & Glenn, 2010; Rodriguez, 2012), como hepatoprotector, (Vásquez, et al., 2010).

Se reportan diferentes concentraciones en su preparación; así tenemos que una cucharada de flores trituradas en un litro de agua 4 veces al día, (Bussmann & Glenn, 2010), 5g de flores por litro como agua de tiempo, (Rodriguez, Q., 2012), y 30g de flores por litro tres veces al día, (Vásquez, et al., 2010). El consumo de su flor para afecciones hepáticas en humanos ha ido en aumento debido al interés en alternativas de medicina natural por parte de pacientes con afecciones hepáticas. Aunque no se reportan dosis tóxicas en humanos, Bussmann, et al., (2011) clasificaron al extracto acuoso como de toxicidad media (LC50= 462 ug/ml) y al alcohólico de toxicidad alta (LC50= 108 ug/ml) basados en ensayos en *Artemia salina*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Lugar de Ejecución

El trabajo fue realizado en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional "Pedro Ruiz Gallo"-Lambayeque. La histología fue realizada en Laboratorio de Histología del Hospital Nacional "Almanzor Aguinaga Asenjo."

2. Material vegetal

El material vegetal estuvo constituido por flores de "Overo" *Cordia lutea*, adquiridas en el mercado local (Fig. 01).



Figura 01: Flor de "Overo" *Cordia lutea* Lam. Familia Boraginaceae

3. Animales de experimentación

Fueron utilizadas ratas albinas de la cepa Sprague-Dawley. Estas fueron obtenidas de un proveedor local al momento del destete y Alimentadas *ad libitum* con purina (alimento balanceado), agua y dosis regulares de suplementos vitamínico, mineral diluidos, y desparasitantes hasta finalizado el experimento. Las ratas fueron criadas en un ambiente cerrado, separadas individualmente en compartimientos de acrílico de 25x25x30 cm, ciclo día/noche de 12/12h, la temperatura fue medida diariamente con termómetro ambiental.

4. Otros materiales

Entre los materiales utilizados para el experimento figuran el Etanol comercial (96%); suplementos vitamínicos - minerales: Suspensión oral Hematec, polvo soluble CHEMI STRESS RC; desparasitantes: Ivermectina, Promectine. Pentobarbital sódico.

5. Metodología

5.1. Preparación de la infusión de flor de "Overo"

En el laboratorio fueron seleccionadas las flores de "overo" en las mejores condiciones sanitarias y almacenadas para posterior uso. Un total de 06 flores completas excepto el cáliz (600 mg) fueron colocadas en 250 ml de agua corriente a 100 °C, la infusión se la dejó enfriar y reposar a temperatura ambiente por 12h y luego servida a las unidades de análisis del grupo correspondiente. El consumo diario fue registrado en mililitros. Para calcular el consumo en mg/kg/día se utilizó la fórmula 01:

$$(01). X = Y (2.4) (1000/P)$$

Donde: X, es el consumo de flor de overo en mg/kg/día; Y, es el consumo diario de la infusión en mililitros; 2.4, calculado de 600mg/250ml; y P es el peso de la unidad experimental.

5.2. Preparación de la solución de alcohol etílico

Fue preparada una dilución de etanol al 4% (v/v) y se administró a cada uno de los grupos experimentales correspondientes. El consumo diario fue registrado en mililitros. Para calcular el consumo en g/kg/día se utilizó la fórmula 02:

$$(02). X = Y (0.034) (1000/P)$$

Donde: X, es el consumo de alcohol en g/kg/día; Y, es el consumo de la dilución 4% diario en mililitros; 0.034, la concentración de alcohol en gramos por 100ml agua; P, Peso de cada unidad experimental.

Para propósitos comparativos en cuanto a volumen de líquido ingerido se utilizó la misma fórmula con los datos del consumo de agua del grupo control. Estos valores fueron incluidos en el análisis de varianza correspondiente (ANAVA).

5.3. Tratamiento experimental

Las ratas, *Rattus norvegicus*, cepa Sprague-Dawley (n=18) con un peso medio 192 gramos y 100 días de vida se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos para el trabajo experimental.

Grupo I: consumió agua *ad libitum*

Grupo II: consumió agua *ad libitum* conteniendo alcohol al 4% durante 120 días (el primer día fue al 1%, al siguiente día 2%, sucesivamente hasta alcanzar el 4%).

Grupo III: consumió agua *ad libitum* conteniendo alcohol al 4% durante 120 días (el primer día fue al 1%, al siguiente día 2%, sucesivamente hasta alcanzar el 4%), luego tomaron infusión de flor de "overo" por 21 días.

Los animales fueron observados al menos dos veces durante el día, y durante 02 horas en cada observación. Fueron registrados durante el

experimento: Temperatura del ambiente, peso, consumo de alcohol (GII y GIII), agua (GI); consumo de infusión de flor de overo (GIII).

Finalizado el experimento las ratas fueron anestesiadas con Pentobarbital sódico (40mg/kg), disectadas y el hígado perfundido según Gage, et al., (2012), con la diferencia de que la solución de perfusión se inyectó a través de la vena cava superior y no de la vena porta, de este modo la sangre del hígado salía a través de la vena cava inferior y la vena porta. Los hígados perfundidos fueron escindidos de la cavidad torácica y almacenados en formalina baferada (5%).

5.4. Histología

Los hígados perfundidos fueron llevados al Laboratorio de Histología del Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo en donde se realizaron cortes de 03 μ m (micrótopo Leica Rm2055). Los cortes fueron teñidos con eosina-hematoxilina. Las muestras fueron observadas a 40, 100, y 400x, las imágenes fueron registradas con una cámara SONY DSC-W710. Al menos 03 campos por muestra fueron utilizados para calcular el porcentaje promedio de hígado graso (400x) de cada unidad experimental, para ello se estimó la población nuclear siguiendo el protocolo de Abercrombie, (1946).

La severidad del hígado graso fue clasificado en 04 grados, (Nanji, et al., 2003; Zhang, et al., 2013): G1, \leq 25%; G2, 26-50%; G3, 51-75%; G4, >75% de núcleos con citoplasma con infiltración grasa vacuolizada.

5.5. Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el software SPSS 19: Estadística descriptiva para la variable temperatura ambiente; para las variables con mediciones repetidas según Sullivan, 2008: ANAVA mixta (01 factor intra y 01 factor inter-sujetos) de medidas repetidas para el peso, consumo de alcohol (GII y GIII) y agua (GI); ANAVA de un factor intra sujetos con medidas repetidas para el consumo de infusión de flor de "overo" (GIII); y ANAVA de un factor inter-sujetos para el porcentaje promedio de hígado graso. El nivel de significancia fue 0.05 y se consideró significativo cuando $p < 0.05$.

V. RESULTADOS

1. Temperatura

La temperatura media ambiental donde se realizó el experimento fue de 20.95 ± 0.3 °C.

2. Peso de las unidades experimentales

La ANAVA mixta de medidas repetidas determinó que no existió variación estadísticamente significativa entre los grupos experimentales ($F= 0.016$, $p=0.984$) con respecto al peso durante las 16 semanas, igualmente no hubo diferencias significativas con la corrección Greenhouse-Geisser entre los grupos a través de los tiempos ($F= 0.265$, $p =0.908$). Sin embargo los pesos medios dentro de los grupos experimentales con la corrección Greenhouse-Geisser varió significativamente ($F= 99.12$, $p<0.05$) a través del tiempo como se puede observar en la Tabla 01. En la figura 02 se puede apreciar la variación a través del tiempo del peso promedio dentro de los grupos experimentales además de una tendencia similar entre estos.

3. Consumo de Alcohol

La ANAVA mixta de medidas repetidas determinó que existe diferencia estadísticamente significativa entre el consumo de alcohol y agua de los grupos correspondientes ($F= 13.7$, $p< 0.05$), por lo menos en uno de los tiempos dentro de los grupos ($F= 6.7$, $p< 0.05$); así mismo que hubo diferencias significativas entre los grupos a través del tiempo que duró el experimento ($F= 4.5$, $p< 0.05$). El factor de corrección utilizado fue Greenhouse-Geisser (Tabla 02).

Tabla 01: ANOVA mixta con mediciones repetidas para diferencia en peso a través del tiempo.

Fuente de variación	Suma de cuadrados tipo III	GI	Media cuadrática	F	Sig.
Entre Grupos					
Grupo	1066.878	2	533.439	.016	.984
Error	500586.038	15	33372.403		
Dentro de Grupos					
Tiempo*	182875.305	2.144	85293.754	99.126	.000
Tiempo * Grupo	978.371	4.288	228.158	.265	.908
Error(Tiempo)	27673.251	32.161	860.461		

*Tiempo= 16 semanas

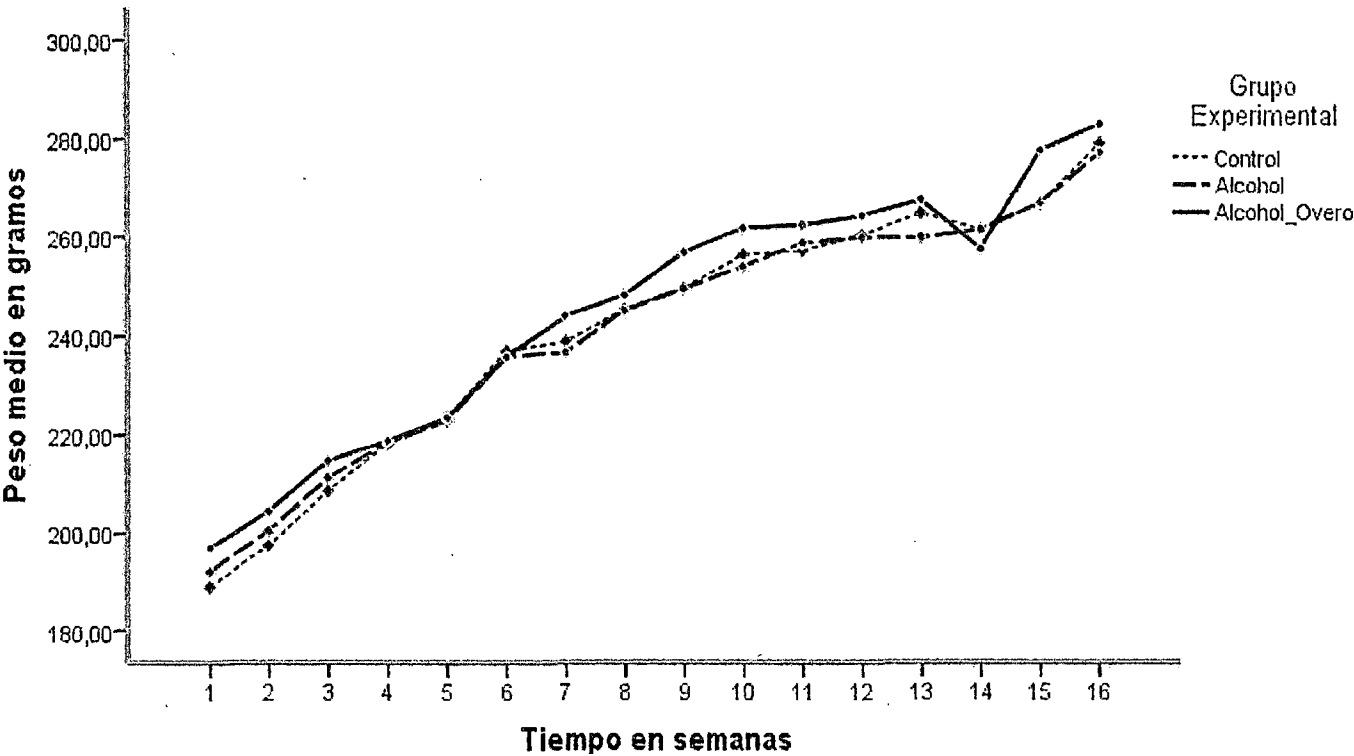


Figura 02: Peso medio de GI (Control), GII (Alcohol), y GIII (Alcohol_Overo) durante 16 semanas.

El análisis post Hoc con la prueba de Games-Howell para varianzas heterocedasticas determinó que existe diferencia significativa entre el consumo de agua del grupo control y el consumo de alcohol del grupo II ($p= 0.013$), consumo de agua del grupo control y consumo de alcohol del grupo III ($p= 0.001$), sin embargo no existió diferencia estadísticamente significativa entre el consumo global de alcohol del grupo II y III ($p= 0.949$) (Tabla 03).

En la figura 03 se muestran las líneas de interpolación del consumo medio de agua o alcohol en los grupos experimentales a través del tiempo. El consumo medio de alcohol durante las 16 semanas fue 3.14 ± 0.44 g/kg/día.

4. Consumo de Flor de “overo”

El ANAVA de un factor para mediciones repetidas con la corrección Greenhouse-Geisser demostró que no existió diferencia estadísticamente significativa ($F=2.92$, $p=0.104$) en el consumo de infusión de flor de “overo” durante los 21 días (Tabla 04). En la figura 04 se observa la línea de interpolación para el consumo medio de infusión de flor de “overo”. El consumo medio total del grupo experimental 03 fue de 222.14 ± 20.4 mg/kg/día entendiéndose para este caso que los miligramos de flor de “overo” corresponderían a la masa seca de la cual se hizo la infusión.

Tabla 02: Anova mixta de mediciones repetidas para la diferencia de consumo de alcohol (GII, GIII) y agua (GI) a través del tiempo en g/kg/día.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	GI	Media cuadrática	F	Sig.
Grupo	45.844	2	22.922	13.703	.000
Error	25.091	15	1.673		
Dentro de Grupos					
Tiempo*	15.523	4.455	3.485	6.744	.000
Tiempo * Grupo	20.969	8.909	2.354	4.555	.000
Error(Tiempo)	34.524	66.821	.517		

*Tiempo= 16 semanas

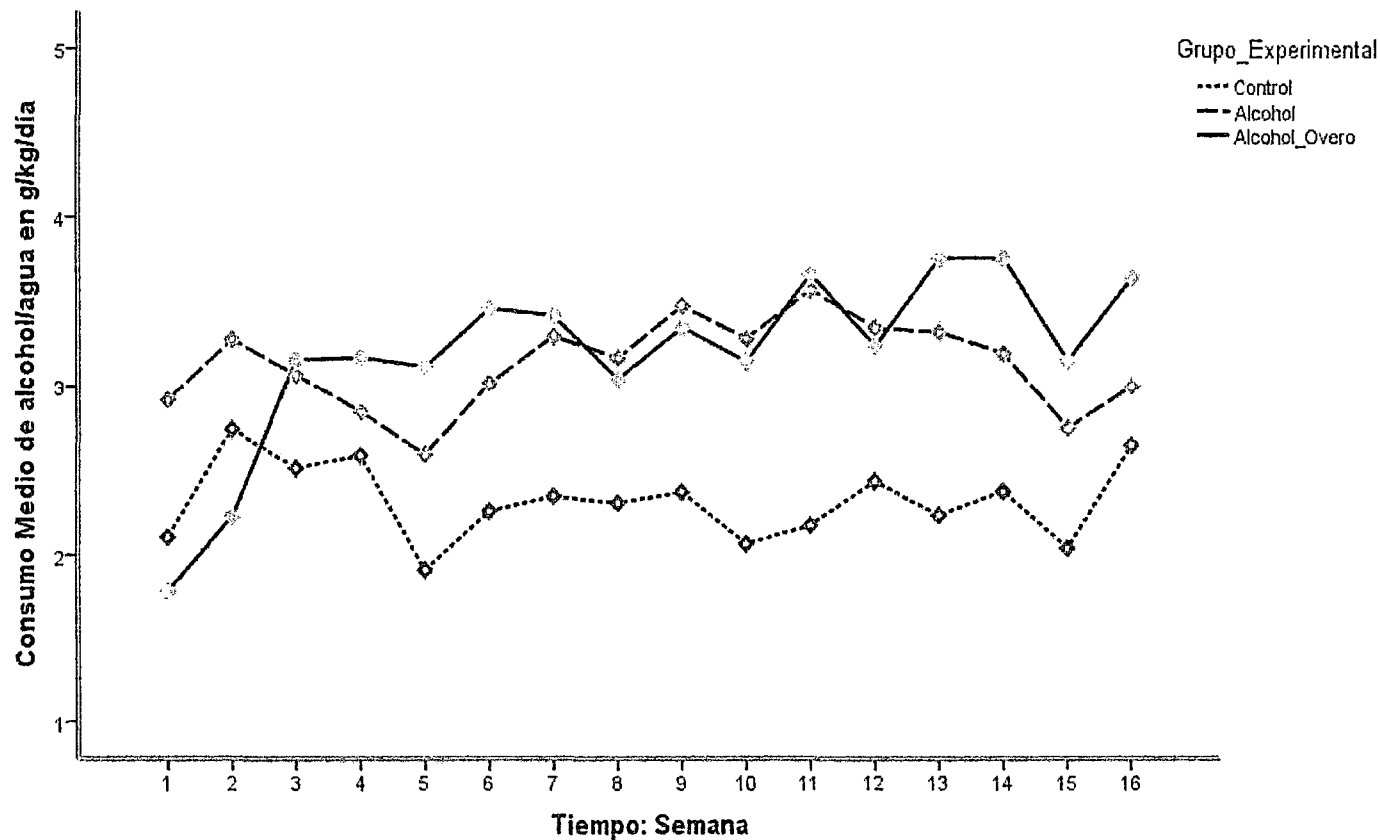


Figura 03: Consumo medio de alcohol (GII, GIII) y agua (GI) en g/kg/día durante 16 semanas.

Tabla 03: Prueba de Games-Howell de Comparaciones múltiples para la diferencia de consumo de alcohol (GII, Alcohol; GIII, Alcohol_Overo) y agua (GI, Control)

	(I)Grupo_Experimental	(J)Grupo_Experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.
Games-Howell	Control	Alcohol	-,8153	.22087	.013
		Alcohol_Overo	-,8743	.13993	.001
	Alcohol	Control	,8153	.22087	.013
		Alcohol_Overo	-,0590	.19023	.949
	Alcohol_Overo	Control	,8743	.13993	.001
		Alcohol	.0590	.19023	.949

Tabla 04: ANOVA de un factor para medidas repetidas para la diferencia de consumo de infusión de flor de “overo” en mg/kg/día a través de los 21 días de tratamiento en el Grupo III

Fuente de Variación	Corrección	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tiempo	Greenhouse-Geisser	49936.375	1.891	26408.741	2.928	.104
Error(Tiempo)	Greenhouse-Geisser	85281.717	9.455	9020.209		

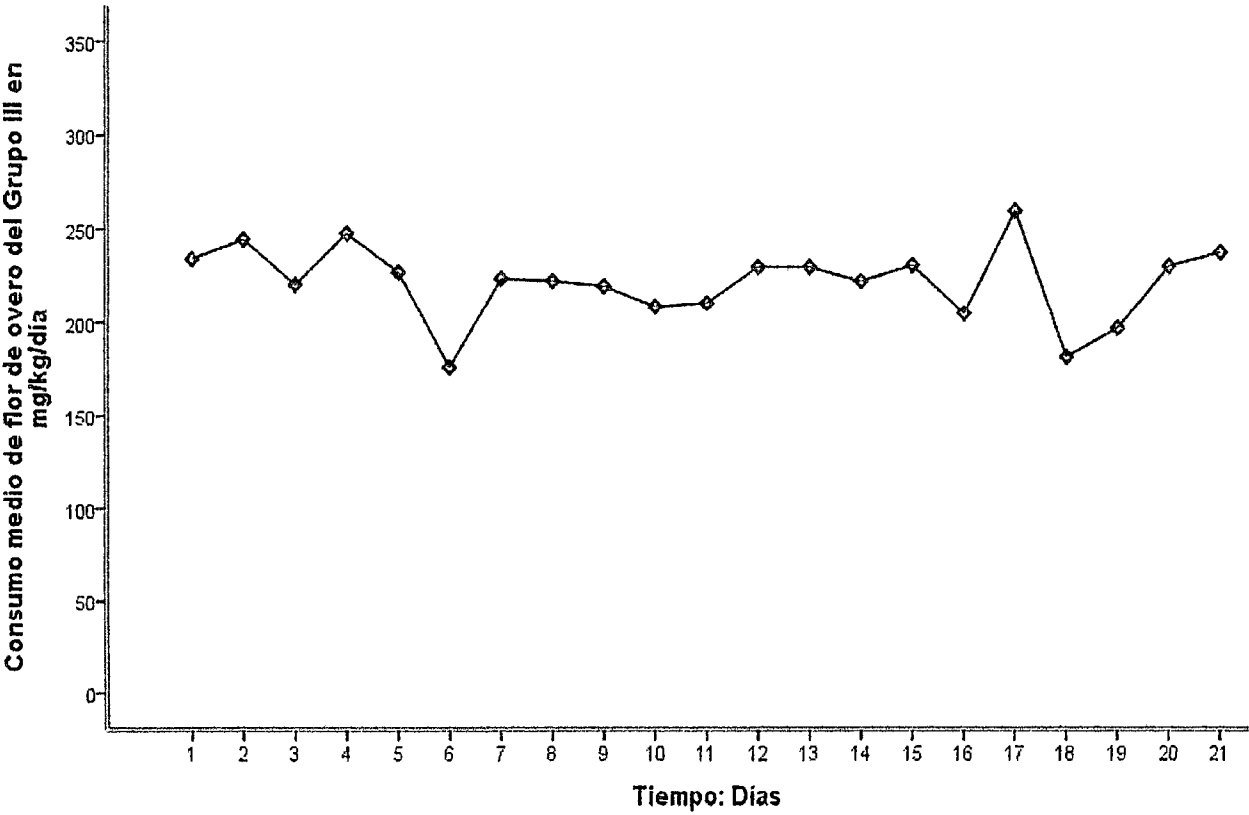


Figura 04: Consumo medio de flor de overo en infusión del Grupo III, en mg/kg/día.

5. Análisis Histológico del Efecto Regenerador de la Infusión de flor de “Overo”

En el reconocimiento general de la estructura microscópica del hígado de ratas del grupo control se observaron el acino hepático de rappaport, la vena central, el espacio porta (triada portal), los sinusoides hepáticos, los hepatocitos y las células kupffer (Fig. 05).

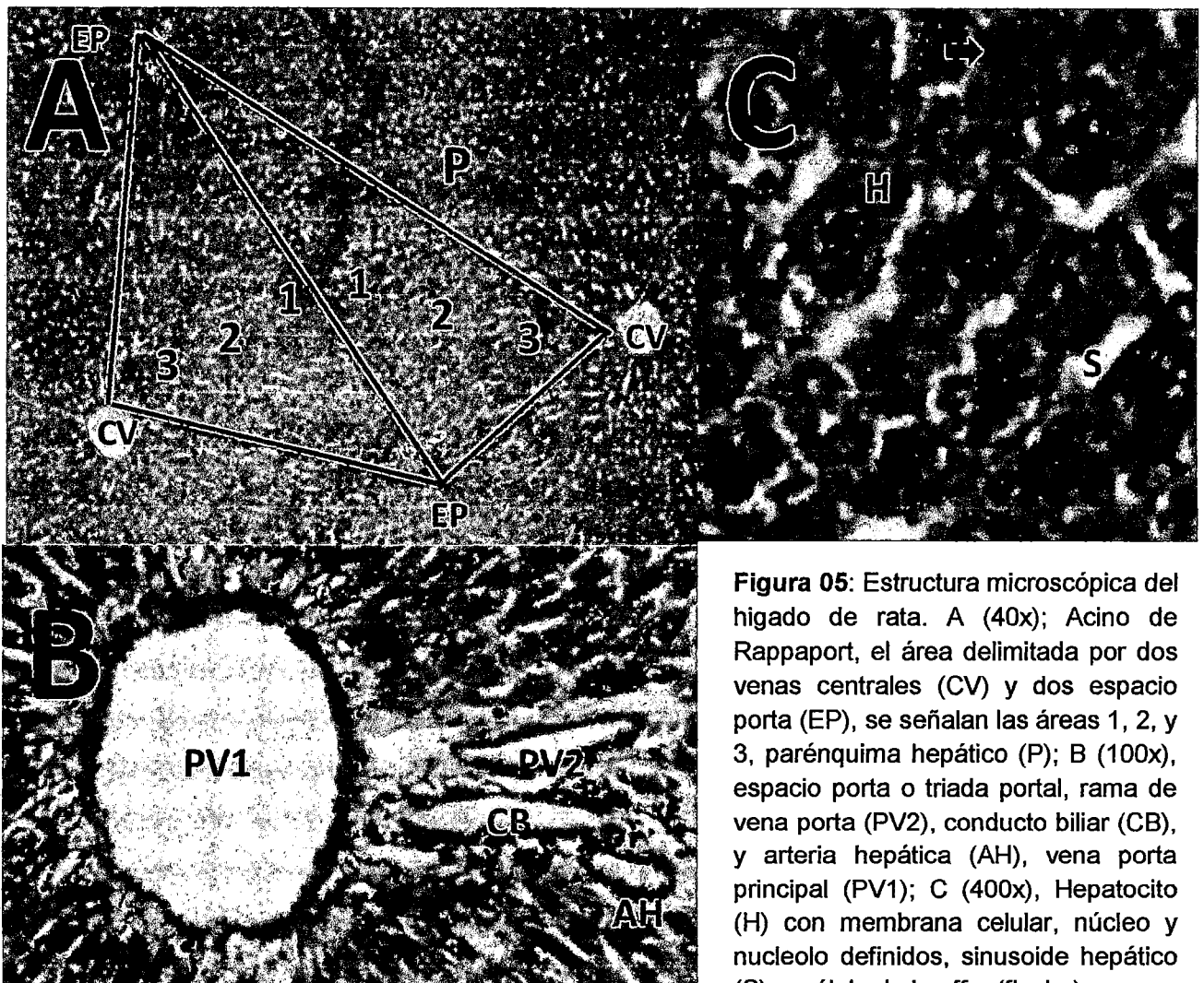


Figura 05: Estructura microscópica del hígado de rata. A (40x); Acino de Rappaport, el área delimitada por dos venas centrales (CV) y dos espacio porta (EP), se señalan las áreas 1, 2, y 3, parénquima hepático (P); B (100x), espacio porta o triada portal, rama de vena porta (PV2), conducto biliar (CB), y arteria hepática (AH), vena porta principal (PV1); C (400x), Hepatocito (H) con membrana celular, núcleo y nucleolo definidos, sinusoides hepático (S), y célula de kupffer (flecha).

La histopatología del grupo que consumió alcohol sin ser tratado mostró una infiltración grasa macrovesicular perivenosa que no superó el grado I de severidad. Los grupos control y alcohol_overo presentaron infiltración grasa relativamente menor con porcentajes de células vacuoladas menores a 5%. No se observó en ninguno de los grupos infiltración de macrófagos en la zona periportal. (Fig. 06)

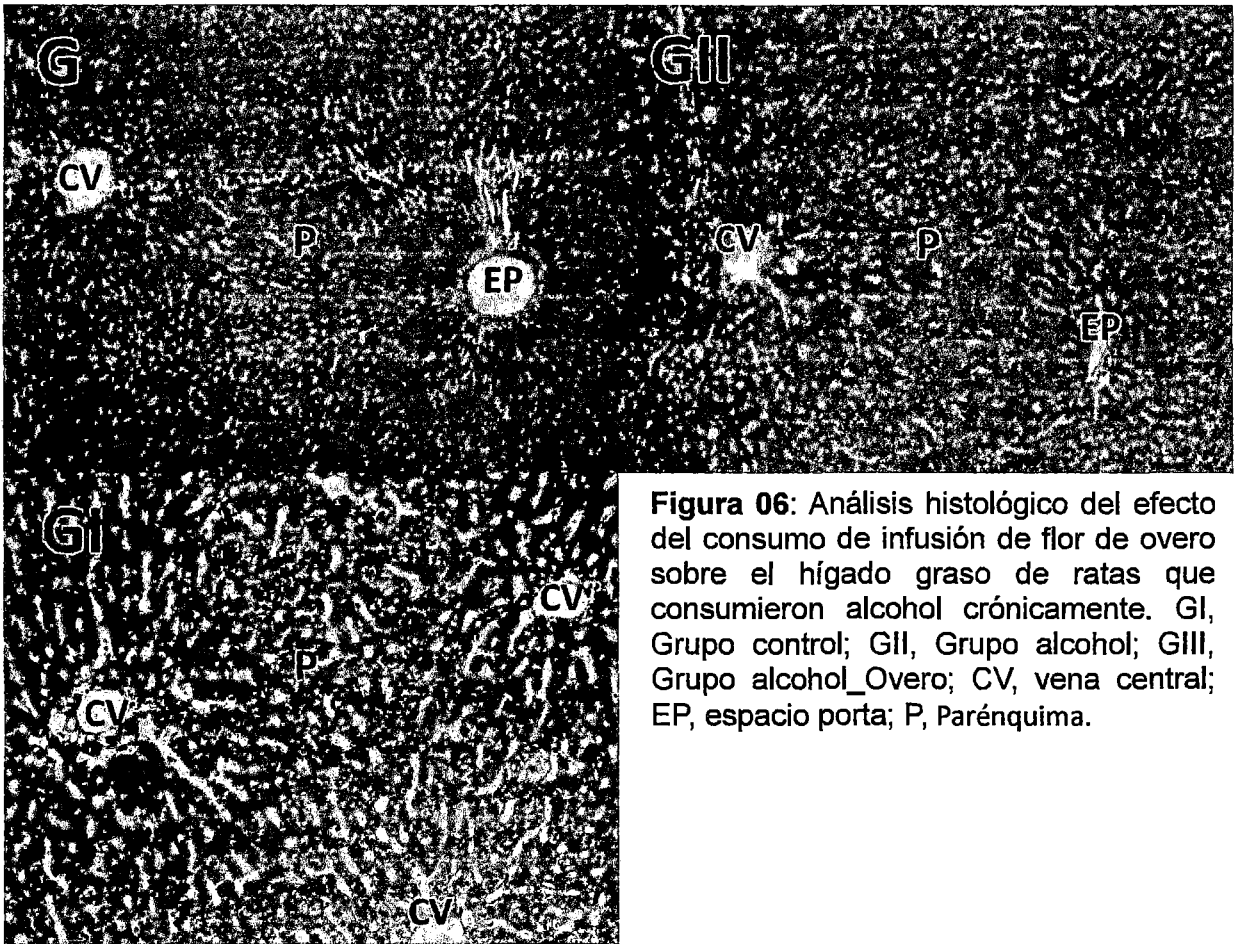


Figura 06: Análisis histológico del efecto del consumo de infusión de flor de overo sobre el hígado graso de ratas que consumieron alcohol crónicamente. GI, Grupo control; GII, Grupo alcohol; GIII, Grupo alcohol_Overo; CV, vena central; EP, espacio porta; P, Parénquima.

En cuanto al análisis estadístico del porcentaje de hígado graso de las unidades experimentales de cada grupo: El estadístico de Levene ($EL=1.225$, $p= 0.321$) no fue significativo para la diferencia de varianzas de los grupos I, II, y III. El ANAVA de un factor fue significativo para la diferencia de medias del porcentaje de hígado graso entre los grupos ($F= 68.69$, $p< 0.05$). Según las comparaciones múltiples del

test de Tukey: Los porcentajes de hígado graso de los grupos I (Control) y III (Alcohol_Overo) son estadísticamente iguales ($P= 0.411$), mientras que el porcentaje de hígado graso del grupo II (Alcohol) fue significativamente diferente ($p< 0.05$) comparado con los grupos I y III (Tabla 05). En la figura 07 se muestra el gráfico de cajas para las medias de los grupos experimentales.

Tabla 05: ANOVA de un factor y prueba de Tukey para la diferencia de medias del porcentaje de hígado graso entre los grupos I (Control), II (Alcohol), y III (Alcohol Overo).

ANOVA					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	296.494	2	148.247	68.696	.000
Intra-grupos	32.370	15	2.158		
Total	328.864	17			

PRUEBA DE TUKEY					
	(I) Grupo_Experimental	(J) Grupo_Experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
HSD de Tukey	Control	Alcohol	-9.1111	.8481	.000
		Alcohol_Overo	-1.1111	.8481	.411
	Alcohol	Control	9.1111	.8481	.000
		Alcohol_Overo	8.0000	.8481	.000
	Alcohol_Overo	Control	1.1111	.8481	.411
		Alcohol	-8.0000	.8481	.000

6. Comportamiento de la unidades experimentales

El comportamiento de las ratas que consumieron alcohol de manera paulatina fue cambiando, presentando poco movimiento, apatía, tendencia a dormir, falta de acicalamiento y temblor en las patas anteriores. Siete días después de iniciar el tratamiento con la ingesta de la infusión de flor de “overo”, su comportamiento cambio fue cambiando respecto al movimiento y acicalamiento. Sin embargo, el temblor en las patas delanteras persistió aún después de los 21 días de beber la infusión.

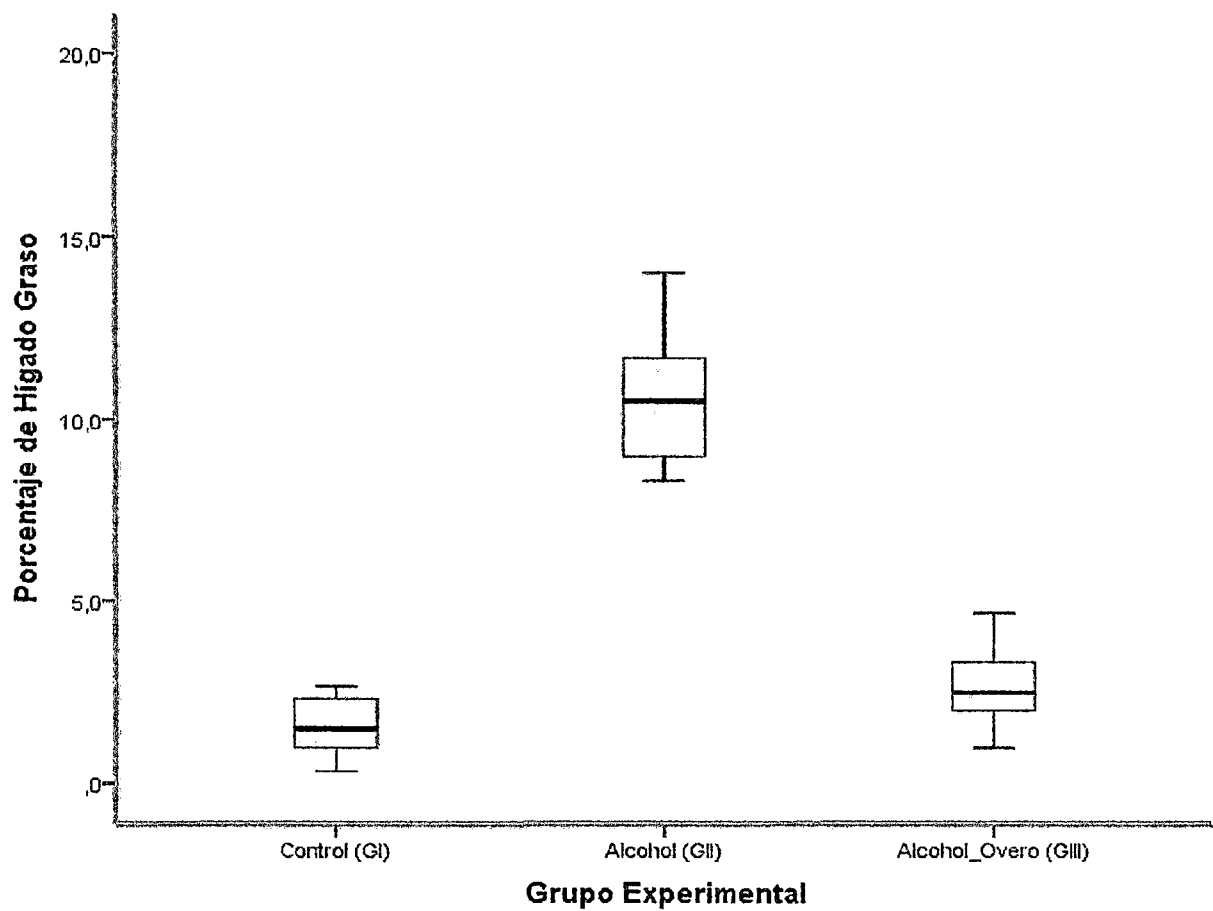


Figura 07: Gráfico de cajas del porcentaje de hígado graso de los grupos experimentales.

VI. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que la infusión de flor de "overo" regeneró el hígado graso de ratas que consumieron alcohol crónicamente, lo cual es congruente con el uso tradicional para afecciones hepáticas reportado en la literatura, (Llatas, 2005; Monigatti, et al., 2013; Bussmann & Glenn, 2010; Rodriguez, 2012; Saavedra, 1995; Vásquez, et al., 2010). Sin embargo, la degeneración grasa en el grupo que consumió alcohol no superó el grado I ($\leq 25\%$) no concordando con los resultados reportados Nanji, et al., (2003) y Zhang, et al., (2013), en cuyos trabajos el grupo que consumió alcohol desarrollo hígado graso superior al grado III y grado IV respectivamente. En el presente trabajo la cantidad de alcohol por día consumido y el estado nutricional de las ratas podrían explicar la relativa baja degeneración grasa.

El consumo medio total voluntario de alcohol fue de 3.14 g/kg/día, mientras que otros trabajos reportan cantidades de 5 (Nadro, et al., 2006), 8 a 16 (Nanji, et al., 2003), 6 a 8 (Zhang, et al., 2013), y 10 a 12 (Ronis, et al., 2010) gramos de alcohol/kg/día, pero por vía intragástrica evadiendo de esta manera la aversión natural de las ratas hacia el alcohol (Brandon-Warner, et al., 2012; Haack, et al., 2014). El consumo de alcohol puede considerarse relativamente bajo.

En humanos alcohólicos se han encontrado deficiencias vitamínicas correlacionadas con la cantidad de alcohol consumido (Lieber, 2003; Griffith & Schenker, et al., 2006), debido a esto las ratas fueron suplementadas con dosis regulares *ad libitum* de vitaminas hidrosolubles, liposolubles, y minerales (Calcio, sodio, potasio, magnesio, fósforo, y cobalto) con el propósito de que las ratas no sufrieran deficiencias. Este consumo pudo haber evitado una degeneración grasa mayor. De lo anterior se puede inferir que las ratas no presentaron deficiencias vitamínicas aún con el consumo de alcohol. Sin embargo, también se observó temblor en las patas delanteras de estos animales lo cual está relacionado con deficiencia de vitaminas del complejo B (B1, B3, B6, y B12) producto del consumo excesivo de alcohol (Ryle & Thomson, 1984; Spinneker et al, 2007); por otro lado,

se conoce que la deficiencia de B6 provoca homocisteinuria la cual junto con la deficiencia de la vitamina B12 están relacionadas con el temblor en infantes, (Crawford & Zimmerman, 2011). Dado que la concentración de vitaminas séricas y/o hepáticas no fueron medidas, y que no se descartó el temblor de las patas delanteras como parte del síndrome de abstinencia, semejante a lo observado en humanos (Drug and Alcohol Withdrawal Clinical Practice Guidelines – NSW, 2008.) no se puede aceptar o negar el efecto de esta dosis vitamínica sobre el grado de degeneración grasa en las ratas. En cualquier caso, la infusión de flor de “overo” mejoró el hígado graso del grupo tratado.

No existió diferencia significativa en cuanto al consumo de infusión de flor de “overo” (media total = 222.14 +- 20.4 mg/kg/día). La aplicación clínica más próxima sería calcular la dosis de un paciente con respecto a su peso. Sin embargo, si se quiere llevar a la práctica clínica más investigaciones serán necesarias, especialmente con respecto a la toxicidad de algunos metabolitos presentes en extracto alcohólico (Bussmann, et al., 2011).

VII. CONCLUSIONES

1. El análisis histológico permitió evidenciar la regeneración hepática de ratas que consumieron alcohol crónicamente tratadas con infusión de flor de "overo".
2. No se encontraron diferencias significativas entre el consumo de alcohol de los grupos II (Alcohol) y III (Alcohol_Overo) cuya media total fue de 3.14 g/kg/día.
3. El consumo medio total de infusión de flor de "overo" fue de 222.14 mg/kg/día.
4. Las ratas tratadas con infusión de flor de overo modificaron su comportamiento respecto al movimiento y acicalamiento mas no en cuanto el temblor de las patas delanteras.

VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar otros experimentos similares con ratas incrementando la concentración del alcohol, midiendo la concentración de vitaminas en el hígado y suero, y la concentración de alcohol en la sangre.
- Identificar el mecanismo de acción del efecto regenerador de la flor de "overo".
- Extraer, identificar, y experimentar la eficacia individual de metabolitos secundarios presentes en la flor de "overo".

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abercrombie, M.**, (1946). Estimation of nuclear population from microtome sections. *The Anatomical Record*, 94: 239-247.
2. **Adachi M & Brenner DA.**, (2005). Clinical syndromes of alcoholic liver disease. *DigDis*; 23:255–263.
3. **Aithal G, Guha N, Fallowfield J, Castera L, Jackson AP.**, (2012). Biomarkers in Liver Disease: Emerging Methods and Potential Applications. *International Journal of Hepatology* 2012:1-4.
4. **Amacher DE.**, (2002). A toxicologist's guide to biomarkers of hepatic response. *Human & Experimental Toxicology* 21, 253-262
5. **Bouneva I, Abou-Assi S, Heuman DM, Mihas AA.**, (2013). Alcoholic liver disease. *Hospital physician oct*: 31-38.
6. **Brandon-Warner, E., Schrum, L. W., Schmidt, C. M., McKillop, I. H.**, (2012). Rodent models of alcoholic liver disease: Of mice and men. *Alcohol* 46: 715 – 725.
7. **Brunt EM, Tiniakos DG.**, (2010). Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2010 November 14; 16(42): 5286-5296
8. **Bussmann RW & A Glenn.**, (2010). Plantas peruanas usadas como remedios para hígado y vesicular. *Arnaldoa* 17(2): 243 - 253, 2010
9. **Bussmann RW & A Glenn.**, (2010a). Medicinal plants used in Northern Peru for reproductive problems and female health. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 6, 30: 1-12.
10. **Bussmann, R. W., Malca, G., Glenn, A., Sharon, D., Nilsen, B., Parris, B., Dubose, D., Ruiz, D., Saleda, J., Martinez, M., Carrillo, L., Walker, K., Kuhlman, A., Townesmith, A.**, (2011). Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. *Journal of Ethnopharmacology* 137 (2011), 121-140.
11. **Cascales M., Robles E., Cascales C., Santos M.**, (2009) Intoxicación etílica y estrés. oxidativo. *Anales: Real Academia Nacional de Farmacia. España.*
12. **Crawford P. & Zimmerman EE.**, (2011). *American Family Physician*. Vol 83, 06: 697-702.
13. **DEVIDA.**, (2008). Uso y consecuencias del consumo de bebidas alcohólicas. *Bull* 1(9). Lima Perú.
14. **Devore S, Kohli R, Lake K, Nicholas L, Dietrich K, Balistreri WF, Xanthakos SA.**, (2013). A Multidisciplinary Clinical Program is Effective in Stabilizing BMI and Reducing Transaminase Levels in Pediatric Patients with NAFLD. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. Mar 19.

15. **European Association for the Study of the Liver.**, (2012). EASL Clinical Practical Guidelines: Management of Alcoholic Liver Disease. *Journal of Hepatology* vol. 57: 399–420.
16. **Fernández D. E., Fernández J. E., Moreno M. I., Moreno M. M.**, (2008). Aproximación al diagnóstico de enfermedades hepáticas por el laboratorio clínico. *Editora Médica Colombiana S.A.*; 14: 533-546.
17. **Fooladi A., Hosseini H., Nou-rani M., Khani S., Alavian S.**, (2013). Probiotics as a novel treatment strategy against liver disease. *Hepat Mon.* 2013;13(2): e7521.
18. **Gage, J. G., Kipke, R. D., Shain, W.**, (2012) Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. *Journal of Visualized Experiments*, (65), e3584
19. **Griffith, C. M., and Schenker, S.**, (2006). The role of nutritional therapy in alcoholic liver disease. *Alcohol Research and Health*, 29 (4): 296 – 306.
20. **Haack, A. K., Sheth, C., Schwager, A. L., Sinclair, M. S., Tandor, S., Taha, S. A.**, (2014). Lesions of the Lateral Habenula increase voluntary ethanol consumption and operant self-administration, block Yohimbine-induced reinstatement of ethanol seeking, and attenuate ethanol-induced conditioned taste aversion. *PLoS ONE*, 9 (4); e92701.
21. **Itoh, T., Miyajima, A.**, (2014). Liver Regeneration by Stem/Progenitor Cells. *Hepatology*, Vol. 59, N° 4, 1617-1626.
22. **Ji C.**, (2011). Mechanisms of alcohol-induced endoplasmic reticulum stress and organ injuries. *Biochemistry Research International*. Volume 2012, Article ID 216450, 12 pag.
23. **Karthikeyan, S., Potter, J., Geschwind, J., Sur, S., Hamilton, J., Vogelstein, B., Kinzler, K., Mezey, E., Ganapathy-Kanniappan, S.**, (In press). Deregulation of energy metabolism promotes antifibrotic effects in human hepatic stellate cells and prevents liver fibrosis in a mouse model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
24. **Khanal, T., Choi, H. J., Hwang, P. Y., Chung, C. Y., Jeong, G. H.**, (2009). Protective effects of saponins from the root of *Platycodon grandiflorum* against fatty liver in chronic ethanol feeding via the activation of AMP-dependent protein kinase. *Food and Chemical Toxicology*; 47: 2749-2754.
25. **Koop D.**, (2006). A focus on reactive oxygen generation by the enzyme cytochrome P450 2E1. *Alcohol research and Health*. Vol 29, No. 4: 274-280.
26. **Koutsogiannis D, Summers K, George B, Adams P, Marotta P, Chakrabarti S.**, (2010). Identification of Serum Biomarkers in End Stage Liver Disease. *The Open Biomarkers Journal*. 3, 1-6.

27. **Kumar, V., Abbas, K. A., Fausto, N.,** (2005). Robbins and Cotran Pathologic Basis of disease. China, Elsevier Inc.
28. **Lieber, C. S.,** (2003). Relationships between nutrition, alcohol use and liver disease. Alcohol Research and Health, 27 (3): 220 – 231.
29. **Llatas, S. Q.,** (2005). Botánica fanerogámica. Lambayeque, Perú.
30. **Louvet, A. and Mathurin, P.,** (2015). Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. Nature Reviews, Gastroenterology, Hepatology. 12, 231-242
31. **Lukivskaya OY, Naruta E, Sadovnichy V, Kirko S, BukoVU.,** (2012). Reversal of experimental ethanol-induced liver steatosis by borage oil. Phytoter Res. Nov;26(11):1626-31.
32. **Marra F & S. Lotersztajn.,** (2013). Pathophysiology of NASH: Perspectives for a Targeted Treatment. Current Pharmaceutical Design Vol. 19: 1-20
33. **Miyaoka, Y., Miyajima, A.,** (2013). To divide or not to divide: Revisiting liver regeneration. Cell Division, 8:8.
34. **Monigatti, M., Bussmann, W. R., Weckerle, S. C.,** (2013). Medicinal plant use in two Andean communities located at different altitudes in the Bolívar Province, Perú. Journal of Ethnopharmacology 145 (2013), 450-464.
35. **Nadro, M. S., Arungbemi, R.M., Dahiru, D.,** (2006). Evaluation of *Moringa oelifera* leaf extract on alcohol-induced hepatotoxicity. Tropical Journal of Pharmaceutical Research; 5(1): 539-544.
36. **Nanji, A. A., Jokelainen, K., Tipoe, L. G., Rahemtulla, A., Thomas, P., Dannenberg, J. A.,** (2003). Curcumin prevents alcohol-induced liver disease in rats by inhibiting the expression of NF-kB-dependent genes. American Journal of Physiology Gastrointest Liver Physiology 284: G321-G327.
37. **Nobili V., Carter-Kent C., Feldstein A.,** (2011). Role of lifestyle changes in the management of chronic liver disease. BMC Medicine, 9:70.
38. **NSW Government. Mental Health and Drug and Alcohol office. January.,** (2008). Drug and alcohol withdrawal Clinical Practice Guidelines – NSW. Australia: NSW Department of Health.
39. **Pinzone M., Celesia B., Di Rosa M., Cacopardo B., Nunnari G.,** (2012). Microbial translocation in chronic liver disease. International Journal of Microbiology. Volume 2012, ID 694629, 12 pag.
40. **Poynard T, Ngo Y, Munteanu N, Thabut D, Massard J, Moussalli J, Varaud A, Benhamoud I, Ratzu B.,** (2010). Biomarkers of liver injury for hepatitis clinical trials: a meta-analysis of longitudinal studies. Antiviral therapy 15: 617-631.

41. **Rodriguez, Q. M.**, (2012). Manejo de plantas medicinales en el Nororiente Amazónico Peruano. Lima, Perú, Guzlop Editoras.
42. **Ronis, M. J., Korourian, S., Blackburn, M. L., Badeaux, J., Badger, T. M.**, (2010). The rol of ethanol metabolism in development of alcoholic steatohepatitis in the rat. *Alcohol*, 44; 157-169.
43. **Ryle PR, Thomson AD.**, (1984). Nutrition and vitamins in alcoholism. *Contemp Issues Clin Biochem*. Vol 1: 188-224
44. **Saavedra, J. J.**, (1995). Plantas medicinales de la sierra central de Piura. Piura, Perú, Espacio y Desarrollo N° 7.
45. **Singanan, V., Singanan, M., Begum, H.**, (2007). The hepatoprotective effect of Bael leaves (*Aegle marmelos*) in alcohol induced liver injury in albino rats. *International Journal of Science & Technology*; 2(2): 83-92.
46. **Singh, D., Gupta, R. S.**, (2011). Hepatoprotective activity of methanol extract of *Tecomella undulate* against alcohol and paracetamol induced hepatotoxicity in rats. *Life sciences and Medicine Research*, Volume 2011 (26).
47. **Spinneker A., Sola R., Lemmen V., Castillo MJ., Pietrzik K., And Gonzales-Gross M.**, (2007). Vitamin B₆ Status, deficiency and its consequences - and overview. *Nutr Hosp*. 22 (1): 7-24.
48. **Su, I. A., Guidotti, G. L., Pezacki, P. J., Chisari, V. F., Schultz, G. P.**, (2002). Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 99, N° 17, 11181-11186.
49. **Sullivan, L. M.**, (2008). Statistical Primer for cardiovascular research. *Circulation*; 117: 1238-1243.
50. **Theise ND.**, (2013). Histopathology of alcoholic liver disease. *ClinicalLiverDisease*, vol. 2, No 2, April 2013.
51. **Tsedensodnom O., Vacaru A., Howarth D., Yin C., Sadler K.**, (2013). Ethanol metabolism and oxidative stress are required for unfolded protein response activation and steatosis in Zebrafich with alcoholic liver disease. *Disease Models And Mechanisms* 6, 000-000.
52. **Vásquez, N. L., Ecurra, P. J., Aguirre, T. R., Vásquez, S. G., Vásquez, A. L. P.**, (2010). Plantas medicinales del Norte de Perú, Lambayeque, Perú, UNPRG-FINCYT.
53. **Zhang, W., Hong, R., Tian, T.**, (2013). Silymarin's protective effects and possible mechanisms on alcoholic fatty liver for rats. *Biomolecules and Therapeutics*, 21(4), 264-269.