

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA
ESCUELA ACADEMICO PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



Efecto de los flavonoides totales de hojas de *Cordia lutea* Lam.
sobre hepatotoxicidad inducida por Tetracloruro de carbono en
Rattus norvegicus var. *albinus*.

TESIS II

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO
DE

BACHILLER EN FARMACIA Y
BIOQUÍMICA

AUTORES : GARCÍA MÉNDEZ, MARITZA ELIZABETH
SANDOVAL BRICEÑO, JONATAN JESÚS

ASESOR : Q.F. SILVA CORREA CARMEN ROSA

TRUJILLO – PERÚ

2016

DEDICATORIA

A Dios

*Al creador y dador de la vida, por estar a nuestro lado
guiándonos en cada paso dado, por fortalecer nuestro
corazón e iluminar nuestra mente y por haber puesto en
el camino a aquellas maravillosas personas que han sido
nuestro soporte y compañía durante el período de
estudio.*

A Nuestros Padres

*Por habernos brindado su apoyo
incondicional, sus consejos y cariño
en cada momento de nuestras vidas.*

A nuestro asesora Carmen Rosa Silva Correa

*Gracias por su tiempo, por la colaboración, paciencia, apoyo y
sobre todo por su gran amistad y por haber guiado el desarrollo
de este trabajo y llegar a la culminación del mismo.*

Maritza y Jonatan

PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento con las disposiciones vigentes emanadas del reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, sometemos a vuestro elevado criterio, el presente informe de Tesis intitulado:

Efecto de los flavonoides totales de hojas de *Cordia lutea* Lam. sobre hepatotoxicidad inducida por Tetracloruro de carbono en *Rattus norvegicus* var. *albinus*.

Sea propicia esta oportunidad para manifestarles el más profundo agradecimiento a nuestra Alma Mater y toda su plana docente, por su meritoria labor de educadores y por la formación profesional que nos han brindado a través de sus enseñanzas.

De manera muy especial agradecemos la colaboración de los señores miembros del jurado.

Dejamos a vuestra consideración señores Miembros del Jurado, la respectiva calificación del presente informe.

Trujillo, Enero del 2016

García Méndez Maritza Elizabeth

Sandoval Briceño Jonatan Jesús

JURADO DICTAMINADOR

Mg. José Lizardo Cruzado Razco -----**PRESIDENTE**

Mg. Gamarra Sánchez Cesar Demófilo -----**MIEMBRO**

Q.F. Carmen Rosa Silva Correa -----**MIEMBRO**

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
PRESENTACIÓN	ii
JURADO DICTAMINADOR	iii
RESUMEN	v
ABSTRACT	¡Error! Marcador no definido.vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIAL Y MÉTODO	12
III. RESULTADOS.....	20
IV. DISCUSIÓN.....	25
V. CONCLUSIONES:	32
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
VI. ANEXOS.....	40

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto protector de los flavonoides totales de las hojas de *Cordia lutea* Lam. sobre hepatotoxicidad inducida por Tetracloruro de carbono en *Rattus norvegicus* var. *albinus*. Se utilizaron 32 ratas albinas, machos adultos, con peso entre 300 g, los cuales fueron distribuidos al azar en 4 grupos, de 8 animales cada uno: **Grupo I** (Blanco: NaCl 0.9%), **II** (Control: CCl₄), **III** (Problema I :10mg/Kg p.c. flavonoides totales + CCl₄) y **IV** (Problema II: 20mg/Kg p.c. flavonoides totales + CCl₄). Cada tratamiento se administró en ayunas, por vía oral durante 15 días mediante sonda nasogástrica. En los grupos III y IV primero se administró la dosis de flavonoides y luego de 2h se administró 0.1mL CCl₄ 10% en aceite de oliva. Se determinaron valores séricos basales y post-estímulo (luego de 15 días) de ALT, BT, BD y BI. Se realizó el estudio histopatológico a los hígados de todos los grupos experimentales, analizándose los parámetros microscópicos. En el grupo II (control) se observó toxicidad hepática evidente al aumentar significativamente los niveles de ALT y bilirrubinas y producir mayor alteración en la estructura de hepatocitos. En el grupo III con una dosis 10mg/Kg de flavonoides totales de hojas de *Cordia lutea* Lam. se muestran niveles séricos de ALT, BT, BD y BI elevados, con respecto a sus valores basales respectivos ($p < 0.05$) que se corresponden con la alteración histopatológica. Mientras que el grupo IV con una dosis 20mg/Kg de flavonoides totales se muestran niveles séricos de ALT, BT, BD y BI similares a sus valores basales respectivos ($p > 0.05$).

Se concluye que los flavonoides totales de hojas de *Cordia lutea* Lam. tienen efecto hepatoprotector y previenen la hepatotoxicidad inducida por Tetracloruro de carbono en *Rattus norvegicus* var. *albinus* a la dosis de 20mg/Kg p.c.

Palabras clave: *Cordia lutea* Lam, flavonoides, tetracloruro de carbono, hepatotoxicidad, hígado, *Rattus norvegicus* var. *albinus*.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

ABSTRACT

The objective of this investigation was to determine the protective effect of total flavonoids from the leaves of *Cordia lutea* Lam. on hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride in *Rattus norvegicus* var. *albinus*. Were utilized 32 albino rats, male adults, weighing between 300 g, which were randomized into 4 groups, of 8 animals each: **Group I** (Blank: NaCl 0.9%), **II** (Control: CCl₄), **III** (Problem I: 10mg/kg bw total flavonoids + CCl₄) and **IV** (Problem II: 20mg/kg bw total flavonoids + CCl₄). Each treatment was administered under fasting conditions, orally for 15 days by oral gavage. In Groups III and IV first was administered dose flavonoids and after 2h was administered 0.1mL CCl₄ 10% in olive oil. Serum basal and post-stimulus (after 15 days) were determined of ALT, BT, BD BI. Was conducted histopathological study of livers all experimental groups, analyzing the microscopic parameters. In group II (control) was observed evident liver toxicity to increase levels significantly of ALT and bilirubin and produce more change in the structure of hepatocytes.

In group III with dose of 10mg/kg total flavonoids of leaves *Cordia lutea* Lam. shown levels serum elevated of ALT, BT, BD and BI, relative to their respective baseline values ($p < 0.05$) corresponding to histopathological alterations. While the IV group with dose of 20mg/kg of total flavonoids serum ALT, BT, BD and BI is similar to their respective baseline values ($p > 0.05$).

It is concluded that the total flavonoids of leaves *Cordia lutea* Lam. have hepatoprotective effect and prevent the hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride in *Rattus norvegicus* var. *albinus* dose of 20mg / kg bw

Keywords: *Cordia lutea* Lam, flavonoids, carbon tetrachloride, hepatotoxicity, liver, *Rattus norvegicus* var. *albinus*.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

I. INTRODUCCIÓN

Según el análisis de la situación de salud del 2013 en nuestro país, las enfermedades hepáticas, como la cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado, es la segunda causa de muerte entre las defunciones registradas para el grupo etario de 20 a 65 años. En La Libertad fueron la octava causa de muerte en el 2006, con un 4.2% del total de las causas de mortalidad ^{1,2}.

Los hepatocitos desempeñan numerosas y vitales funciones para mantener la homeostasia y la salud, estas funciones son la síntesis de muchas de las proteínas séricas, la producción de bilis y sus transportadores, la regulación de los nutrientes y el metabolismo y conjugación de los compuestos lipófilos (bilirrubina, cationes, fármacos) para excretarlos por la bilis o la orina. Aunque existen muchas causas de enfermedad hepática, se presentan agrupadas sólo en unos cuantos patrones, que por lo común se clasifican como hepatocelulares, colestáticos (obstructivos) o mixtos.) ^{3, 4}.

El hepatocito, es la unidad funcional del hígado, son células poligonales, de unos 20 a 30 μm de diámetro, que se agrupan entre sí para formar placas anastomosantes de una a dos células de grosor. Estas células muestran variaciones en sus propiedades estructurales, histoquímicas y bioquímicas, según su localización dentro de los lobulillos hepáticos, por lo tanto, cualquier sustancia tóxica que afecte al hígado estará destruyendo o dañando hepatocitos, cuyo daño estructural o funcional se denomina hepatotoxicidad ^{3, 4, 5, 7, 8,9}.

Son varios los factores que predisponen al hígado a sufrir toxicidad, entre ellos destacamos tres, cuya combinación expone al hígado a la toxicidad: recibe una gran cantidad de sangre que puede ser portadora de tóxicos, sobre todo la vena porta que transporta los xenobióticos absorbidos en el tracto gastrointestinal; la elevada capacidad de biotransformación y diversas concentraciones de oxígeno hacen que tengan lugar tanto reacciones de reducción como de oxidación de diversos xenobióticos que pueden inducir metabolitos activos que ocasionen lesiones en el hígado; y la función excretora que hace que se concentren xenobióticos ^{9,10,11}.

Las áreas del daño se manifiestan a menudo en la región centrolobulillar, y esta localización se ha atribuido, principalmente por la presencia de alta concentración del citocromo P450 en esa área del hígado ^{10,11}.

La hepatotoxicidad implica daño funcional o anatómico del hígado inducido por ingestión de compuestos químicos u orgánicos que se conocen como hepatotoxinas. Muchos elementos químicos causan daño subclínico, es decir, que no se manifiesta con alguna sintomatología y que se presentan sólo con resultados anormales de las enzimas hepáticas ^{10,11}.

Existe una gran variedad de sustancias químicas que producen daño celular hepático, tales como CCl₄, furosemida, paracetamol, entre otros ^{10, 12,13}.

El tetracloruro de carbono (CCl₄) es utilizado frecuentemente para realizar un modelo de hepatotoxicidad, ya que, el mecanismo de la necrosis hepática inducida

por tetracloruro de carbono (CCl_4) ha sido objeto de investigación extensa y, es quizás el hepatotóxico mejor estudiado y conocido entre aquellos xenobióticos que se sabe causan daño hepático. El CCl_4 pertenece al grupo de hidrocarburos halogenados, es poco soluble en agua y, se usa como disolvente, difunde fácilmente a través de las membranas plasmáticas. Su absorción lenta en el tracto gastrointestinal se ve favorecida por la presencia de aceites y grasas de origen animal o vegetal, esto se debe a que las sustancias no polares que se disuelven en lípidos difunden con mayor rapidez, ya que, la membrana celular que es permeable, se encuentra constituida principalmente por fosfolípidos, y cuya permeabilidad está determinada por las características fisicoquímicas de las sustancias ^{10,12, 14,15}.

El efecto hepatotóxico de tetracloruro de carbono está mediado por la formación de radicales libres. El hígado es uno de los órganos más afectados por reacciones de oxidación debido a la importancia que tiene el metabolismo en el origen de estos radicales libres ^{12, 14,16, 17}.

El mecanismo de acción del CCl_4 es complejo y para el inicio de su toxicidad se requiere su metabolización en el hígado y está relacionada al estrés oxidativo por la formación de radicales libres. Además, se indica que por sí mismo no sería tóxico, pero que en el retículo endoplásmico liso entraría a la cadena enzimática microsomal ¹⁷.

Presumiblemente el CCl_4 se compleja con el citocromo P-450, y el complejo es deshalogenado y reducido por el Cit-P-450 reductasa y NADPH. Dado lo

anterior, la necrosis inducida por CCl_4 es más severa en las células centrolobulillares del hígado quienes contienen la más alta concentración de la isoenzima P450, la cual es la responsable de la activación del CCl_4 ^{10, 15, 17}.

Hoy se sabe que, en condiciones de baja presión parcial de oxígeno (pO_2), el CCl_4 experimenta una biorreducción catalizada por CYP2E1 a radical triclorometilo ($\text{CCl}_3\cdot$), el cual abstrae un átomo de hidrógeno a un ácido graso de la membrana celular, iniciando una reacción en cadena de lipoperoxidación. Pero cuando la presión de oxígeno es alta, se forma el radical triclorometil peroxilo ($\text{CCl}_3\text{COO}\cdot$) que, en una reacción suicida, inactiva al CYP2E, terminando el efecto. Los procesos tóxicos por mecanismos radicalarios requieren un tiempo para su desarrollo y la aparición de sus efectos; sin embargo, en CCl_4 el plazo es corto¹⁷.

En las reacciones hepatotóxicas por CCl_4 se distinguen dos fases: en la fase temprana o precoz, antes de la primera hora tras la exposición, tiene lugar la aparición de los metabolitos reactivos (triclorometilo y triclorometil peroxilo, seguido de la peroxidación de lípidos y las uniones covalentes a los receptores nucleofílicos. Después de la sexta hora, se aprecian los fenómenos consecuentes a acumulación intracelular de calcio. Cuando estos radicales libres se unen covalentemente a grupos tioles que forman parte del glutatión (GSH), la concentración citosólica de calcio se incrementa y se inicia una cascada de activación de proteasas, endonucleasas y lipasas con deterioro de la célula, produciéndose la liberación de enzimas intracelulares como la ALT que es un marcado bioquímico de lesión hepática¹⁷.

El radical triclorometilo inicia la rápida peroxidación de lípidos de membrana, lo que provoca una reducción de la fluidez de la membrana, la cual es esencial para preservar la función celular (transducción de señal, secreción y endocitosis). Se rompen las membranas del retículo endoplásmico, se liberan los ribosomas, se acumulan triglicéridos al no existir síntesis de las apoproteínas necesarias para su salida del hígado produciéndose esteatosis. Por otro lado, la peroxidación de lípidos que afecta a la membrana plasmática se traduce en trastornos en el transporte de iones, ingreso masivo de agua, sodio y calcio ^{10,15,18}.

De manera que dependiendo de la magnitud y tiempo de la acción del tóxico las consecuencias fisiopatológicas difieren, pudiendo encontrarse esteatosis o necrosis masiva ^{10,15, 16, 17}.

Para evaluar el daño hepático producido por el CCl₄ existen indicadores bioquímicos, entre los cuales son de gran importancia la enzima alanina aminotransferasa (ALT) y Bilirrubinas: total (BT), directa (BD) e indirecta (BI). ALT tiene acción eminentemente intracelular, por lo que la actividad sérica en condiciones normales es baja o nula. En hepatitis y otras formas de enfermedad hepática que involucran necrosis de tejido, habrá un incremento considerable de la actividad sérica de ALT ^{18, 19, 20, 21, 22}.

La bilirrubina como producto de desecho insoluble, es captado por el hígado para su conjugación y excreción en la bilis. Por tal motivo, las alteraciones hepatocelulares u obstrucciones biliares pueden incidir en el metabolismo de

bilirrubina, provocando ictericia, esto implica hiperbilirrubinemias, a expensas de la fracción conjugada (o directa) o no conjugada (o indirecta) ^{19, 20, 23}.

Es de suma importancia proteger al hígado de los efectos nocivos de hepatotoxinas que el hombre puede ingerir o exponerse, los agentes que son capaces de contrarrestar las alteraciones en los mecanismos de defensa antirradicalarias son llamados hepatoprotectores ^{14, 19, 20}.

Si se recurre al uso de plantas medicinales, como alternativa terapéutica, se encuentra a especies vegetales que poseen metabolitos secundarios como los flavonoides, los cuales tienen lugar sobresaliente en nuestros tiempos, por sus reconocidas propiedades antioxidantes y su uso como hepatoprotectores. Numerosos extractos vegetales y formulaciones farmacocinéticas que contienen flavonoides se encuentran hoy en día en el mercado. Existen estudios que confirman el efecto hepatoprotector de flavonoides frente al daño causado por CCl₄ ^{14, 24, 25, 26, 27}.

Cordia lutea Lam. es una planta indígena del Perú, se dispersa bastante por niveles bajos y medios del sur, centro y norte del país. Se encuentra en zonas secas y muy secas hasta los 1 500 m.s.n.m. pero se adapta bien a lugares húmedos. Según el Sistema de Clasificación Filogenética de Adolph Engler pertenece al Phylum Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, orden Lamiales y familia Boraginaceae ^{12, 13, 19, 28, 29}.

Cordia lutea Lam., es utilizada por presentar importantes principios activos para combatir enfermedades hepáticas. Las hojas son usadas como antitusígeno, antiasmático, cicatrizante, contra ictericia, espasmos estomacales y cálculos biliares; la infusión de ésta tiene efecto gastrohepatoprotector, sirven además como hemostáticos y expectorantes ^{19, 28, 29}.

Cruzado R. (1993) en su trabajo de investigación intitulado Estudio Fitoquímico de la Flor de *Cordia lutea* “overo”, llega a la conclusión que esta droga contiene flavonoides entre otros metabolitos secundarios y en el trabajo de investigación de nuestra autoría se concluye que el extracto etanólico de hojas de *Cordia lutea* Lam. procedentes del distrito de Laredo, provincia de Trujillo, región La Libertad presenta 0,1332 mg/mL de flavonoides totales expresados como quercetina^{29, 30}.

Cruzado R y Guzmán T. (1993) en su trabajo de investigación intitulado Efecto de la flor de *Cordia lutea* “overo” en Intoxicación Hepática Crónica Experimental con Tetracloruro de Carbono en *Oryctolagus cuniculus*: Variaciones séricas de GTP y Bilirrubina, concluye que la infusión de flor de *Cordia lutea* “overo” tiene efecto hepatoprotector en la intoxicación hepática crónica experimental con CCl₄ en *Oryctolagus cuniculus* ¹⁹.

Además de otros autores, que en sus trabajos de investigación confirman el efecto hepatoprotector de los flavonoides ^{12, 14, 20}.

Los flavonoides constituyen un grupo extenso de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos y comunes en todo el reino vegetal, particularmente en las partes aéreas. Se pueden presentar tanto libres como en forma de glucósidos (O- y C-glicósidos). Estos últimos se localizan comúnmente dentro de las estructuras celulares de hojas, flores y tallos ^{25, 26, 27,31}.

El promedio diario de la dieta en los países occidentales fluctúa entre 20mg a 1g de mezcla de flavonoides. Algunos aspectos relevantes de la farmacocinética de los flavonoides es que, antes de ser absorbido un flavonoide es escindido, dando por resultado, por una parte, su aglicona y por otro su glicósido; teniendo este último mayor solubilidad en agua se absorbe rápidamente, sin embargo la aglicona puede tardar hasta tres horas en ser absorbida. Por lo que en promedio las concentraciones pico de los flavonoides se da a las 1,75 horas ^{27,32}.

Sus efectos farmacológicos en los mamíferos son el resultado de sus propiedades de inhibición de ciertas enzimas y su actividad antioxidante ³².

Los flavonoides poseen un importante efecto antioxidante debido principalmente a sus propiedades redox y a sus grupos químicos tal como los hidroxilos que pueden atrapar radicales libres, quelar iones metálicos, apagar singuletes y tripletes de oxígeno o descomponer peróxidos y estos metabolitos están presentes en esta planta ^{24, 25, 26, 27}.

Los flavonoides inhiben la actividad catalítica de una serie de enzimas, tales como la ciclooxigenasa, lipooxigenasa, NADPH oxidasa y xantina oxidasa ^{32, 33,34}.

La actividad antioxidante también se justifica porque inhibe oxidasas que liberan anión superóxido y peróxido de hidrógeno. Puede darse inhibición directa por inhibición competitiva o indirecta, porque en los granulocitos previenen la activación de NADPH oxidasa al interferir con proteína quinasas implicadas en la cascada de inhibición ^{32,33, 35}.

Los flavonoides tienen capacidad para atrapar radicales libres (RL), reaccionar con especies reactivas de oxígeno y formar complejos con el hierro. También la regeneración de α -tocoferol mediante reducción del radical α -tocoferoxil puede contribuir a su actividad antioxidante. Los flavonoides atrapan RL tales como: $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$, $\text{LOO}\cdot$ y $\text{NO}\cdot$, etc. En esta reacción atrapadora, el flavonoide cede un átomo de hidrógeno al radical agresor:



El $\text{Flavonoide} - \text{O}\cdot$ radical formado es más estable que el radical $\cdot\text{R}$ que lo genera ³².

Existen trabajos de investigación que resaltan el efecto hepatoprotector de flavonoides totales (FTs) sobre modelos de intoxicación hepática inducida por tetracloruro de carbono, pero son otro de otra familia al vegetal.

Entre ellos, el estudio realizado por Zhang S et al demostró que los FTs impidieron significativamente la hepatotoxicidad inducida por CCl_4 , posiblemente por atrapar radicales libres, mejorar el sistema antioxidante endógeno y el bloqueo de la activación de CCl_4 mediada por CYP2E1. Además los FTs inhiben la respuesta inflamatoria al disminuir las citoquinas pro-inflamatorias al disminuir la expresión de NF- κ B.

La investigación adicional para explicar los efectos protectores de TFS en la lesión hepática inducida por CCl₄-es significativo y proporcionará más explotación de los efectos protectores ³⁶.

Tong J et al y Zhao P et al concluyeron que los FTs exhiben capacidad antioxidante significativa *in vitro* mediante la inhibición de lipoperoxidación y aumentando la capacidad antioxidante del hígado ^{37, 38}.

Yuan L et al en su estudio concluye que el mecanismo de FTs en lesión hepática puede estar relacionada con su acción antioxidante, actividad captadora de radicales libres y la inhibición de la activación de NF- κ B. Además, Yan J et al, en su investigación concluye que los flavonoides totales regulan la expresión de ARNm de genes de transportadores de la bilis, incluyendo BSEP, Mrp2 y NTCP, esto podría consistir en aclarar los mecanismos de protección sobre la colestasis ^{39, 40}.

Debido al frecuente uso que hace la población de la medicina tradicional y a los escasos estudios con base científica acerca de la planta medicinal en estudio creemos de suma importancia la realización del presente trabajo.

A pesar del uso de *Cordia lutea* Lam. en la medicina popular, hasta el momento no se registra información que justifique el uso de sus hojas como fuente de flavonoides, ni mucho menos que resalten los efectos como hepatoprotector de ésta droga y teniendo en cuenta la necesidad de prevenir o proteger al hígado, el presente estudio tiene por finalidad determinar con el rigor científico el efecto

hepatoprotector de los flavonoides totales de las hojas de *Cordia lutea* Lam. (overo) en *Rattus norvegicus* var. *albinus* en el modelo de daño hepático inducido por el CCl₄.

Por tal motivo se planteó el siguiente problema: ¿Cuál es el efecto de los flavonoides totales de las hojas de *Cordia lutea* Lam. sobre hepatotoxicidad inducida por Tetracloruro de carbono en *Rattus norvegicus* var. *albinus*?

Como hipótesis para el presente estudio se planteó la siguiente: Los flavonoides totales de las hojas de *Cordia lutea* Lam. Es posible que tengan un efecto protector en la hepatotoxicidad inducida por Tetracloruro de carbono en *Rattus norvegicus* var. *albinus*.

II. MATERIAL Y MÉTODO

1. Materiales

1.1. Material biológico.

10 Kg de Hojas de *Cordia lutea* Lam. procedentes del distrito de Laredo, provincia de Trujillo, región La Libertad.

32 *Rattus norvegicus* var. *albinus* de la cepa Holtzman, adultos machos, aparentemente sanos procedentes del Bioterio de la Universidad Nacional Agraria La Molina, con pesos comprendidos entre 300 g y 400 g, con edad de 5 meses.

1.2. Material de laboratorio

a) Material de vidrio.

Material de vidrio de uso común en el laboratorio.

b) Equipos.

Balanza analítica Sartorius BP301S

Baño María DIN128-K1

Bomba de vacío General Electric 5KH33DM68

Cocina Eléctrica

Estufa Memmert UM-300

Refrigerador Coldex

c) Material químico

Ácido sulfúrico q.p.

Tetracloruro de carbono q.p.

2. Método

2.1. Recolección de la muestra ^{29,41}

Las hojas de *Cordia lutea* Lam. se recolectaron en el distrito de Laredo, en la provincia de Trujillo, la región La Libertad, ubicada a 129 m.s.n.m., situado dentro de las coordenadas 8° 00' 30" a 8° 08' 30" de la latitud Sur y entre 80° 50' 00" a 79° 15' 00" de latitud Oeste, en el mes de Setiembre. La recolección de la especie se realizó por el método convencional o clásico de herborización.

2.2. Identificación y determinación taxonómica de la especie ^{29,41}

Un ejemplar completo de la planta se llevó al *Herbarium Truxillensis* (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo para su identificación taxonómica.

2.3. Selección de la muestra ^{29,41}

El material recolectado se transportó al Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, en donde se seleccionó la muestra en buen estado y se eliminó las sustancias extrañas presentes en el material vegetal.

2.4. Lavado de la droga^{29,41}

Se procedió a lavar el material vegetal con agua potable a chorro y después con agua destilada.

2.5. Secado^{29,41}

Para evitar cualquier tipo de alteración que pudiera afectar a la composición de la planta, la droga se secó convencionalmente. Las hojas se colocaron sobre papel kraft en un lugar fresco y seco durante 48 horas. Luego se colocó en bolsas hechas de papel kraft y se llevó a estufa a una temperatura de 40° C, durante 24 horas.

2.6. Pulverización^{29,41}

Luego de obtener la droga estabilizada y secada, se trituro con la ayuda de un mortero, hasta obtener un polvo.

2.7. Tamizaje^{29,41}

El material obtenido de la pulverización, se pasó a través de juego de tamices N° 2; 1,2; 0,7 y 0,3. El polvo que se utilizó es del tamiz N° 0.7.

2.8. Almacenamiento^{29,41}

El polvo de hojas obtenido, se almacenó en frascos de vidrio de color ámbar de boca ancha.

2.9. Obtención de flavonoides totales^{29,41}.

Se reflujo 5g de polvo de hojas de *Cordia lutea* Lam. con 200 mL de ácido sulfúrico al 10% v/v y 200 mL de etanol al 50% v/v por 2 horas, se enfrió y se filtró al vacío lavándose el residuo con 60 mL de etanol al 50% v/v; se juntó ambos filtrados y se evaporó en baño maría hasta la mitad del volumen inicial, se enfrió en la nevera durante 60 minutos y luego se filtró al vacío, lavando el precipitado con 250 mL de agua destilada fría (10-15°C) en porciones de 10mL. Se eliminó el filtrado y los lavados, y el filtro se secó en estufa a temperatura de 40°C durante 12 horas, luego se disolvió el residuo del filtro en 150 mL de etanol de 50%v/v calentado previamente, y se almacenó en frascos de color ámbar para su posterior utilización.

El procedimiento se repitió hasta obtener la cantidad suficiente de flavonoides totales para el tratamiento por 15 días.

2.10. Cuantificación de Flavonoide Totales^{29,41}

Se realizó la cuantificación de flavonoides total mediante el método espectrofotométrico y se obtuvo la concentración en mg/mL de flavonoides totales expresados como quercetina.

Procedimiento:

Se midió 1 mL del extracto y se aforó a 25 mL con etanol al 50%v/v, seguidamente se vertió una alícuota a la celda y se llevó a realizar la lectura de la absorbancia a 258 nm por triplicado.

Como estándar se empleó 0,04 g de Quercetina, se disolvió con etanol de 96° G.L. y se aforó a 50mL; se midió 1mL de esta solución y se aforó a 100mL con etanol al 50% v/v, luego se vertió una alícuota a la celda y se realizó la lectura de la absorbancia a 258nm por triplicado.

Como blanco se utilizó etanol al 50% v/v.

El contenido de flavonoides se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$X = \frac{A_m \times C_{ST} \times FD \times PST}{A_R}$$

Donde:

X: contenido de flavonoides totales expresados como Quercetina (mg/mL).

A_m: Absorbancia de la solución muestra.

C_{ST}: Concentración del estándar de lectura (mg/mL).

A_R: Absorbancia de la solución de referencia.

PST: Potencia del estándar.

FD: Factor de dilución

2.11. Diseño Experimental

Se trabajó con 32 especímenes *Rattus norvegicus* var. *albinus*, aleatoriamente distribuidos en 4 grupos de 8 animales cada uno, como se detalla a continuación:

GRUPO I: Grupo blanco, conformado por 8 *Rattus norvegicus* var. *albinus* a los que se administró 3 mL de solución NaCl 0.9% vía oral ¹⁹.

GRUPO II: Grupo control, conformado por 8 *Rattus norvegicus* var. *albinus* a los que se administró la dosis de 0.1 mL vía oral de una solución de CCl₄ al 10% en aceite de oliva, durante 15 días ^{19, 42, 43}.

GRUPO III: Grupo Problema I, conformado por 8 *Rattus norvegicus* var. *albinus* a los se administró vía oral 10 mg/Kg p.c de flavonoides totales de hojas de *Cordia lutea* Lam y luego de 2 horas se administró vía oral 0.1 mL de una solución de CCl₄ al 10% en aceite de oliva, durante 15 días ^{31,39}.

GRUPO IV: Grupo Problema II, conformado por 8 *Rattus norvegicus* var. *albinus* a los que administró vía oral 20 mg/Kg p.c de flavonoides totales de hojas de *Cordia lutea* Lam. y luego de 2 horas se administró vía oral 0.1 mL de una solución de CCl₄ al 10% en aceite de oliva, durante 15 días ^{31,39}.

La administración de cada una de las sustancias fue una vez al día y en ayunas, usando una sonda nasogástrica N° 4 diferente para cada

sustancia. Posteriormente a la administración se proporcionó alimento a base de maíz y agua *ad libitum*.

Los flavonoides totales calculados para cada dosis fueron suspendidas en solución de NaCl 0.9% para su administración.

2.12. Determinación de Perfil hepático ^{36, 38, 39}.

Se realizó una prueba basal y post- estímulo a cada espécimen, tomando muestras de sangre por punción cardiaca eco guiada. Se recolectó aproximadamente 1.0 mL de sangre en tubos de ensayo no heparinizados y se procedió a la determinación de los exámenes de perfil hepático que incluye Alanina aminotransferasa (ALT), bilirrubina directa, indirecta y total. (Siglas. BD, BI y BT respectivamente).

La extracción de sangre por punción cardiaca ecoguiada y la determinación del perfil hepático se realizó en el laboratorio de Análisis Clínico e Imagenología Veterinaria Dx Vet de la ciudad de Trujillo.

2.13. Estudio histopatológico por microscopía óptica ^{36, 38, 39}.

Se realizó cortes longitudinales y transversales de tejido hepático, la tinción de los cortes de tejido fueron realizadas con hematoxilina-eosina. Se determinó si existe infiltrado inflamatorio, tumefacción celular, hepatitis reactiva, esteatosis y necrosis hepática. Se anotó con cruces según grado de afectación: leve, moderado o agudo.

El estudio histopatológico fue realizado por un médico patólogo del Departamento de Patología del Hospital Regional Docente de Trujillo.

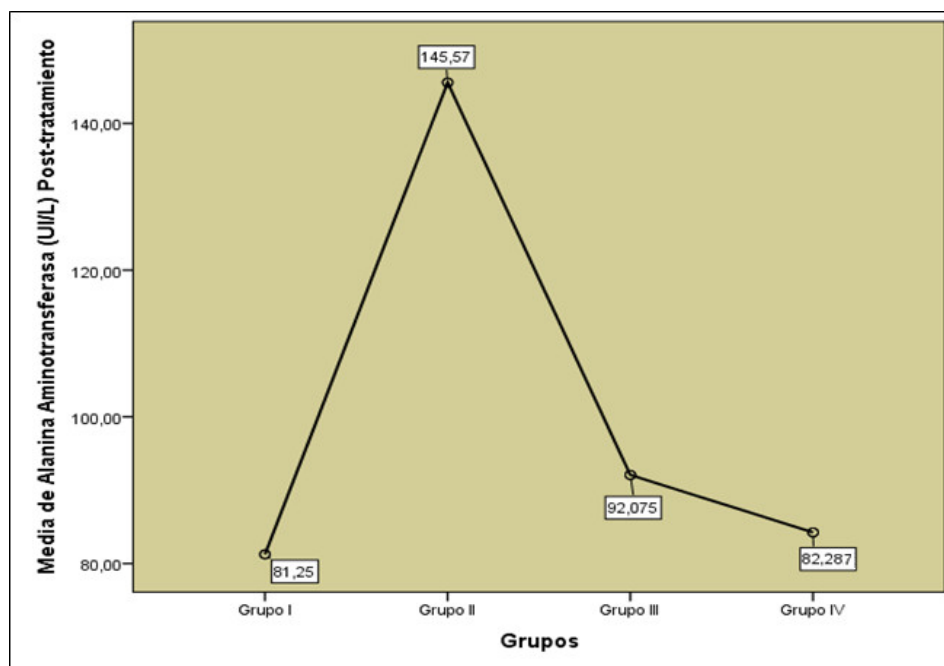
2.14. Análisis estadístico de los resultados.

Los resultados obtenidos se procesaron empleando el programa SPSS, versión 19.0, reportándose tablas estadísticas resumen para cada grupo: media aritmética y desviación estándar. Para comparar las variables basales y post-estímulo de ALT, BT, BD y BI en cada grupo de trabajo se utilizó la Prueba de t de Student para medias de dos muestras emparejadas. Para evaluar la diferencia entre los grupos de cada variable post-estímulo se utilizó ANOVA. Para analizar cuál de los grupos en cada variable tuvo mayor efecto se aplicó la prueba de HSD de Tukey. Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0,05$.

III. RESULTADOS

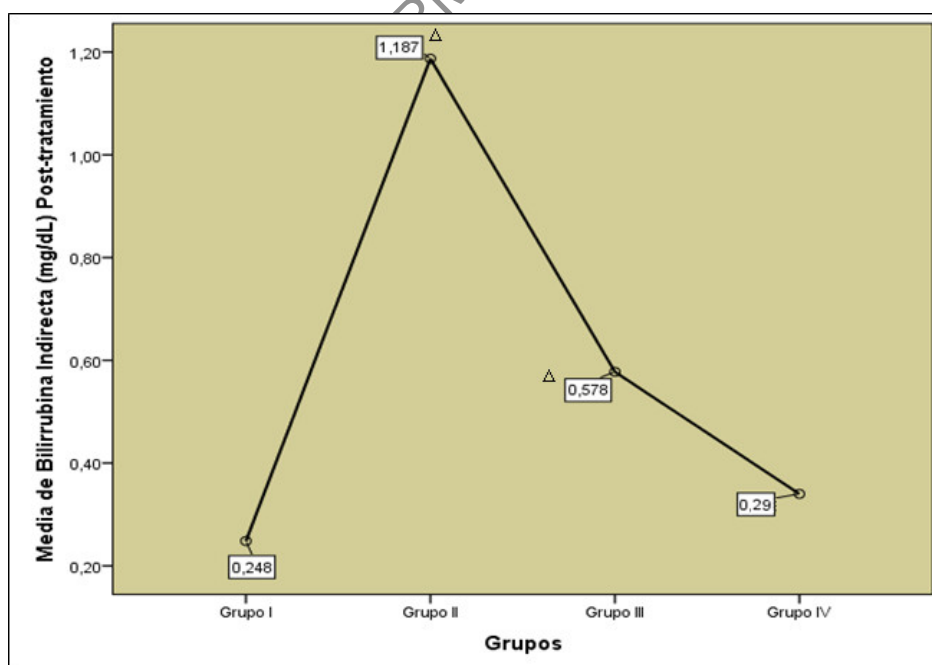
Tabla 01: Promedio de las concentraciones basales y post-estímulo (15 días) de ALT y Bilirrubinas (BI, BD, BT) en *Rattus norvergicus* var. *albinus* de los grupos blanco, control, Problema I y Problema II.

		BASAL				POST-ESTÍMULO (a los 15 días)			
GRUPOS		ALT (UI/L)	BI (mg/dL)	BD (mg/dL)	BT (mg/dL)	ALT (mg/dL)	BI (mg/dL)	BD (mg/dL)	BT (mg/dL)
I	Blanco	81.17±1.69	0.23±0.08	0.06±0.02	0.29±0.10	81.25±1.52	0.25±0.07	0.07±0.02	0.32±0.09
II	Control	79.67±3.25	0.26±0.05	0.07±0.01	0.33±0.06	145.57±21.92 ^{*,Δ}	1.19±0.26 ^{*,Δ}	0.32±0.07 ^{*,Δ}	1.51±0.33 ^{*,Δ}
III	Problema I	79.61±3.06	0.24±0.04	0.07±0.01	0.31±0.05	92.08±3.72 ^{*,Δ}	0.58±0.07 ^{*,Δ}	0.16±0.07 ^{*,Δ}	0.73±0.09 ^{*,Δ}
IV	Problema II	79.34±3.23	0.24±0.05	0.07±0.01	0.30±0.06	82.29±1.97	0.29±0.05	0.08±0.01	0.37±0.07
Los valores corresponden al promedio ± desviación estándar de cada grupo.									
* p<0.05 entre el basal y post-estímulo para las 4 variables (ALT, BI, BD y BT) en el grupo respectivo (t de student)									
Δ p<0.05 entre los grupos Control y Problema I con respecto al Blanco en el post-estímulo para las 4 variables (ALT, BI, BD y BT) (ANOVA y HSD Tuckey)									



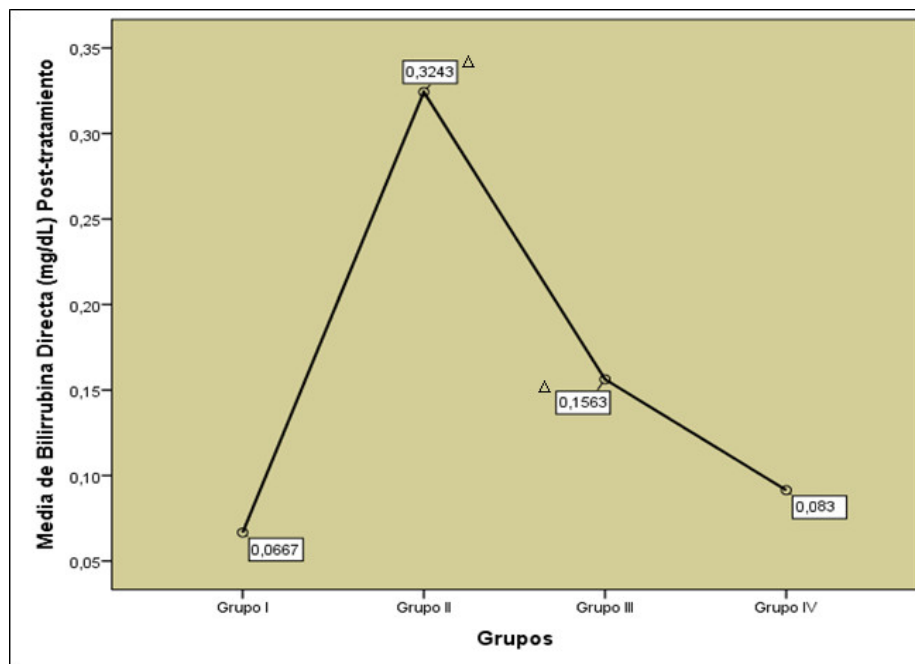
$\Delta p < 0,05$ entre los grupos I y II con respecto al Grupo I en el Post-estímulo para las 4 variables (ALT, BI, BD y BT) (ANOVA y HSD Tuckey)

Figura 01. Comparación de las medias de los niveles de Alanina Aminotransferasa Post-estímulo entre los grupos I, II, III y IV.



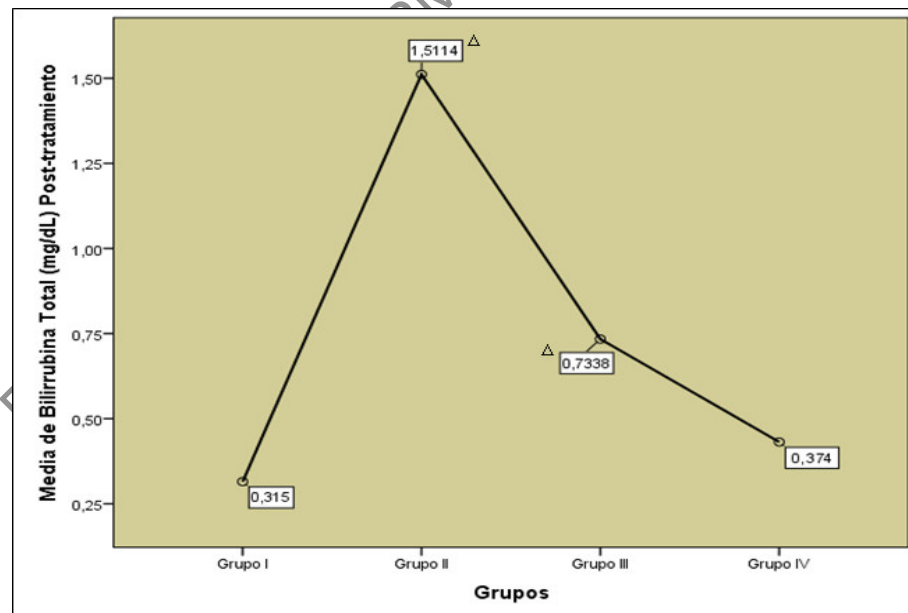
$\Delta p < 0,05$ entre los grupos I y II con respecto al Grupo I en el Post-estímulo para las 4 variables (ALT, BI, BD y BT) (ANOVA y HSD Tuckey)

Figura 02. Comparación de las medias de los niveles de Bilirrubina Indirecta Post-estímulo entre los grupos I, II, III y IV.



$\Delta p < 0.05$ entre los grupos I y II con respecto al Grupo I en el Post-estímulo para las 4 variables (ALT, BI, BD y BT) (ANOVA y HSD Tuckey)

Figura 03. Comparación de las medias de los niveles de Bilirrubina Directa Post-estímulo entre los grupos I, II, III y IV.



$\Delta p < 0.05$ entre los grupos II y III con respecto al Grupo I en el Post-estímulo para las 4 variables (ALT, BI, BD y BT) (ANOVA y HSD Tuckey)

Figura 04. Comparación de las medias de los niveles de Bilirrubina Total Post-estímulo entre los grupos I, II, III y IV

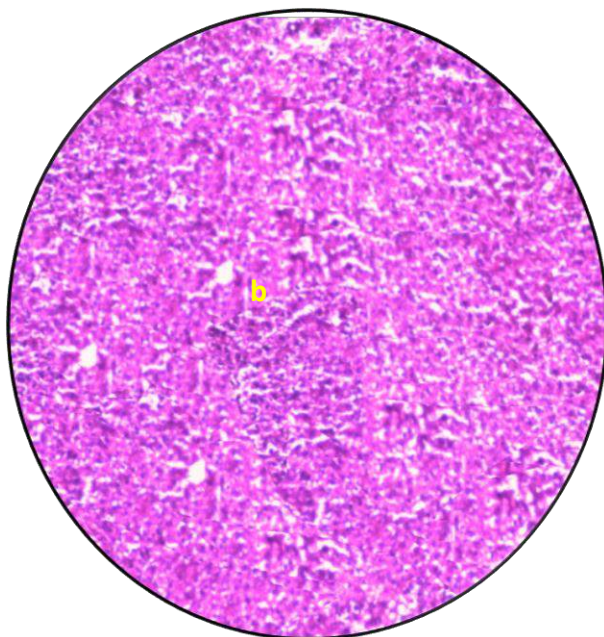


Figura 05. Grupo I (Blanco)

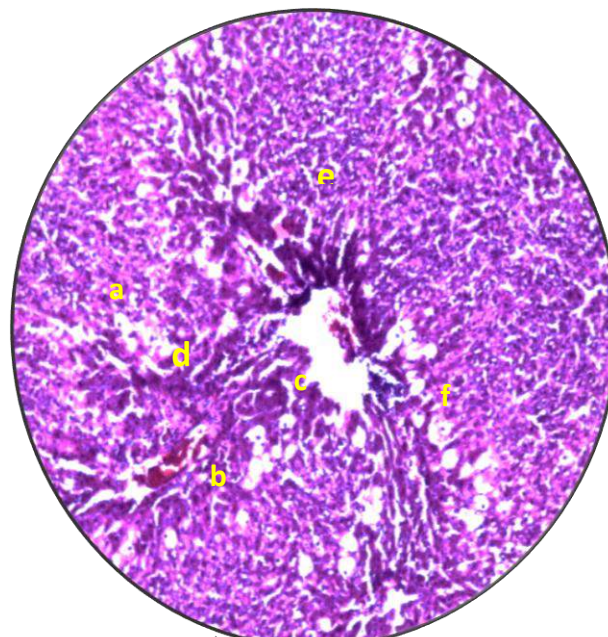


Figura 06. Grupo II (Control): CCl₄

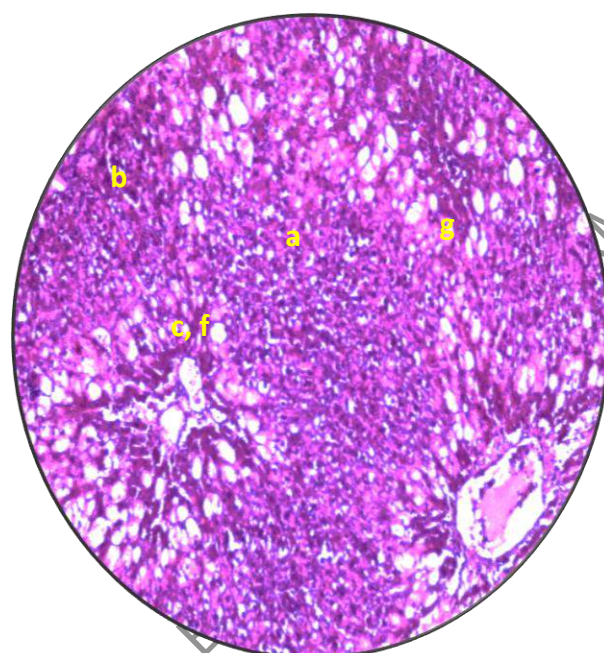


Figura 07. Grupo III (Problema I): 10mg/Kg p.c. v.o. flavonoides totales + CCl₄

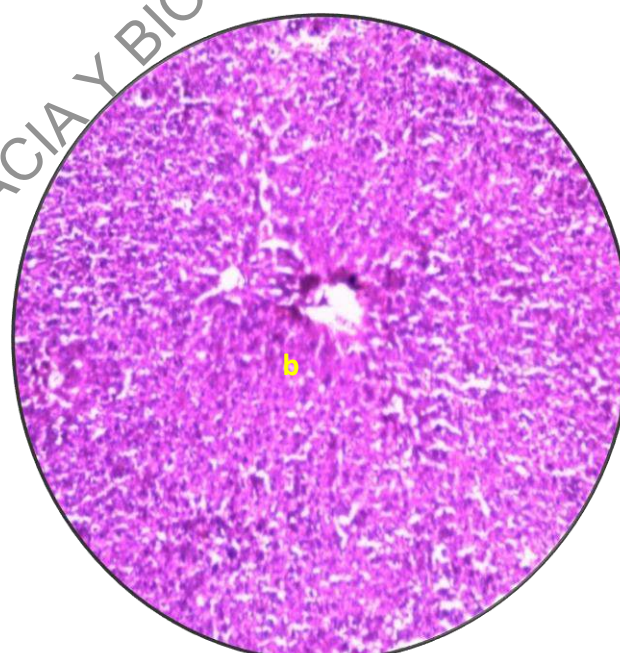


Figura 08. Grupo III (Problema II): 20mg/Kg p.c. v.o. flavonoides totales + CCl₄

Cortes histológicos del hígado de *Rattus norvegicus* var. *albinus* del grupo blanco, control, Problema I y Problema II. Tinción Hematoxilina-Eosina. 40X.

a. Congestión hepática multifocal, **b.** Infiltrado linfocítico focal, **c.** Infiltración vacuolar, **d.** Hepatitis reactiva crónica inflamatoria, **e.** Necrosis hepática moderada multifocal **f.** Esteatosis hepática, **g.** Necrosis hepática leve multifocal.

Tabla 02. Evaluación microscópica de los hígados de *Rattus norvegicus* var. *albinus* de los grupos Blanco, control, Problema I y Problema II según parámetros histopatológicos y grado de afectación.

GRUPOS EXPERIMENTALES				
Parámetros	Blanco	Control	Problema I	Problema II
Congestión hepática multifocal	–	+++	++	+
Infiltración vacuolar	–	+++	++	–
Esteatosis hepática	–	+++	++	–
Necrosis multifocal	–	++	+	–

Dónde: (-): negativo, (+): Leve, (++) : Moderado, (+++) : Severo

IV. DISCUSIÓN

Estudios epidemiológicos indican que las enfermedades hepáticas siguen siendo un importante problema de salud en todo el mundo. A pesar de los nuevos avances en hepatología, la medicina moderna carece de un medicamento hepatoprotector fiable con pocos efectos secundarios. Además, el daño hepático es uno de los principales efectos secundarios de muchos candidatos potenciales, dando lugar a numerosos fracasos de nuevos fármacos ^{1, 31, 33, 34}.

Actualmente, los tratamientos en las enfermedades hepáticas tienen como alternativa otras posibilidades como los productos naturales a base de plantas medicinales o metabolitos secundarios aislados entre los cuales se encuentran los flavonoides, a los que se les atribuye actividad hepatoprotectora ^{12, 14, 15, 19,20}.

En el presente trabajo de investigación se determinó el efecto hepatoprotector de los flavonoides totales de hojas de *Cordia lutea* Lam. sobre hepatotoxicidad inducida por Tetracloruro de carbono en *Rattus norvegicus* var. *albinus* mediante la valoración de niveles séricos de la transaminasa ALT y bilirrubinas (BT, BL y BI); y el estudio histopatológico por microscopía óptica.

La intoxicación hepática inducida por CCl₄ se convierte en el modelo fundamental para estudiar antioxidantes naturales. El CCl₄ provoca toxicidad aguda y crónica del hígado, lo que resulta en esteatosis, necrosis celular, fibrosis y cirrosis ³⁷.

La toxicidad hepática inducida por tetracloruro de carbono se evidencia en la alteración de marcadores bioquímicos específicos de lesión celular hepática como es la transaminasa ALT, y de daño biliar-colestásico: las bilirrubinas ^{14, 15, 19,20}.

En la tabla 01, en el grupo control, la elevación de los valores de ALT y bilirrubinas son evidentes y significativas ($p < 0,05$), cuyos valores se maximizan más del 200% a los 15 días post-estímulo con respecto a sus valores basales. Estos resultados son concordantes a los de otros autores que realizaron experiencias similares ^{31, 33, 35, 36, 37, 38, 39}.

Está bien establecido que la escisión del enlace carbono-cloruro del CCl_4 por el citocromo P450, conduce al estrés oxidativo mediado por la formación de triclorometilo y triclorometil peroxilo, radicales libres, que incrementan las reacciones de lipoperoxidación celular y saturación de ácidos grasos insaturados quedando alterada la estructura y permeabilidad de las membranas. En este caso, la ALT, que en condiciones normales se encuentra en el citoplasma de los hepatocitos intactos en concentraciones mucho más elevadas que en la sangre circulante, al producirse la injuria por el agente tóxico, esta enzima es liberada hacia el torrente circulatorio, observándose un fenómeno similar al de esta experiencia ^{19, 20, 21, 36, 34, 38}.

La elevación de los niveles séricos de ALT está dentro de las primeras anormalidades bioquímicas posteriores a la lesión o muerte de los hepatocitos ^{9, 19, 20, 21}.

Además, diversos autores señalan, que el estrés oxidativo se maximiza por la acción de oxidasas que liberan anión superóxido y peróxido de hidrogeno, y cuando se depletan los sistemas antioxidantes (SOD, GSH) ³².

La elevación de niveles séricos de BD, se debe a la inflamación producida por CCl_4 , como consecuencia las células hepáticas se hinchan y provocan obstrucción parcial o total de los canalículos biliares, el glucorónido de bilirrubina regurgita hacia la

sangre y se eleva predominantemente la BD en el plasma. Además, el aumento sérico de BD se debe a la hidrólisis de la bilirrubina por las b-glucuronidasas hísticas y también a la hemólisis y a las alteraciones de liberación, captación y almacenamiento de la bilirrubina indirecta asociados a la lesión de la célula hepática^{19,20}.

Según Yan J et al y Zhang et al, el proceso inflamatorio es otro mecanismo del CCl₄ y juega un papel central en la colestasis y daño biliar. El estrés oxidativo activa NF-κB que transcribe muchos genes de mediadores inflamatorios, incluyendo aquellos para TNF-α, óxido nítrico sintasa inducible (NOS_i), COX-1 y COX-2. El TNF-α mediante su cascada de señalización celular puede provocar necrosis o apoptosis del parénquima hepático^{36, 39}. Yuan L et demuestra la trans-inhibición de la expresión de genes de transportadores de la bilis, relacionados con el metabolismo de las sales biliares (BSEP, Mrp2 y NTCP)⁴⁰.

El incremento de bilirrubina indirecta (no conjugada) se debe a la existencia de una alteración celular del parénquima hepático, lo que se reflejaría en una disminución hepática originando una mala captación de bilirrubina no conjugada y por consiguiente su acumulación en la sangre^{19,20}.

Como se evidencia, el estrés oxidativo es el principal mecanismo molecular involucrado en la toxicidad por tetracloruro de carbono. En tal sentido, la administración de sustancias con propiedades antioxidantes podría evitar o disminuir el efecto tóxico de la mencionada sustancia química^{33, 35, 39}.

En nuestro estudio se evidencia el efecto hepatoprotector de los flavonoides de hojas de *Cordia lutea* Lam., ya que en la Tabla 01, en el grupo III con una dosis

10mg/Kg se muestran niveles séricos de ALT, BT, BD y BI elevados, con respecto a sus valores basales respectivos ($p < 0.05$) pero más bajos que en el grupo control. Mientras que el grupo IV con una dosis 20mg/Kg de flavonoides totales de hojas de *Cordia lutea* Lam. se muestran niveles séricos de ALT, BT, BD y BI similares a sus valores basales respectivos ($p > 0.05$).

También se presentan las figuras 01, 02, 03 y 04 pertenecientes a la comparación de las medias de los grupos de trabajo en las variables post-estímulo de ALT, BI, BD y BT respectivamente. Se evidencia que el grupo IV (20mg/Kg p.c. de flavonoides totales) alcanza valores similares ($p > 0.05$) al grupo blanco en cada una de las variables.

En nuestro medio no existen trabajos relacionados con el efecto de flavonoides totales de hojas de *Cordia lutea* Lam., pero se ha realizado trabajos valorando el efecto de flavonoides totales de familias vegetales diferentes, en los cuales se ha observado efectos similares sobre el modelo de toxicidad hepática por tetracloruro de carbono. Por ejemplo, diversos estudios concluyen que el pretratamiento de flavonoides totales impidió estas elevaciones en una manera dependiente de la dosis, provocando una disminución significativa de la actividad de estos marcadores bioquímicos séricos en comparación con el grupo control ^{33, 34 36}.

Estos hallazgos, por consenso, se deben posiblemente a los posibles mecanismos que podrían estar relacionados con la lucha contra el daño oxidativo, actividad antiinflamatoria y regulación de la expresión de transportadores hepáticos ^{31, 34, 35, 40}.

Diversos autores, señalan que la capacidad antioxidante se debe a la disminución de oxidasas (NADPH oxidasa) que liberan anión superóxido y peróxido de hidrógeno; al estimular el aumento de enzimas antioxidantes como GST, SOD y catalasa; y a la capacidad de atrapar los radicales libres (RL), de reaccionar con las especies reactivas de oxígeno y de formar complejos con el hierro. Los flavonoides atrapan radicales libres como $CCl_3COO\cdot$, $\cdot OH$, $O_2\cdot^-$, y $NO\cdot$, etc. En esta acción atrapadora, el flavonoide cede un átomo de hidrogeno al radical agresor, lo reduce e inactiva. El flavonoide $-O\cdot$ radical formado es más estable que el radical $\cdot R$ que lo genera. De esta forma los flavonoides interfieren en las reacciones de propagación de RL y en la formación del radical en sí ³².

Se presume que la capacidad hepatoprotectora de los flavonoides totales podría deberse al alivio del estrés oxidativo a través de la prevención y la reducción de la peroxidación lipídica hepática ³⁸.

En ratas con inducción de hepatotoxicidad por CCl_4 , se ha encontrado correlación inversa entre las enzimas antioxidantes y las puntuaciones patológicas y/o de peroxidación lipídica ^{19,20, 37}.

Cheng F et al, afirma que los flavonoides ejercerían potentes efectos en inhibir tanto COX-1 y COX-2 *in vitro*, lo que indica que puede ser un inhibidor no selectivo de la COX ³¹.

Yuan L et al, señala que los flavonoides por su capacidad antioxidante podría modular el efecto de NF-kB, trans-inhibiendo la transcripción de genes de mediadores antiinflamatorios como TNF α , COX-1, COX-2 y NO. Jia L et al afirma que es posible que los flavonoides induzcan el aumento de expresión de

transportadores de bilis: BSEP, Mrp2 y NTCP; esto aún es materia de investigación adicional sobre los mecanismos de la colestasis y daño biliar^{39, 40}.

Además, estas conclusiones serológicas fueron complementados por cambios morfológicos histopatológicos.

El examen histopatológico de las secciones del hígado confirmó que la arquitectura normal del hígado fue dañado con la administración de CCl₄. En el grupo control (Figura 06), (Tabla 02) se observa el daño hepático severo producido, evidenciándose importantes cambios morfológicos como severa congestión hepática multifocal, infiltración vacuolar lipídica, esteatosis hepática, necrosis hepática moderada multifocal.

En la intoxicación por CCl₄ se produce una llamada esteatosis regresiva que ocurre como consecuencia de una lesión celular, principalmente del condrioma, que impide que la célula pueda utilizar las grasas^{31, 33, 36}.

Sin embargo, el pretratamiento con flavonoides totales de hojas de *Cordia lutea* Lam. a dosis de 20 mg/Kg (Grupo IV) redujo significativamente la severidad de la lesión histopatológica (en comparación con el grupo control y dosis de 10mg/Kg). En la tabla 02, se observa moderada congestión hepática multifocal, infiltrado linfocítico focal, e infiltrado vacuolar y necrosis leve multifocal en los hígados del grupo III y leve congestión hepática en el grupo Grupo IV.^{19, 20, 21,23}.

Nuestras observaciones histopatológicas están de acuerdo con los diferentes estudios encontrados, mostrando daño hepático grave inducida por CCl_4 y el efecto protector dosis dependiente.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

V. CONCLUSIONES

1. Los flavonoides totales de hojas de *Cordia lutea* Lam. a dosis de 20mg/Kg p.c en el grupo Problema II presentan un mayor y significativo efecto hepatoprotector que el grupo Problema I a una dosis 10mg/Kg p.c.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ministerio de Salud. Dirección general de epidemiología. Análisis de la situación de salud del Perú. Lima, Perú. 2013. pp.70. [en línea] [fecha de acceso: 18 de Diciembre del 2015]. Disponible en:
<http://www.slideshare.net/consultoriauniversidad/analisis-de-situacion-de-salud-del-peru-ao-2010>.
2. Ministerio de Salud. Principales causas de mortalidad por sexo departamento de La Libertad- año 2006. Perú. [en línea] [fecha de acceso: 18 de Diciembre del 2015]. Disponible en:
<http://www.minsa.gob.pe/estadisticas/estadisticas/Mortalidad/Macros.asp?13>
3. Cauli O, Rodrigo R, Boix J, Piedrafita B, Agusti A, Felipe V. Acute liver failure-induced death of rats is delayed or prevented by blocking NMDA receptors in brain. American journal of Physiology. 2008; 295 (3): G503-G511. [en línea] [fecha de acceso: 22 de Julio del 2015]. Disponible en:
<http://ajpgi.physiology.org/search/liver%252Bfailure?facet.htm>
4. Ghany M, Hoofnagle J. Estudio del paciente con enfermedad hepática. En: Fauci, Braunwald, Kasper, Hauser, Longo y Jameson editores. Harrison Principios d Medicina Interna. 17ta ed. México: McGraw-Hill; 2009. p. 1918.
5. Fortoul T. Histología y biología celular. 2ºed. México: McGraw-Hill; 2012. pp. 242-250
6. Brusco H, López J, Loidi C. Histología. España: ELSEVIER. 2014. pp. 255-260

7. Brusco H, López J, Costa J. Histología médico-práctica. España: ELSEVIER. 2014. pp. 255-258
8. Mills S. Histology for pathologists. 3ªed. Estados Unidos: Kindle Edition. 2007. 685-720.
9. Farreras P, Rozman C. ENFERMEDADES DEL APARATO DIGESTIVO Gastroenterología y hepatología. 17ªed. España: ELSEVIER. 2014. Pp. 241-249.
10. Olivera G. Estudio del efecto protector y/o regenerador del aceite de Emú (*Dromiceius oil*) sobre el daño celular agudo inducido por tetracloruro de carbono en células hepáticas de ratas. Tesis de Grado para optar el Título de Químico Farmacéutico. Chile. 2008. [en línea] [fecha de acceso 2 de agosto del 2015]. Disponible en:
<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2008/fco.48e/doc/fco.48e.pdf>
11. Cascales M, Rodes J. Hepatología. . Ed. C.S.I.C .España. 1990. pp. 85-96. [En línea] 2012 [fecha de acceso 31 de julio del 2015]. Disponible en:
http://books.google.es/books?id=SYQ4-BBxK_4C&printsec=frontcover&dq=hepatologia&hl=es&sa=X&ei=rRbbU7fWObDgsATu4IDQCA&sqi=2&ved=0CB8Q6AEwAA#v=onepage&q=hepatologia&f=false
12. Angulo B, Donato B. Efecto de la silimarina en la intoxicación crónica experimental con tetracloruro de carbono en *Cavia porcellus*. Tesis para optar el título de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo.1991.
13. Guevara A, Marín C, Mantilla E, Ybáñez R. Efecto del infuso de *Petroselinum sativum* sobre la insuficiencia hepática inducida en *Rattus norvegicus* var.

- albinus*. Revista Pharmaciencia. 2014: 2 (1). [en línea] [fecha de acceso 29 de Julio del 2015]. Disponible en:
<http://www.revistas.unitru.edu.pe/index.php/farmabioq/article/view/690/629>
14. Selema G. Martínez J. Efecto hepatoprotector inducido por el flavonoide Astilbina frente a un modelo animal tratado con tetracloruro de carbono. Revista Cubana de plantas medicinales. 1999: 1(4). pp.36-39. [En línea] [fecha de acceso 2 agosto del 2014]. Disponible en:
<http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v4n1/pla10199.pdf>
15. Arce C, Ortiz J, Meléndez P, et al. Efectos hepatoprotector y antioxidante de *Taraxacum officinale* en el daño hepático agudo inducido por el tetracloruro de carbono en la rata. Revista Ciencias Farmacéuticas; México. 2013. 44(4): 53-61. [En línea] [fecha de acceso 31 de julio del 2014]. Disponible en:
<http://www.redalyc.org/pdf/579/57930578007.pdf>
16. Lorraine B, Dreisbach R. Manual de toxicología clínica de Dreisbach. Estados Unidos: El Manual Moderno. 2000. pp.155
17. Repetto M, Repetto G. Toxicología fundamental. 4ªed. España: DIAZ SANTOS. 2009. pp. 187-194.
18. Arroyo J, Almora Y, Quino M, Ruez E, Martínez J, Buendía J, Baca D et al. Efecto protector en cirrosis hepática inducida en ratas del extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum* comparado con silimarina. Anales de la Facultad de Medicina. Perú. 2012:73(2). [En línea][fecha de acceso 31 de julio del 2014]. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1025-55832012000200002&script=sci_arttext

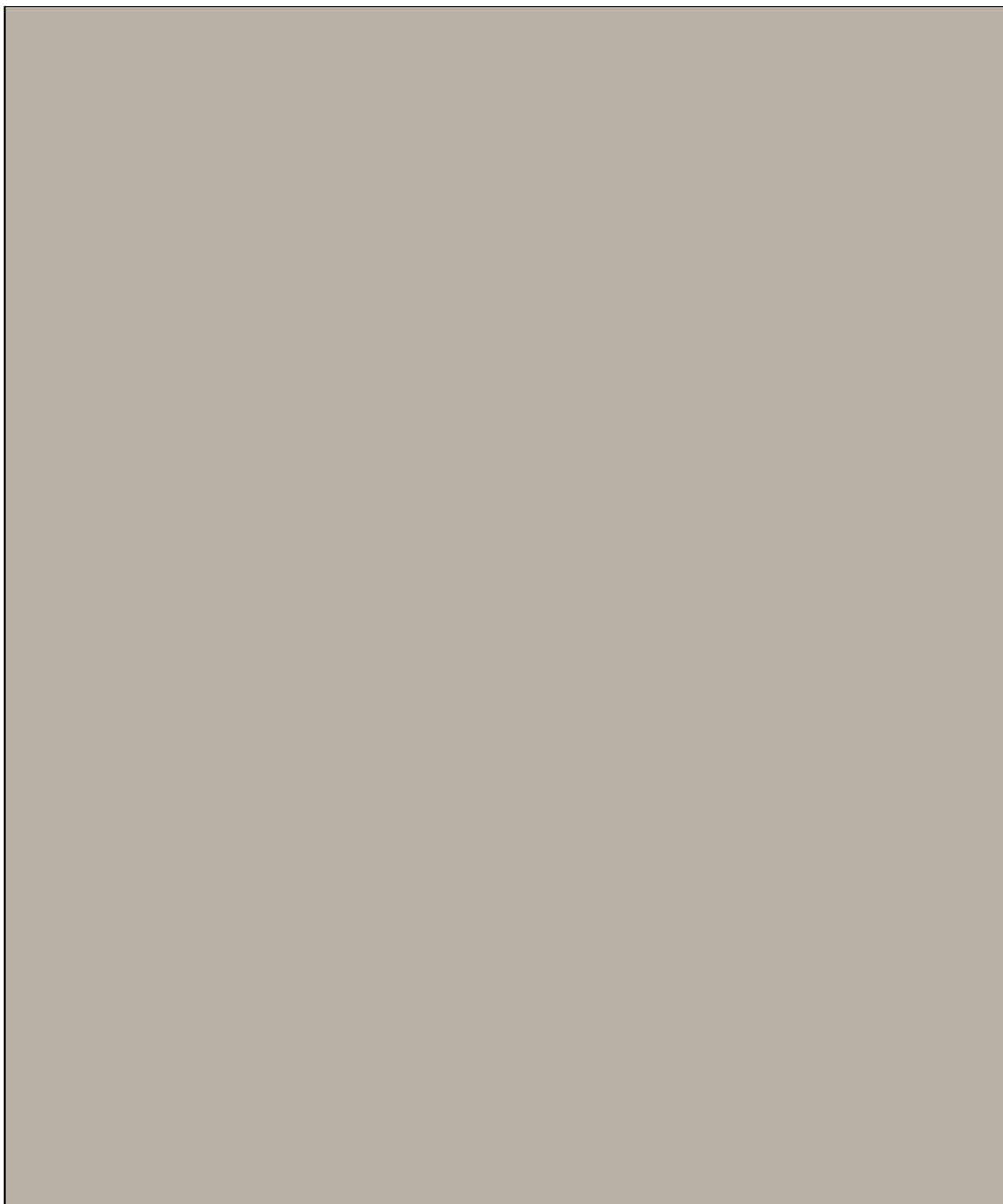
19. Cruzado R, Guzmán T. Efecto de la flor de *Cordia lutea* “overo” en Intoxicación Hepática Crónica Experimental con Tetracloruro de Carbono en *Oryctolagus cuniculus*: Variaciones séricas de GTP y Bilirrubina. Tesis para obtener el grado de bachiller en Farmacia y Bioquímica. Tesis para optar el título de Farmacia y Bioquímica. 1993.
20. Alva S, Chang G. Efecto de la Silimarina en la intoxicación crónica experimental con CCl₄ en *Oryctolagus cuniculus* analizando valores séricos de GPT y Bilirrubinas. Tesis para optar el grado de Bachiller de Farmacia y Bioquímica. 1993.
21. Giannini E, Testa R, Savarino V. Liver Enzyme Alteration: A Guide for Clinicians. Canadian Medical Association Journal. 2005. 172(3):367-379. [En línea][fecha de acceso 28 de Agosto del 2015]. Disponible en: <http://www.bago.com/bagoarg/biblio/clmedweb497.htm>
22. García M y Zurita A. Transaminasas: Valoración y significación clínica. Hospital Universitario Virgen Macarena; España. [En línea] [fecha de acceso 5 de Enero del 2016]. Disponible en: <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/transaminasas.pdf>
23. Moreno L, Herrera A, Oyola L, Arroyo J. Metabolismo de hidrato de cloral en ratas con insuficiencia hepática inducida por tetracloruro de carbono. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública; Perú 2003. 20 (4). [En línea][fecha de acceso 5 de Enero del 2016]. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/medicina_experimental/v20_n4/pdf/a03.pdf
24. Bruneton J. Farmocognosia. 2ª ed. Acribia. España. 2001. p.20.

25. Cartaya O, Reynaldo Inés. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. Revista Cultivos Tropicales; Cuba. 2001. 22(2). pp.5-14. [en línea][fecha de acceso 2 de agosto del 2015]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215009001>
26. Martínez S, González J, Culebras M, Tuñón M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Revista de Nutrición Hospitalaria. España. 2002: XVII (6). pp. 271-278. [En línea] [fecha de acceso 2 de agosto del 2015]. Disponible en: <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>
27. Escamilla C, Cuevas E, Guevara J. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Revista de la Facultad de Medicina UNAM. México. 2009. 52(2): 73-75. [En línea][fecha de acceso 24 de Noviembre del 2014]. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol13_1_99/ali09199.htm
28. De la Cruz T. Histotaxonomía, Fitogeografía y Hábitat de *Cordia lutea* Lam. (Boraginacea) “overo”, “flor de overo”, “overal”. Tesis para optar el grado académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo.1993: 9-25.
29. García M, Sandoval J. Cuantificación por el método espectrofotométrico de flavonoides totales en el extracto etanólico de hojas de *Cordia lutea* Lam. “flor de overo” procedente del distrito de Laredo, provincia de Trujillo, región La Libertad. Tesis I. Facultad de Farmacia y Bioquímica .Universidad Nacional de Trujillo. 2015.
30. Cruzado R. Estudio Fitoquímico de la Flor de *Cordia lutea* “overo”. Informe de Prácticas Pre-Profesionales para optar el Título de Químico Farmacéutico.

- Facultad de Farmacia y Bioquímica .Universidad Nacional de Trujillo.1993:1-19.
31. Chen M, Wang T, Jiang Z, 2, Shan C, Wang H, Wu M et al. Anti-inflammatory and hepatoprotective effects of total flavonoid C-glycosides from *Abrus mollis* extracts. Chinese Journal of Natural Medicines. 2014: 12(8). pp. 590- 598
32. Benito P, Calvo S, Gómez C, Iglesias C. Alimentación y nutrición en la vida activa: ejercicio físico y deporte. Universidad Nacional de Educación a Distancia. España. 2014. pp.218-220.
33. Maalik A, Khan F, Mumtaz A, Mehmood A, Azhar S, Atif M. Pharmacological Applications of Quercetin and its Derivatives: A Short Review. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2014: 13 (9). pp. 1561-1566.
34. Sawi E, Sleem A. Flavonoids and Hepatoprotective Activity of Leaves of *Senna Surattensis* (Burm.f.) In CCl₄ Induced Hepatotoxicity in Rats. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 2010: 4(6). pp. 1326-1334.
35. Yihang W, Fang W, Qunxiong Z, Longxi L, Hongtian Y, Changxin Zhou et al. Hepatoprotective effect of total flavonoids from *Laggera alata* against carbon tetrachloride-induced injury in primary cultured neonatal rat hepatocytes and in rats with hepatic damage. Journal of Biomedical Science. 2006:13. pp.569–578
36. Zhang S, Lu B, Han X, Xu L, Qi Y, Yin L et al. Protection of the flavonoid fraction from *Rosa laevigata* Michx fruit against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. Food and Chemical Toxicology 55.2013.pp.60–69
37. Tong J, Yao X, Zeng H, Zhou G, Chen Y, and Maa B, Wang Y. Hepatoprotective activity of flavonoids from *Cichorium glandulosum* seeds in

- vitro and in vivo carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology* 174. 2015. pp.355–363.
38. Zhao P, Qia C, Wanga G, Daia X, Houb X. Enrichment and purification of total flavonoids from Cortex Juglandis Mandshuricae extracts and their suppressive effect on carbon tetrachloride-induced hepatic injury in Mice. *Journal of Chromatography B*, 1007. 2015. pp. 8–17
39. Yuan L, Chen F, Ling L, Dou P, Bo H, Zhong M et al. Protective effects of total flavonoids of *Bidens pilosa*. L. (TFB) on animal liver injury and liver fibrosis. *Journal of Ethnopharmacology* 116. 2008. pp.539–546
40. Yan J, Ai G, Zhang X, Xu H, Huang Z. Investigations of the total flavonoids extracted from flowers of *Abelmoschus manihot* (L.) Medic against α -naphthylisothiocyanate-induced cholestatic liver injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 172. 2015. pp.202–213.
41. Gutiérrez G, Miranda M, Varona N, Rodríguez A. Validación de 2 métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en *Psidium guajaba*, L. *Revista Cubana de Farmacia*. 2000: 34(1). pp.50-55. [En línea] [fecha de acceso 24 de Enero del 2016].
Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75152000000100007&script=sci_arttext.
42. Cruzado J, Silva C. Guía de prácticas de Toxicología. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. 2014: 50, 51.
43. Hashimoto M, Kothary P, Raper S, Phenobarbitalin comparison with carbon tetrachloride and phenobarbital-induced cirrhosis in rat liver regeneration. *Journal of Surgical Research*. 1999; 81(2). pp.164-169

VII. ANEXOS



ANEXO 01. Ejemplar de la especie *Cordia lutea* Lam. “flor de overo” identificada en el Herbario Truxillensis de la Universidad Nacional de Trujillo.

ANEXO 02: Datos basales de pruebas bioquímicas de perfil hepático



ANÁLISIS CLÍNICO

IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE:

Nombre : *Rattus norvegicus*
Propietario : García Méndez, Maritza
Edad : 5 Meses
Sexo : M

Especie : Roedor
Raza : Rata blanca
MV Solicitante :
Fecha : 21/12/15

Muestra : suero
 Toma de muestra : punción cardiaca ecoguiada
 Analizador bioquímico : BS 200 MINDRAY Vet
 Método : Espectrofotometría automatizada.
 Equipo de ultrasonido : Sonoscape S 6V
 Método de exploración : Doppler color

RESULTADOS

ESPECIMEN	ANALITO			
	ALT	TBIL	DBIL	IBIL
1	78.4	0.32	0.07	0.25
2				
3	81.4	0.35	0.07	0.28
4	79.9	0.24	0.05	0.19
5	82.1	0.18	0.04	0.14
6	82.5	0.22	0.05	0.17
7				
8	82.7	0.44	0.09	0.35
9	81.1	1.025	0.22	0.805
10	83.1	0.39	0.08	0.31
11	79.3	0.32	0.07	0.25
12	80.9	0.25	0.05	0.20
13	76.5	0.26	0.06	0.20
14	81.4	0.30	0.06	0.24
15	82.3	0.42	0.09	0.33
16	74.2	0.36	0.06	0.28
17	80.8	0.38	0.08	0.30
18	75.8	0.29	0.06	0.23
19	81.3	0.32	0.07	0.25
20	80.9	0.37	0.08	0.29

ESPECIMEN	ANALITO			
	ALT	TBIL	DBIL	IBIL
21	75.8	0.28	0.06	0.22
22	76.8	0.24	0.05	0.19
23	82.5	0.32	0.07	0.25
24	83.2	0.27	0.06	0.21
25	79.5	0.21	0.05	0.16
26	75.6	0.38	0.08	0.30
27	82.9	0.29	0.06	0.23
28				
29	79.3	0.39	0.08	0.31
30	81.3	0.29	0.06	0.23
31	82.3	0.28	0.06	0.22
32	74.5	0.29	0.06	0.23



M.V. José Luis Villena Suárez
Especialista en Medicina de Animales de Compañía.
Magister en Farmacia y Bioquímica.
Miembro de la Sociedad Peruana de Ultrasonido en Medicina y Biología.
CMVP 4718

ANEXO 03: Datos Post-Estímulo (15 días) de pruebas bioquímicas de perfil hepático



ANÁLISIS CLÍNICO

IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE:

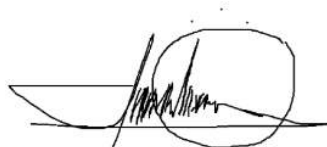
Nombre	: <i>Rattus norvegicus</i>	Especie	: Roedor
Propietario	: García Méndez, Maritza	Raza	: Rata blanca
Edad	: 5 Meses	MV Solicitante	:
Sexo	: M	Fecha	: 04/01/16

Muestra	: suero
Toma de muestra	: punción cardiaca ecoguiada
Analizador bioquímico	: BS 200 MINDRAY Vet
Método	: Espectrofotometría automatizada.
Equipo de ultrasonido	: Sonoscape S 6V
Método de exploración	: Doppler color

RESULTADOS

ESPECIMEN	ANALITO			
	ALT	TBIL	DBIL	IBIL
1	78.9	0.36	0.08	0.28
2				
3	81.7	0.39	0.08	0.31
4	79.8	0.27	0.06	0.21
5	82.4	0.21	0.04	0.17
6	82.4	0.24	0.05	0.19
7				
8	82.3	0.42	0.09	0.33
9				
10	169.9	1.86	0.40	1.46
11	130.2	1.24	0.27	0.97
12	122.1	2.04	0.44	1.60
13	132.9	1.47	0.31	1.16
14	149.5	1.35	0.29	1.06
15	134.2	1.14	0.24	0.90
16	180.2	1.48	0.32	1.16
17	90.3	0.76	0.16	0.60
18	93.6	0.59	0.13	0.46
19	89.3	0.76	0.16	0.60
20	90.2	0.77	0.16	0.61

ESPECIMEN	ANALITO			
	ALT	TBIL	DBIL	IBIL
21	86.6	0.88	0.19	0.69
22	97.8	0.64	0.14	0.50
23	92.6	0.75	0.16	0.59
24	96.2	0.72	0.15	0.57
25	81.8	0.29	0.06	0.23
26	81.6	0.46	0.10	0.36
27	84.2	0.35	0.08	0.27
28				
29	82.6	0.47	0.10	0.37
30	84.9	0.35	0.08	0.27
31	82.7	0.36	0.08	0.28
32	79.2	0.34	0.08	0.26



M.V. José Luis Villena Suárez
Especialista en Medicina de Animales de Compañía.
Magister en Farmacia y Bioquímica.
Miembro de la Sociedad Peruana de Ultrasonido en Medicina y Biología.
CMVP 4718

Av. América Norte N° 1106 – Urb. Los Jardines – Trujillo
Teléfono : (044) 425854

ANEXO 04: Prueba estadística de t-Student de muestras de dos medias emparejadas

Tabla 03: Estadística descriptiva de las variables ALT, BI, BD y BT en las determinaciones basales y post-estímulo en el Grupo I (Blanco).

Estadísticas de muestras emparejadas					
Pruebas Bioquímicas		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Alanina Aminotransferasa (UI/L)	Basal	81.17	6	1.69	.69
	Post-estímulo	81.25	6	1.52	.62
Bilirrubina Indirecta (mg/dL)	Basal	0.23	6	0.08	.03
	Post-estímulo	0.25	6	0.07	.03
Bilirrubina Directa (mg/dL)	Basal	0.06	6	0.02	.01
	Post-estímulo	0.07	6	0.02	.01
Bilirrubina Total (mg/dL)	Basal	0.29	6	0.10	.04
	Post-estímulo	0.32	6	0.09	.04

Tabla 04: Comparaciones de las variables AL, BI, BD y BT en las determinaciones basales y Post-estímulo mediante la prueba de t-Student de muestras de medias emparejadas para el Grupo I (Blanco)

Prueba de muestras emparejadas									
Pruebas Bioquímicas		Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	Alanina Aminotransferasa (UI/L) Basal - Alanina Aminotransferasa (UI/L) Post-estímulo	-.08333	.33714	.13764	-.43715	.27048	-.605	5	.571
Par 2	Bilirrubina Indirecta (mg/dL) Basal - Bilirrubina Indirecta (mg/dL) Post-estímulo	-.01833	.01941	.00792	-.03870	.00203	-2.314	5	.069
Par 3	Bilirrubina Directa (mg/dL) Basal - Bilirrubina Directa (mg/dL) Post-estímulo	-.00500	.00548	.00224	-.01075	.00075	-2.236	5	.076
Par 4	Bilirrubina Total (mg/dL) Basal - Bilirrubina Total (mg/dL) Post-estímulo	-.02333	.02251	.00919	-.04696	.00029	-2.539	5	.052

Tabla 05: Estadística descriptiva de las variables ALT, BI, BD y BT en las determinaciones basales y Post-estímulo en el Grupo II (Control).

Estadísticas de muestras emparejadas					
Pruebas Bioquímicas		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Alanina Aminotransferasa (UI/L)	Basal	79.67	7	3.25	1.23
	Post-estímulo	145.57	7	21.92	8.29
Bilirrubina Indirecta (mg/dL)	Basal	0.26	7	0.05	0.02
	Post- estímulo	1.19	7	0.26	0.10
Bilirrubina Directa (mg/dL)	Basal	0.07	7	0.01	0.01
	Post- estímulo	0.32	7	0.07	0.03
Bilirrubina Total (mg/dL)	Basal	0.33	7	0.06	0.02
	Post- estímulo	1.51	7	0.33	0.12

Tabla 06: Comparaciones de las variables AL, BI, BD y BT en las determinaciones basales y Post-estímulo mediante la prueba de t-Student de muestras de medias emparejadas para el Grupo II (Control)

Prueba de muestras emparejadas									
Pruebas Bioquímicas		Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	Alanina Aminotransferasa (UI/L) Basal - Alanina Aminotransferasa (UI/L) Post- estímulo	-65.90000	22.98913	8.68907	-87.16140	-44.63860	-7.584	6	2.73E-04
Par 2	Bilirrubina Indirecta (mg/dL) Basal - Bilirrubina Indirecta (mg/dL) Post- estímulo	-.92857	.27643	.10448	-1.18423	-.67292	-8.887	6	1.13E-04
Par 3	Bilirrubina Directa (mg/dL) Basal - Bilirrubina Directa (mg/dL) Post-estímulo	-.25714	.07868	.02974	-.32991	-.18438	-8.647	6	1.32E-04
Par 4	Bilirrubina Total (mg/dL) Basal - Bilirrubina Total (mg/dL) Post-estímulo	-1.18286	.35514	.13423	-1.51131	-.85441	-8.812	6	1.19E-04

Tabla 07: Estadística descriptiva de las variables ALT, BI, BD y BT en las determinaciones basales y Post-estímulo en el Grupo III (Problema I).

Estadísticas de muestras emparejadas					
Pruebas Bioquímicas		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Alanina Aminotransferasa (UI/L)	Basal	79.61	8	3.06	1.08
	Post-estímulo	92.08	8	3.72	1.31
Bilirrubina Indirecta (mg/dL)	Basal	0.24	8	0.04	0.01
	Post-estímulo	0.58	8	0.07	0.02
Bilirrubina Directa (mg/dL)	Basal	0.07	8	0.01	0.00
	Post-estímulo	0.16	8	0.02	0.01
Bilirrubina Total (mg/dL)	Basal	0.31	8	0.05	0.02
	Post-estímulo	0.73	8	0.09	0.03

Tabla 08: Comparaciones de las variables AL, BI, BD y BT en las determinaciones basales y Post-estímulo mediante la prueba de t-Student de muestras de medias emparejadas para el Grupo III (Problema I)

Prueba de muestras emparejadas									
Pruebas Bioquímicas		Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	Alanina Aminotransferasa (UI/L) Basal - Alanina Aminotransferasa (UI/L) Post-estímulo	-12.46250	4.59936	1.62612	-16.30766	-8.61734	-7.664	7	1.20E-04
Par 2	Bilirrubina Indirecta (mg/dL) Basal - Bilirrubina Indirecta (mg/dL) Post-estímulo	-.33500	.06782	.02398	-.39170	-.27830	-13.970	7	2.28E-06
Par 3	Bilirrubina Directa (mg/dL) Basal - Bilirrubina Directa (mg/dL) Post-estímulo	-.09000	.01773	.00627	-.10482	-.07518	-14.359	7	1.89E-06
Par 4	Bilirrubina Total (mg/dL) Basal - Bilirrubina Total (mg/dL) Post-estímulo	-.42500	.08485	.03000	-.49594	-.35406	-14.167	7	2.07E-06

Tabla 09: Estadística descriptiva de las variables ALT, BI, BD y BT en las determinaciones basales y Post-estímulo en el Grupo IV (Problema II).

Estadísticas de muestras emparejadas					
PRUEBAS BIOQUÍMICAS		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Alanina Aminotransferasa (UI/L)	Basal	79.34	7	3.23	1.22
	Post-estímulo	82.29	7	1.97	0.75
Bilirrubina Indirecta (mg/dL)	Basal	0.24	7	0.05	0.02
	Post-estímulo	0.29	7	0.05	0.02
Bilirrubina Directa (mg/dL)	Basal	0.07	7	0.01	0.01
	Post-estímulo	0.08	7	0.01	0.01
Bilirrubina Total (mg/dL)	Basal	0.30	7	0.06	0.02
	Post-estímulo	0.37	7	0.07	0.02

Tabla 10: Comparaciones de las variables AL, BI, BD y BT en las determinaciones basales y Post-estímulo mediante la prueba de t-Student de muestras de medias emparejadas para el Grupo IV (Problema II)

Prueba de muestras emparejadas									
Pruebas Bioquímicas		Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	Alanina Aminotransferasa (UI/L) Basal - Alanina Aminotransferasa (UI/L) Post- estímulo	-.0193	.0184	.0089	-.0487	.0030	-2.2139	6	.0623
Par 2	Bilirrubina Indirecta (mg/dL) Basal - Bilirrubina Indirecta (mg/dL) Post- estímulo	-.0520	-.0025	-.0010	-.1758	-.0442	-2.1139	6	.0604
Par 3	Bilirrubina Directa (mg/dL) Basal - Bilirrubina Directa (mg/dL) Post-estímulo	-.0180	-.0014	-.0005	-.0460	-.0169	-2.1361	6	.1444
Par 4	Bilirrubina Total (mg/dL) Basal - Bilirrubina Total (mg/dL) Post-estímulo	-.0700	-.0039	-.0015	-.2216	-.0613	-2.3392	6	.0754

ANEXO 05: Prueba estadística de ANOVA Post-estímulo

Tabla 11: Estadística descriptiva de las variables ALT, BI, BD y BT Post-estímulo para cada variable ALT, BI, BD y BT

Descriptivos									
		N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
Alanina Aminotransferasa (UI/L) Post-estímulo	Grupo I	6	81.25	1.521	.62115	79.6533	82.8467	78.90	82.40
	Grupo II	7	145.57	21.922	8.28584	125.2967	165.8461	122.10	180.20
	Grupo III	8	92.075	3.717	1.31431	88.9672	95.1828	86.60	97.80
	Grupo IV	7	82.29	1.974	.74592	79.5937	84.8920	79.20	84.90
	Total	28	101.171	28.453	5.37725	90.1382	112.2046	78.90	180.20
Bilirrubina Indirecta (mg/dL) Post-estímulo	Grupo I	6	.248	.067	.02738	.1780	.3187	.17	.33
	Grupo II	7	1.187	.256	.09663	.9507	1.4236	.90	1.60
	Grupo III	8	.578	.07046	.02491	.5186	.6364	.46	.69
	Grupo IV	7	0.291	0.05	0.02	.2993	.3807	0.23	0.36
	Total	28	.600	.38937	.07358	.4490	.7510	.17	1.60
Bilirrubina Directa (mg/dL) Post-estímulo	Grupo I	6	.067	.01966	.00803	.0460	.0873	.04	.09
	Grupo II	7	.3243	.07138	.02698	.2583	.3903	.24	.44
	Grupo III	8	.1563	.01768	.00625	.1415	.1710	.13	.19
	Grupo IV	7	0.083	0.01	0.01	.0815	.1013	0.06	.10
	Total	28	.1629	.10704	.02023	.1214	.2044	.04	.44
Bilirrubina Total (mg/dL) Post-estímulo	Grupo I	6	.3150	.08643	.03528	.2243	.4057	.21	.42
	Grupo II	7	1.5114	.32693	.12357	1.2091	1.8138	1.14	2.04
	Grupo III	8	.7338	.08782	.03105	.6603	.8072	.59	.88
	Grupo IV	7	0.374	0.07	0.02	.3815	.4814	0.29	.46
	Total	28	.7629	.49635	.09380	.5704	.9553	.21	2.04

Tabla 12: Análisis de varianza (ANOVA) de los grupos de trabajo en las variables ALT, BI, BD y BT en el Post-estímulo.

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Alanina Aminotransferasa (UI/L) Post-estímulo	Entre grupos	19332.648	3.000	6444.216	51.294	1.37E-10
	Dentro de grupos	3015.193	24.000	125.633		
	Total	22347.841	27.000			
Bilirrubina Indirecta (mg/dL) Post-estímulo	Entre grupos	3.823	3.000	1.274	65.741	1.02E-11
	Dentro de grupos	0.465	24.000	0.019		
	Total	4.288	27.000			
Bilirrubina Directa (mg/dL) Post-estímulo	Entre grupos	0.283	3.000	0.094	62.828	1.64E-11
	Dentro de grupos	0.036	24.000	0.001		
	Total	0.319	27.000			
Bilirrubina Total (mg/dL) Post-estímulo	Entre grupos	6.184	3.000	2.061	65.198	1.11E-11
	Dentro de grupos	0.759	24.000	0.032		
	Total	6.943	27.000			

Tabla 13: Comparaciones múltiples mediante el Test HSD de Tukey de las medias de los grupos de trabajo para cada una de las variables ALT, BI, BD y BT

Comparaciones múltiples							
HSD Tukey							
Variable dependiente			Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
Alanina Aminotransferasa (UI/L) Post-estímulo	Grupo I	Grupo II	-64.32143*	6.23146	1.54E-09	-81.5116	-47.1313
		Grupo III	-10.82500	6.04903	2.29E-05	-27.5119	5.8619
		Grupo IV	-2.99286	6.23146	.963	-20.1830	14.1973
	Grupo II	Grupo I	64.32143*	6.23146	1.54E-09	47.1313	81.5116
		Grupo III	53.49643*	5.79688	1.34E-08	37.5051	69.4878
		Grupo IV	61.32857*	5.98699	1.79E-09	44.8128	77.8443
	Grupo III	Grupo I	10.82500	6.04903	2.29E-05	-5.8619	27.5119
		Grupo II	53.49643*	5.79688	1.34E-08	-69.4878	-37.5051
		Grupo IV	7.83214	5.79688	.125	-8.1592	23.8235
	Grupo IV	Grupo I	2.99286	6.23146	.963	-14.1973	20.1830
		Grupo II	61.32857*	5.98699	.000	-77.8443	-44.8128
		Grupo III	-7.83214	5.79688	.125	-23.8235	8.1592
	Grupo I	Grupo II	-.93881*	.07710	5.48E-11	-1.1515	-.7261

Bilirrubina Indirecta (mg/dL) Post-estímulo		Grupo III	-.32917*	.07485	.001	-.5356	-.1227
		Grupo IV	-.09167	.07710	.640	-.3044	.1210
	Grupo II	Grupo I	.93881*	.07710	.000	.7261	1.1515
		Grupo III	.60964*	.07173	.000	.4118	.8075
		Grupo IV	.84714*	.07408	.000	.6428	1.0515
	Grupo III	Grupo I	.32917*	.07485	.001	.1227	.5356
		Grupo II	-.60964*	.07173	.000	-.8075	-.4118
		Grupo IV	.23750*	.07173	.015	.0396	.4354
	Grupo IV	Grupo I	.09167	.07710	.640	-.1210	.3044
		Grupo II	-.84714*	.07408	1.98E-10	-1.0515	-.6428
		Grupo III	-.23750*	.07173	.015	-.4354	-.0396
	Bilirrubina Directa (mg/dL) Post-estímulo	Grupo I	Grupo II	-.25762*	.02136	6.67E-11	-.3165
Grupo III			-.08958*	.02074	.001	-.1468	-.0324
Grupo IV			-.02476	.02136	.657	-.0837	.0342
Grupo II		Grupo I	.25762*	.02136	6.67E-11	.1987	.3165
		Grupo III	.16804*	.01987	6.75E-08	.1132	.2229
		Grupo IV	.23286*	.02052	2.32E-10	.1762	.2895
Grupo III		Grupo I	.08958*	.02074	.001	.0324	.1468
		Grupo II	-.16804*	.01987	.000	-.2229	-.1132
		Grupo IV	.06482*	.01987	.016	.0100	.1196
Grupo IV		Grupo I	.02476	.02136	.657	-.0342	.0837
		Grupo II	-.23286*	.02052	2.32E-10	-.2895	-.1762
		Grupo III	-.06482*	.01987	.016	-.1196	-.0100
	Grupo I	Grupo II	-1.19643*	.09836	5.59E-11	-1.4678	-.9251

Bilirrubina Total (mg/dL) Post- estímulo		Grupo III	-.41875*	.09548	1.06E-03	-.6821	-.1554
		Grupo IV	-.11643	.09836	.643	-.3878	.1549
	Grupo II	Grupo I	1.19643*	.09836	5.59E-11	.9251	1.4678
		Grupo III	.77768*	.09150	6.16E-08	.5253	1.0301
		Grupo IV	1.08000*	.09450	2.00E-10	.8193	1.3407
	Grupo III	Grupo I	.41875*	.09548	.001	.1554	.6821
		Grupo II	-.77768*	.09150	6.16E-08	-1.0301	-.5253
		Grupo IV	.30232*	.09150	.015	.0499	.5547
	Grupo IV	Grupo I	.11643	.09836	.643	-.1549	.3878
		Grupo II	-1.08000*	.09450	2.00E-10	-1.3407	-.8193
		Grupo III	-.30232*	.09150	.015	-.5547	-.0499

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

ANEXO 06: Gráfico de cajas y bigotes para comparar las distribuciones de los marcadores hepáticos Post-estímulo

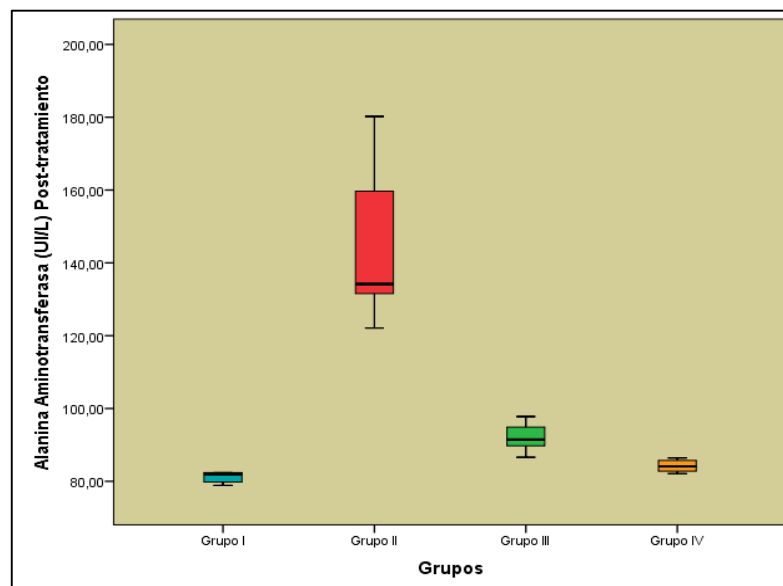


Figura 10: Comparación de las distribuciones de los niveles de Alanina Aminotransferasa Post-estímulo entre los grupos I, II, III y IV

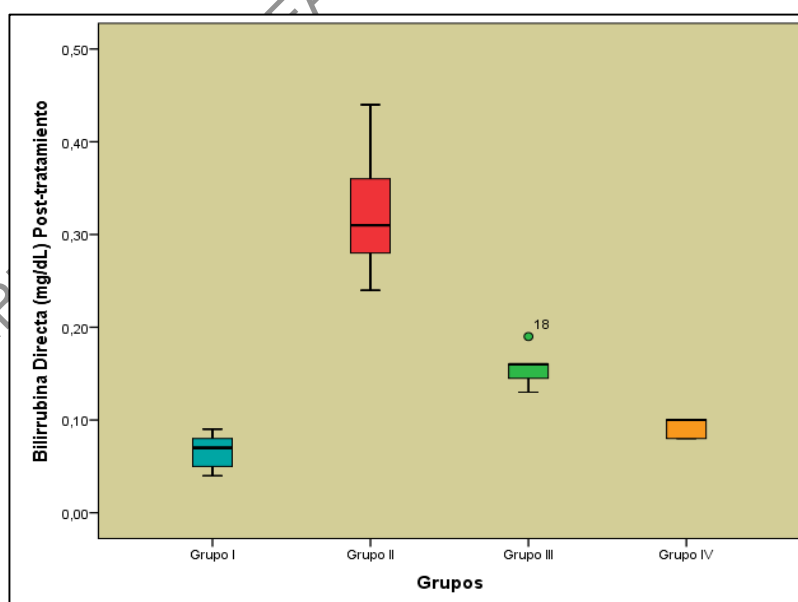


Figura 11: Comparación de las distribuciones de los niveles de Bilirrubina Directa Post-estímulo entre los grupos I, II, III y IV

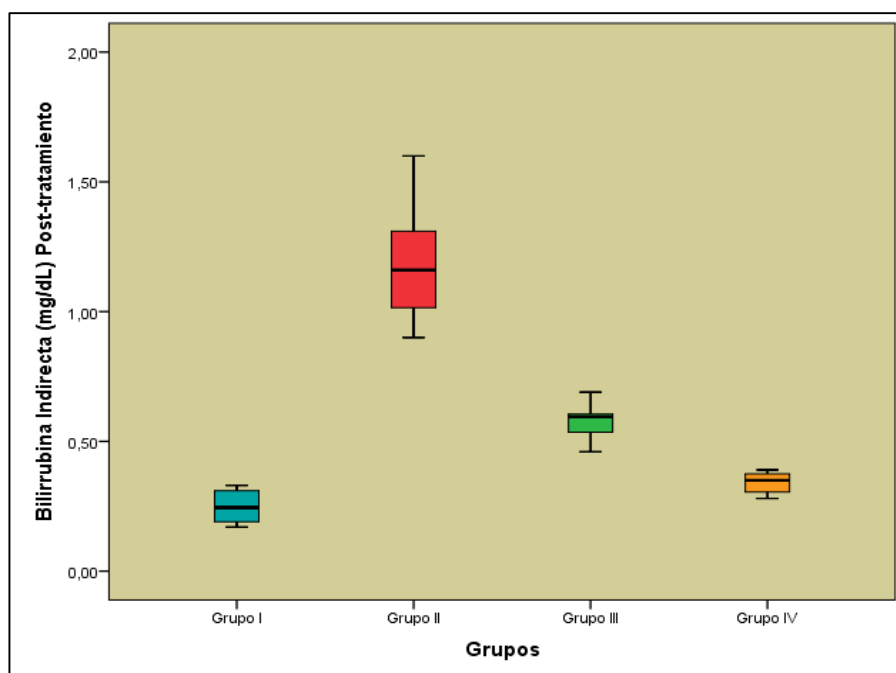


Figura 12: Comparación de las distribuciones de los niveles de Bilirrubina Indirecta Post-estímulo entre los grupos I, II, III y IV

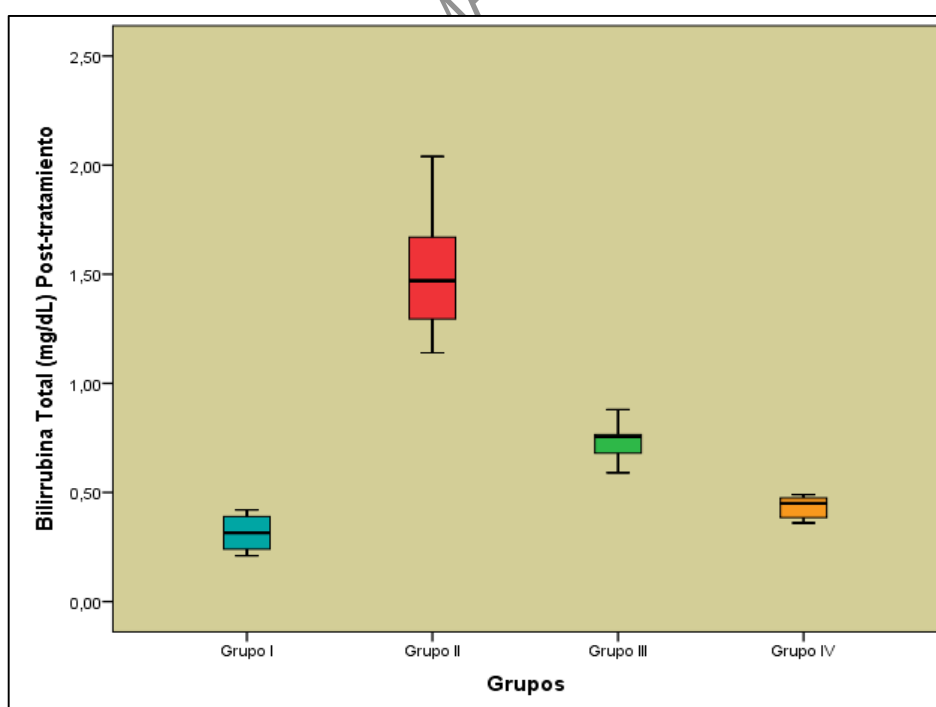


Figura 13: Comparación de las distribuciones de los niveles de Bilirrubina Total Post-estímulo entre los grupos I, II, III y IV