

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN
MARCOS**

FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA
HUMANA

**EFECTO PROTECTOR DEL EXTRACTO
ACUOSO DE LAS HOJAS DE *Peumus boldus*
“Boldo” EN LA TOXICIDAD HEPÁTICA
INDUCIDA POR ISONIAZIDA EN RATAS
HOLTZMAN HEMBRA**

TESIS

Para optar por el Título Profesional de Médico Cirujana

AUTOR

Elsa Marianela Yovera Leyva

ASESOR

José Ernesto Ráez González

Lima – Perú

2015

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Ernesto Ráez Gonzales y a la Mg. Nancy Joaquina Rojas Morán, quienes brindaron su apoyo constante para el desarrollo de la Tesis.

Al personal de la Escuela Académico Profesional de Medicina Humana, quienes nos han guiado a través del proceso de la obtención del título profesional.

A la Dr. Flor Cruz y los señores Rosauero y Sonco, quienes ayudaron paso a paso a la realización de esta Tesis.

Elsa Marianela Yovera Leyva

DEDICATORIA

A Dios.

A mi padre, Gerardo Maximiliano Yovera Lozada, y mi madre,
Marianela Roxana Leyva Minaya, por su esfuerzo, apoyo incondicional
y por creer en mí.

A mis hermanos, Luis Santiago Yovera Leyva y Cristina Eugenia
Yovera Leyva, por su preocupación y ayuda.

Elsa Marianela Yovera Leyva

INDICE

	Página
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
CAPITULO I:	11
1.1 Planteamiento del problema	
1.2 Formulación de objetivos	
1.3 Justificación del estudio	
1.4 Limitaciones del estudio	
CAPITULO II	24
2.1 Marco teórico	
2.2 Formulación de hipótesis	
CAPITULO III: Diseño metodológico	53
3.1 Tipo de investigación	
3.2 Población y muestra de estudio	
3.3 Variables	
3.4 Procedimientos y análisis de datos	
3.5 Consideraciones éticas	
CAPITULO IV:	63
4.1 Resultados	
4.2 Discusiones	
CAPITULO V:	91
5.1 Conclusiones	
5.2 Recomendaciones	
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
ANEXOS	109

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Protocolo de experimentación	56
Cuadro 2. Esquema de tratamiento de los grupos experimentales.	57
Cuadro 3. Efecto del extracto acuoso de <i>Peumus boldus</i> en el peso de los animales en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas.	64
Cuadro 4. Efecto del extracto acuoso de <i>Peumus boldus</i> en los niveles séricos de bilirrubina total en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas.	66
Cuadro 5. Efecto del extracto acuoso de <i>Peumus boldus</i> en los niveles séricos de bilirrubina directa en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas.	67
Cuadro 6. Efecto del extracto acuoso de <i>Peumus boldus</i> en los niveles séricos de bilirrubina indirecta en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas.	68
Cuadro 7. Efecto del extracto acuoso de <i>Peumus boldus</i> en los niveles séricos de proteínas totales en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas.	69
Cuadro 8. Efecto del extracto acuoso de <i>Peumus boldus</i> en los niveles séricos de albúmina en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas.	70
Cuadro 9. Efecto del extracto acuoso de <i>Peumus boldus</i> en los niveles séricos de globulina en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas.	71
Cuadro 10. Efecto del extracto acuoso de <i>Peumus boldus</i> en los niveles séricos de TGO en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas.	72

Cuadro 11. Efecto del extracto acuoso de <i>Peumus boldus</i> en los niveles séricos de TGP en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas.	69
Cuadro12. Efecto del extracto acuoso de <i>Peumus boldus</i> en el peso de los hígados en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas.	76
Cuadro 13. Efecto del extracto acuoso de <i>Peumus boldus</i> en el largo de los hígados en las ratas en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas.	77
Cuadro 14. Efecto del extracto acuoso de <i>Peumus boldus</i> en el ancho de los hígados de las ratas en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas.	78
Cuadro 15. Características macroscópicas y microscópicas del tejido hepático en los grupos experimentales	90

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Cromatografía de extracto de hojas salvajes de <i>Peumus boldus</i> .	25
Figura 2. Boldina (Principio activo de <i>Peumus boldus</i>).	26
Figura 3. Hojas de <i>Peumus boldus</i> .	28
Figura 4. Metabolismo de fármacos en el hígado.	40
Figura 5. Mecanismos de injuria hepática.	42
Figura 6. Mecanismo de toxicidad por antituberculosos	44
Figura 7. Biotransformación de la isoniazida.	46
Figura 8. Metabolismo de la isoniazida	48
Figura 9. Fórmula para el cálculo del tamaño muestral.	53
Figura 10. Comparación de promedios de peso basal, final y diferencia de pesos entre los grupos experimentales.	64
Figura 11. Aspectos macroscópicos de los hígados en los grupos experimentales.	75
Figura 12. Comparación de los promedios de peso, largo y ancho de los hígados entre los grupos experimentales	79
Figura 13. Aspectos microscópicos de los hígados en los grupos experimentales.	81
Figura 14. Comparación de cambios histopatológicos entre los grupos experimentales.	89

RESUMEN

Objetivo: Determinar el efecto protector del extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* "Boldo" en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra. **Materiales y métodos:** se utilizaron 24 ratas Holtzman hembra, divididas en 4 grupos: A (control), B (isoniazida 50 mg/kg), grupo C (silimarina 200 mg/kg e isoniazida 50 mg/kg) y D (boldo 160 mg/kg e isoniazida 50 mg/kg). Dicho protocolo se siguió por 14 días. Se determinó el efecto protector mediante análisis clínico, bioquímico y morfológico. Se presentan los datos con sus medias y desviaciones estándares. Se compararon las medias de los grupos experimentales mediante la prueba de Kruskal-Wallis, considerándose significativo un $p < 0.05$. **Resultados:** se halló que el grupo B disminuyó más de peso (16,41 +/-17,94 gr), presentó mayor elevación de bilirrubinas totales (0,25 +/-0,13), bilirrubina directa (0,2 +/-0,11), TGO (51.83 +/-18.55) y TGP (29 +/- 13,72), en comparación con el grupo A, C y D. Se halló también menor elevación de proteínas totales (0,49 +/-0,62). y albuminas (0,33 +/- 0,35) en el grupo B, en comparación con los demás grupos. No se halló diferencia significativa entre los grupos en cuanto a la variación de bilirrubina indirecta ($p = 0,104$) y globulinas ($p = 0,144$). Los hígados del grupo B mostraron un aspecto congestivo, fueron más grandes y pesaron más; y mostraron mayor vacuolización perinuclear, congestión sinusoidal y desorganización de la arquitectura celular. Según la escala de Dalaklioglu *et.al.*, el grupo B presentó mayor daño (5,83 +/-0,75) en comparación con los grupos A (0,33 +/- 0,51), C (2,5 +/- 1) y D (0,83 +/- 0,4). **Conclusiones:** El extracto acuoso de *Peumus boldus* posee efecto protector en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra, evidenciado mediante parámetros clínicos, bioquímicos y morfológicos.

Palabras claves: boldo, hepatotoxicidad, isoniazida

ABSTRACT

Objective: To determinate the protective effect the aqueous extract of the leaves of *Peumus boldus* "Boldo" on isoniazid-induced liver toxicity in female Holtzman rats. **Materials and methods:** 24 female Holtzman rats were used. They were divided, randomly, in 4 groups.: A (control), B (isoniazida 50 mg/kg), group C (silimarina 200 mg/kg and isoniazida 50 mg/kg) y D (boldo 160 mg/kg and isoniazida 50 mg/kg). This protocol was followed, daily for 14 days. Before and after the experiment, biochemical analyzes were made. The protector effect was determinate by clinical, biochemical and morphological analyzes. Data is presented in its mean and standard deviation. Means were compared using the Kruskall Wallis test and results were considered significant when $p < 0,05$. **Results:** Rats of group B decreased more in weight (16,41 +/-17,94 gr), showed higher elevation in total bilirrubins (0,25 +/- 0,13), direct bilirrubin (0,2 +/-0,11), TGO (51.83 +/-18.55) and TGP (29 +/- 13,72), compared with groups A, C and D. Also, total proteins (0,49 +/-0,62) and albumin (0,33 +/- 0,35) were lower in rats of group B, compared with the other groups. No significant difference was found in indirect bilirrubin and globulins. Livers of group B were more congestive, bigger and heavier than the other groups. Also, they showed more perinuclear vacuolization, sinusoidal congestion and disarrangement of cellular architecture. According to Dalaklioglu *et.al*.scale , group B showed to be more damaged (5,83 +/-0,75) than groups A (0,33 +/- 0,51), C (2,5 +/- 1) and D (0,83 +/-0,4). **Conclusions:** The aqueous extract of *Peumus boldus* has protective effect on isoniazid-induced liver toxicity in female Holtzman rats, evidenced by clinical, biochemical and morphological parameters.

Key words: Boldo, liver toxicity, isoniazid

INTRODUCCION

El extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* es utilizado como hepatoprotector en la medicina manera tradicional. Éste posee diversos compuestos activos (identificados mediante cromatografía líquida de alto rendimiento) como alcaloides y flavonoides, entre los que destaca el alcaloide Boldina, la cual posee potentes propiedades antioxidantes.

La OMS reportó ,en el 2013, 9 millones de casos nuevos de tuberculosis y 1,5 millones de defunciones debidas a esta causa. Siendo más prevalente en países en vía de desarrollo. La utilización de la isoniazida es esencial en el tratamiento de la tuberculosis, constituyendo con la rifampicina el núcleo básico de su tratamiento. Sin embargo, durante su biotransformación hepática, ésta puede formar metabolitos reactivos que dañan los hepatocitos mediante el incremento de estrés oxidativo. Ello puede llevar a la suspensión de la terapia, y contribuir a la falla del tratamiento, no adherencia a éste; y por consecuencia a la formación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes

Se ha demostrado que el estrés oxidativo es el principal mecanismo implicado en la injuria hepática que ésta produce, por lo que los productos naturales, como el *Peumus boldus*, podrían disminuir el daño hepático debido a sus propiedades antioxidantes.

Por lo que esta investigación se propone determinar el efecto protector del extracto acuoso de hojas de las hojas de *Peumus boldus* “Boldo” en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra.

CAPITULO I:

1.1 Planteamiento del problema

1.1.1 Descripción del Problema

La capacidad hepatoprotectora, atribuida a diversos productos naturales, se refiere al menor daño y posterior regeneración de células hepáticas que se produce al estimular la función normal del hígado al reemplazar las células dañadas. Asimismo dichos productos podrían estimular los sistemas de detoxificación hepática como los sistemas enzimáticos de catalasa y superóxido desmutasa, los cuales se encargan de eliminar los radicales liberados producidos por el metabolismo de hepatotoxinas. Dentro de ellos, se describe al *Peumus boldus* “boldo”.¹

El Boldo crece en los Andes de Chile, Argentina y sierra sur del Perú; y posee dentro de sus principales compuestos a los alcaloides, flavonoides y ácidos fenólicos.¹ Ellos han sido aislados e identificados mediante la utilización de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y se afirma que el alcaloide más abundante es la boldina y a la cual se le atribuye su efecto hepatoprotector.²

Se ha reportado que la boldina protege a la membrana celular de la peroxidación lipídica inducida por radicales liberados, por lo que a éste compuesto se le han atribuido propiedades antioxidantes.³

Por otra parte, la tuberculosis es un grave problema de salud pública a nivel mundial y nacional. En el año 2013, la OMS reportó 9 millones de casos nuevos y 1.5 millones de muertes, de las cuales 1.1 millones se encontraban coinfectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)⁴. En el Perú, el MINSA reportó 105,5 casos de tuberculosis durante el primer trimestre del año 2012. Encontrándose el mayor número de casos en la región Callao (204.9), Ucayali (170.8), Madre de Dios (170.0 casos), Tacna (148.1) y Lima (148.0) por cada 100 000 habitantes.⁵

La isoniazida y rifampicina son los fármacos antituberculosos más utilizados a nivel mundial, éstas constituyen el núcleo básico del tratamiento; sin embargo su uso puede causar hepatotoxicidad, lo que conlleva frecuentemente a la suspensión de la terapia, contribuye a la no adherencia al tratamiento, a la falla del tratamiento y el incremento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a éstos fármacos.⁶

La toxicidad hepática inducida por medicamentos representa el 10% de la causa de falla hepática aguda y es la principal causa de retiro de medicamentos del mercado durante la fase preclínica o clínica, denegación de registros por parte de las agencias reguladoras o retiro del mercado luego de ser registrados.⁷

La incidencia de hepatotoxicidad inducida por fármacos antituberculosos varía del 5% al 33% dependiendo de la población de estudio, la definición de hepatotoxicidad, los

fármacos antituberculosos usados y la forma de monitorización de este efecto adverso.⁸

La producción de la acetilhidrazina e hidracina, es el mecanismo patogénico implicado en la toxicidad hepática inducida por isoniazida. Éstos son metabolitos reactivos que posee la capacidad de actuar como agente acetilador y dañar las macromoléculas del hepatocito. Por su parte, la hidracina produce daño hepático mediante el estrés oxidativo debido a la formación de especies reactivas de oxígeno.⁹ Por lo que en teoría aquellos productos que disminuyan dicho estrés oxidativo serían capaces de disminuir o prevenir el daño hepático inducido por isoniazida. Dentro de ellos se han estudiado a la silimarina, cimetidina, n-acetilcisteína y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). La cimetidina y silimarina actúan inhibiendo el citocromo y estimulando sistemas de defensa oxidativo. Mientras que la n-acetilcisteína, un precursor de la enzima glutatión (GSH) actúa como hepatoprotector incrementando los niveles de ésta enzima.⁹ Sin embargo, éstos suelen no estar al alcance de la población general debido a sus elevados costos. Al contrario de los productos naturales, los cuales son accesibles a la mayoría de estratos de nuestro país, como por ejemplo el extracto acuoso de *Peumus boldus* “boldo”.

Por otro lado, el 80% de la población mundial, según la Organización mundial de la Salud (OMS), utiliza productos naturales sin que existan bases científicas suficientes que apoyen su consumo.¹⁰

Por lo que esta investigación se propone determinar el efecto protector del extracto acuoso de hojas de *Peumus boldus* "Boldo" en la hepática inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra.

1.1.2 Antecedentes

En cuanto a investigaciones realizadas sobre los efectos benéficos del *Peumus boldus*, se puede mencionar la tesis, para obtener el título de Bioquímica Farmacéutica, realizada por Dorys Veloz, donde se evidenció el efecto protector del extracto acuoso de *Peumus boldus* en ratas con toxicidad hepática inducida por paracetamol. En este estudio se confirmó la presencia de compuestos secundarios como alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos y triterpenos en cantidades considerables en el boldo. Se evidenció actividad hepatoprotectora a nivel morfológico, pues en el grupo al cual se le administró el extracto acuoso de Boldo al 100% se halló un 10% de destrucción hepática, mientras que en el que se le administró el extracto acuoso al 66% se halló un 50% y en el que se administro el extracto acuoso al 33%, se halló un 85% de destrucción hepática.¹

Otros investigadores también evidenciaron el efecto hepatoprotector del Boldo en la toxicidad hepática inducida por paracetamol. En este estudio, se comparó el grupo control, al cual se le administró paracetamol a 200 mg/kg por vía intraperitoneal, con grupos experimentales, a los cuales se les administró 80 mg/kg, 120 y 160 mg/kg de extracto acuoso de hojas de Boldo. Como resultado se obtuvo una reducción significativa de los niveles de transaminasas hepáticas en los grupos tratados con el extracto acuoso, así como disminución de las lesiones hepáticas observadas tanto a nivel macroscópico como microscópico.¹¹

El efecto protector de diversas drogas ha sido estudiado en la toxicidad hepática inducida por antituberculosos, como el ajo, la silimarina, la n-acetilcisteína y otros. Siendo la inhibición del citocromo P450 2E1 (CYP450 2E1) y sus acciones antioxidantes el principal mecanismo implicado en los efectos benéficos de dichos productos.¹²

Los efectos benéficos de la silimarina han sido estudiados, en la toxicidad hepática inducida por antituberculosos en ratas Wistar.¹² Los animales fueron divididos en 6 grupos: Grupo 1(control); Grupo 2 (silimarina a 200 mg/kg por canulación orogástrica); Grupo 3 (isoniazida a 50 mg/kg y rifampicina a 100 mg/kg vía intraperitoneal), Grupo 4 (isoniazida a 50 mg/Kg y rifampicina 100 mg/kg vía, intraperitoneal y pirazinamida a

350 mg/kg por canulación gástrica); los grupos 5 y 6 recibieron dosis de dichos fármacos similares a los administrados a los grupos 4 y 5 , además de una dosis de silimarina (200 mg/kg) por canulación gástrica. Dicho protocolo se repitió por 14 días. Concluyendo que los grupos en los que se administró silimarina en conjunto a los fármacos hepatotóxicos mostraron una reducción del daño hepático tanto a nivel bioquímico como histológico.

Otro estudio evaluó el efecto protector de la cimetidina en la toxicidad hepática inducida por la combinación de isoniazida-rifampicina en conejos albinos ¹³; divididos en 6 grupos: Grupo1 (control), Grupo 2 (isoniazida 50 mg/kg/d) , Grupo 3 (isoniazida 50 mg/kg/d y rifampicina 100 mg/kg/d) , Grupo 4 (cimetidina 120 mg/kg/d), Grupo 5 (isoniazida más rifampicina y cimetidina 50 mg/kg) y Grupo 6 (isoniazida más rifampicina y cimetidina 120 mg/kg). Dicho protocolo se siguió durante 7 días. Este estudio halló mayor daño hepático en los grupos donde se utilizó la combinación de isoniazida con rifampicina, demostrado por elevación de las enzimas hepáticas y cambios morfológicos hallados en la microscopía.

Otros trabajos reportaron el efecto hepatoprotector de diversos productos naturales como: té verde, té de

kambucha, tocoferol, extracto de hojas de yacón, extracto de hojas de perejil, y ajo.

Se demostró el efecto protector de la silimarina y n-acetilcisteína en la toxicidad inducida por antituberculosos en modelos in vitro de células hepáticas humanas de la línea de los carcinomas hepatocelulares (HePg2). Observándose la reducción de la toxicidad inducida en estas células, mediante el incremento de la viabilidad celular, conservación de un aspecto morfológico saludable y conservación de la actividad respiratoria celular. Asimismo, los resultados hallados sugieren que la reversión del daño celular causado por los antituberculosos pudiera deberse a la conservación de la membrana celular, supresión del daño mitocondrial y disminución de la apoptosis.¹⁴

1.1.3 Formulación del problema

¿Tiene efecto protector el extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* “Boldo” en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra?

1.2 Formulación de objetivos

1.2.1 Objetivo general

- Determinar el efecto protector del extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* “Boldo” en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra.

1.2.2 Objetivos específicos:

- Determinar la variación en el parámetro clínico producida por el efecto protector del extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* “Boldo” en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra.
- Determinar la alteración en los parámetros bioquímicos producidos por el efecto protector del extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* “Boldo” en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra.
- Determinar los cambios macroscópicos en la morfología hepática producidos por el efecto protector del extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* “Boldo” en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra.

- Determinar los cambios histopatológicos producidos por el efecto protector del extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* "Boldo" en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra

1.3 Justificación del estudio

1.3.1 Justificación legal

Este proyecto de tesis se rige por las Normas para la Elaboración de Tesis para optar el Título Profesional en las Escuelas Académico Profesionales de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, aprobado mediante la Resolución de Decanato N° 1242-FM-1996 de fecha 27 de julio de 1996, ratificada con Resolución Rectoral N° 5293-CR-1996 de fecha 23 de agosto de 1996.

Factibilidad y viabilidad

Este estudio es factible debido a que cuenta con el interés de algunos de los profesionales del Departamento de Patología de la UNMSM.

Asimismo este estudio es viable debido a que se cuenta con el personal, tiempo, equipos, materiales y recursos económicos mínimo necesarios para la realización de un estudio básico de perfil hepático y análisis de muestras histopatológicas.

1.3.2 Justificación teórico científica

Pertinencia

La tuberculosis es un gran problema de salud pública a nivel nacional y mundial, especialmente en países en vía de desarrollo. Siendo la isoniazida uno de los fármacos más utilizados en su tratamiento, sin embargo, la isoniazida posee como potencial efecto adverso, la hepatotoxicidad, la cual es muchas veces motivo de interrupción de la terapia y puede ser causante de la no adherencia al tratamiento, falla de la terapia y tener como consecuencia la producción de cepas de *M.tuberculosis* resistentes a éste fármaco.

La isoniazida produce toxicidad hepática mediante la formación de metabolitos reactivos que inducen a la liberación de especies reactivas de oxígeno, los cuales dañan la membrana celular de los hepatocitos. Por lo que se han estudiado diversos productos naturales y otros fármacos como posibles hepatoprotectores debido a sus propiedades antioxidantes. Sin embargo, no se han realizado estudios acerca del extracto acuoso de hojas de *Peumus boldus* “boldo” en la toxicidad hepática inducida por isoniazida.

El boldo, un árbol que crece en los Andes de Chile, Argentina y sur del Perú, es un producto natural utilizado tradicionalmente como hepatoprotector. Mediante la utilización de HPLC se han logrado identificar diversos compuestos activos en esta planta como: glicósidos de quercetina, derivados del kaempferol, glucósidos de

isoramentina, glucósidos, ácidos fenólicos, proantocianidina y alcaloides. Siendo éstos últimos los más abundantes y dentro de ellos un alcaloide llamado Boldina, cuyo compuesto principal es: [(S)-2.9-dihydroxy-1,1 dimethoxyaporphine y siendo este último al que se le atribuye la propiedad hepatoprotectora. ²

El efecto protector de fármacos como la silimarina y n-acetil cisteína en la toxicidad hepática inducida por antituberculosos ha sido demostrado por diversos estudios. Sin embargo, estos productos comerciales suelen no encontrarse al alcance de la población general debido a sus elevados costos. Por lo que este estudio se propone incrementar el conocimiento científico acerca de un producto natural, cuyo costo se encuentra al alcance de la población general, especialmente de la población en tratamiento contra la tuberculosis.

Asimismo, la Organización mundial de la Salud (OMS) afirma que más del 80% de la población mundial utiliza preparaciones botánicas como medicina tradicional, dentro de éstas el *Peumus boldus*.¹⁰ Sin embargo, ello se hace sin conocer las bases científicas de las propiedades de éstas plantas y en muchos casos sin que existan estudios científicos al respecto. Es por ello que esta investigación pretende incrementar las bases científicas para la utilización de ésta planta medicinal.

Ausencia de duplicación

En la actualidad existe una tendencia en la investigación con plantas medicinales, sin embargo, existen muy pocos estudios acerca de las propiedades antioxidantes del Boldo y sus posibles efectos benéficos y hepatoprotectores.

Por otra parte, en nuestro medio son contados los estudios experimentales de hepatotoxicidad inducida por drogas antituberculosas, siendo la mayoría de estudios acerca de la toxicidad hepática inducida por etanol, dietas hiperlipídicas, uso de paracetamol, entre otras.

1.3.3 Justificación práctica

Este estudio aportará nueva evidencias científicas acerca del efecto protector del extracto acuoso de las hojas de Boldo sobre la toxicidad hepática inducida por isoniazida.

Estos resultados también podrán servir de sustento científico para recomendar la utilización del extracto acuoso de Boldo con el fin de disminuir el riesgo de hepatotoxicidad en la población tratada con fármacos antituberculosos. Lo que resultaría en reducción de la interrupción de la terapia, mayor adherencia al tratamiento, menor falla del tratamiento y menor producción de cepas de bacilo resistentes a la isoniazida.

Por último, este trabajo intenta incrementar la motivación de realizar más estudios con plantas medicinales peruanas, para aumentar su comercialización a nivel nacional e internacional; así como el interés por los estudios experimentales y por la investigación a nivel nacional.

1.4 Limitaciones del estudio

Este estudio posee limitaciones económicas para realizar algunas pruebas bioquímicas, como la medición de superóxido oxidasa o glutatión oxidasa, fosfatasa alcalina, deshidrogenasa láctica y tiempo de protrombina. Por lo que se recomienda sean realizados en estudios posteriores.

CAPITULO II

2.1 Marco teórico

Boldo (*Peumus Boldus*)¹

El Boldo es un árbol verde, dicoico de la familia Monimiáceae, que crece en los Andes de Chile, Argentina y sierra sur del Perú; el cual ha sido utilizado tradicionalmente como hepatoprotector. Éste alcanza la altura de hasta 30 m y tiene un diámetro superior a 1 m, corteza delgada y rugosa de color pardo. Posee hojas opuestas de forma ovalado-elípticas, haz de color verde oscuro, de textura áspera al tacto, envés glauco y piloso y nervadura muy notoria.

Según estudios cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), se ha demostrado la presencia de diversos compuestos activos en esta planta, dentro de los cuales se encuentran en mayor abundancia los alcaloides (1-3 % p/p) y dentro de ellos, predomina la boldina.²

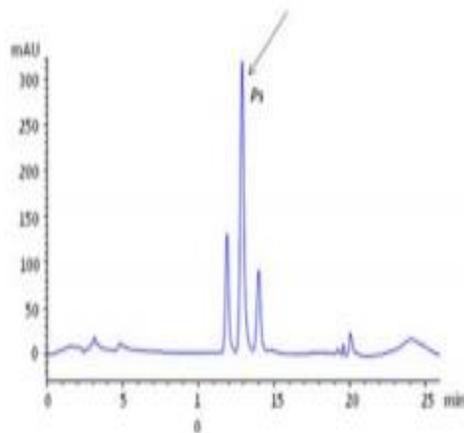
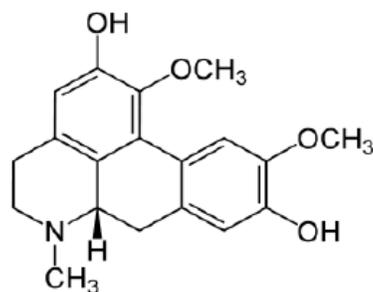


Figura 1. Cromatografía de extracto de hojas salvajes de *Peumus boldus*. Fuente. Tomado de Ríos *et.al.*(2010)²

La boldina confiere el aroma y la esencia a la planta; y es a ella a la que se le atribuyen propiedades hepatoprotectoras, antioxidantes, colagogas, antiespasmódicas, sedativas, reguladoras de la función hepática y antimicrobianas contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

Este compuesto posee como estructura principal la siguiente: (S)-2,9-dihydroxy-1, 10-dimethoxyaporphine⁷

.COMPOSICIÓN QUÍMICA



FUENTE: ESTRUCTURA MOLECULAR DE BOLDINA. <http://es.wikipedia.org/wiki/Boldina> 2013-01-15

Figura 2. **Boldina (Principio activo de *Peumus boldus*).**

Fuente. Tomado de Veloz D.¹

También se han identificado otros compuestos en dicha planta, mediante HPLC, como los glicósidos de quercetina, derivados del kaempferol, glucósidos de isoramantina, glucósidos, ácidos fenólicos y proantocianidinas. Todos ellos son también responsables de la actividad antioxidante del boldo.¹⁵

La boldina es capaz, in vitro, de inhibir la peroxidación lipídica de las membranas celulares de los hepatocitos iniciado por radicales liberados mediante vías enzimáticas y no enzimáticas. Lo que reafirma su propiedad antioxidante.³

Se describe también que el boldo es capaz de estimular los sistemas de detoxificación hepática como los sistemas enzimáticos de catalasa y superóxido desmutasa.¹

Sin embargo, aunque existe evidencia acerca de los efectos benéficos de esta planta, no es recomendable su utilización en el embarazo y la lactancia debido a que no existe evidencia que sugiera que no produce enfermedades en el lactante ni abortos espontáneos.¹ Asimismo, algunos reportes han sugerido un efecto neurotóxico asociado al consumo de boldo (Mejía *et.al*)¹⁰

Las hojas de boldo han sido identificadas por el Biólogo Severo Baldeón del Herbario San Marcos del Museo de Historia Natural, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Siendo su clasificación taxonómica como sigue:

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: MAGNOLIDIAE

ORDEN: LAURALES

FAMILIA: MIONIMIACEAE

GÉNERO: *Peumus*

ESPECIE: *Peumus boldus* Molina



Figura 3. Hojas de Peumus boldus. Fuente. Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico. Ministerio de Educación. Chile

Toxicidad hepática

La toxicidad hepática puede definirse como el daño producido en el hígado por un xenobiótico.¹⁶

Sin embargo, para algunos autores la toxicidad hepática producida por medicamentos es aquella lesión hepática que se asocia a una disfunción hepática evidente causada por la exposición a un fármaco u otro agente no infeccioso. Esta definición hace distinción entre lesión y disfunción, siendo ésta última cuando se presentan los signos y síntomas de enfermedad hepática, la cual puede llegar a necesitar hospitalización e incluso puede ser mortal.¹⁷

Existen aproximadamente mil compuestos que pueden dañar el hígado, de los cuales el 40 a 50% son medicamentos, siendo éstos los responsables del 25 a 30% de casos de hepatitis fulminante.¹⁶

Aspectos epidemiológicos

La incidencia de toxicidad hepática inducida por medicamentos antituberculosos varía ampliamente según la literatura, y se estima que fluctúa entre 4.3 al 19%. Siendo la incidencia en niños mucho menor (0.8%) Aunque dichos reportes se ven frecuentemente afectados por el subregistro existente de éstos a nivel mundial.

Gulbay *et.al.*, realizó un estudio retrospectivo en el cual describieron los efectos adversos de los medicamentos antituberculosos encontrados en un periodo de 17 años. En el 4.9% de los casos se hallaron alteraciones del perfil hepático, en el 2.4% se halló toxicidad hepática y en el 0.8% de los casos se determinó falla hepática fulminante.¹⁶

La toxicidad hepática inducida por antituberculosos raramente afecta a la población pediátrica, con una incidencia reportada mucho menor (según algunas series del 3-10%) y una incidencia de ictericia marcada, en esta población, casi nula (0.6%). Sin embargo, en un estudio realizado por Tsagaropoulo-Stinga *et. al.*, se halló elevación de la transaminasa glutámico oxalacética (TGO) mayor de 100 U/L en 82% de los casos y hepatitis sintomática con ictericia en 40% de los casos. De igual manera, en un estudio realizado en el sur de India, de 1688 pacientes con meningitis tuberculosa, el 16-39% desarrollaron hepatitis y casi siempre con ictericia.¹⁸

Factores de riesgo

Son importantes factores de riesgo para el desarrollo de toxicidad hepática los siguientes: factores genéticos, edad, raza, género, alcoholismo, desnutrición, obesidad, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), hipoalbuminemia, coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), hepatitis virales B y C.¹⁶

Sin embargo la literatura coincide en que el factor de riesgo más importante es la presencia de polimorfismos genéticos. Se correlaciona el hallazgo de diferentes alelos de la N-acetiltransferasa 2 (NAT2) con mayor riesgo de toxicidad hepática debido a su asociación con la velocidad de acetilación de la isoniazida, siendo los fenotipos de acetiladores lentos quienes poseen mayor riesgo de este efecto adverso.¹⁹

Los acetiladores rápidos eliminan el 90% de la isoniazida como acetilisoniazida, mientras que los acetiladores lentos eliminan solo el 67% y el resto es excretado sin modificaciones por la orina.¹⁹

Los primeros estudios al respecto afirmaban un mayor riesgo de toxicidad hepática para los acetiladores rápidos debido a su mayor producción de acetilisoniazida, sin embargo, posteriormente otros estudios describen que los acetiladores rápidos eliminan más rápidamente dicho metabolito reactivo, mientras que los acetiladores lentos se exponen durante más tiempo a este tóxico. Éstos últimos muestran elevación de las transaminasas más de 3 veces su valor normal más frecuentemente que los

acetiladores rápidos y cuando se reintroduce el fármaco, los acetiladores lentos presentan al menos una elevación de las transaminasas 3 veces su valor normal.²⁰

Recientemente se llevó a cabo un estudio de cohortes, en el cual se enrolaron 254 pacientes con reciente diagnóstico de tuberculosis, a los que se les realizó un cribado genético de la enzima NAT2 mediante PCR y se determinó la asociación de toxicidad hepática inducida por antituberculosos y el fenotipo de ésta enzima encontrado. Hallándose que 27.2% de los pacientes eran acetiladores lentos, mientras que 72.8% eran acetiladores rápidos. Además 25.6% de los pacientes se encontraban coinfectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) Se reportó que el 5.5% de los pacientes desarrolló toxicidad hepática, de los cuales 64.3% eran acetiladores lentos y 35.7%, acetiladores rápidos. Se concluyó también que la coinfección con el VIH es un factor de riesgo para el desarrollo de toxicidad hepática en esta población.¹⁹

Se han estudiado otros polimorfismos como los hallados en la enzima hepática glutatión-S-transferasa (GST), la cual ocupa una posición importante en la fase de detoxificación del metabolismo hepático. Ésta posee dos isoenzimas: glutatión S-transferasa M1 (GST-M1) y glutatión-S-transferasa (GST-M2), cuyos genes son polimórficos. Un metaanálisis determinó que los polimorfismos del GST-M1 incrementan el riesgo de toxicidad hepática inducida por antituberculosos, no hallándose dicha asociación con los polimorfismos genéticos de la isoenzima GST-M2.²¹

Asimismo, la malnutrición ha sido asociada con un riesgo más elevado de injuria hepática. En un estudio retrospectivo de revisión de historias clínicas, de 192 pacientes, 16.1% de ellos desarrolló toxicidad hepática que obligó a la interrupción de la terapia antituberculosa. Reportándose además que la pérdida de 2 kg o más durante los primeros 4 meses de tratamiento resulta un importante factor de riesgo para hepatotoxicidad. Otros factores hallados en dicha investigación fueron la coinfección con el virus de la hepatitis C (VHC), edad mayor de 60 años y tuberculosis multidrogo-resistente.⁸

Otro factor de riesgo es la edad, siendo más frecuente en menores de 5 y mayores de 60 años. Ello concuerda con un estudio realizado en India, donde la incidencia de toxicidad hepática inducida por antituberculosos fue mayor en niños menores de 5 años, en el caso de tuberculosis extrapulmonar y con el uso de pirazinamida. En un estudio en niños de 4.5 años de edad en promedio, tratados con isoniazida y rifampicina, ocurrió la elevación de la aspartato amino transaminasa (AST) en un 82% de los casos y en 40% de los pacientes se observó hepatitis sintomática con ictericia.¹⁸

Los pacientes mayores de 60 años poseen una susceptibilidad mayor a la injuria hepática, lo cual puede deberse a cambios fisiológicos como menor volumen de distribución intravascular (dentro de los órganos y en los músculos). Resultando en un metabolismo hepático deficiente, sobretodo de las drogas que se eliminan a través del sistema enzimático de citocromos. Otro mecanismo propuesto es la pobre ingesta de alimentos, lo

cual produciría bajos niveles de nutrientes necesarios para la detoxificación de las drogas a nivel hepático. ⁸

La coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es también un factor de riesgo importante. Aunque no se conoce el mecanismo fisiopatológico exacto, se propone que podría deberse a la administración simultánea de antirretrovirales. En un estudio realizado en Etiopia, se incluyeron 296 pacientes que iniciaron terapia antituberculosa desde Enero del 2008 a Diciembre del 2011. De éstos, 33 desarrollaron hepatotoxicidad (11.5%) y los factores de riesgo asociados fueron: tuberculosis pulmonar diseminada, Índice de masa corporal (IMC) $<18.5 \text{ kg/m}^2$, recuento de CD4 <50 y estadio 4 de la clasificación WHO. Siendo la tuberculosis pulmonar diseminada y el bajo IMC predictores independientes de hepatotoxicidad en dicha población de estudio. ²²

En un estudio realizado en Brasil, se comparó la incidencia de toxicidad hepática por isoniazida, rifampicina y pirazinamida en pacientes no infectados y coinfectados con VIH. En dicho estudio se enrolaron 30 pacientes VIH positivos y 132 pacientes VIH negativo de un hospital de Brasil durante el periodo 2005 a 2007. Se utilizaron 3 diferentes criterios para definir toxicidad hepática: 1) elevación de alaninaaminotransferasa (ALT) más de 3 veces el valor límite inferior normal, 2) elevación de ALT más de 3 veces el valor límite superior normal y 3) elevación de ALT mas de 3 veces el valor límite superior normal más elevación de 2 veces el límite superior normal de las bilirrubinas totales. Según el primer criterio,

se halló toxicidad hepática en el 77% de los pacientes coinfectados con VIH y 46% en pacientes no coinfectados con VIH. Mientras que según el segundo y tercer criterio de toxicidad hepática, no se hallaron diferencias significativas en la incidencia de ésta en los grupos casos y controles. Por lo que este estudio concluye que la coinfección con el VIH podría no encontrarse asociado a la toxicidad hepática inducida por fármacos antituberculosos, dependiendo de cómo se defina ésta. Además se observó que pequeños cambios en la definición de aquella podría alterar los resultados de manera impresionante.²³

Estudios recientes afirman que la toxicidad hepática inducida por isoniazida aumenta con dosis mayores de 10 mg/kg/d en niños, incluso se observa que en el 7.5% de pacientes, tratados por quimioprofilaxis con isoniazida a dosis de 10 mg/kg/d, existe elevación de las transaminasas.¹⁸

Por último, la combinación de isoniazida con rifampicina potencia el riesgo de toxicidad hepática. Un mecanismo reconocido para ello es la inducción de la isoenzima Citocromo P450 2E1 por parte de la rifampicina, lo cual incrementa la producción de metabolitos reactivos de isoniazida.¹⁴ Otro mecanismo propuesto es el aumento del estrés oxidativo por parte de la acetilhidrazina, lo cual daña la mitocondria, aumentando su permeabilidad y produciendo un incremento de la apoptosis de los hepatocitos.¹⁶

Farmacología de la isoniazida (hidracida de ácido isonicotínico)²⁴

Este fármaco es el único derivado del ácido isonicotínico que se utiliza como quimioterápico antituberculoso. Esta droga es muy poco activa sobre otras bacterias y hongos, por lo que se considera específica para el *Mycobacterium tuberculosis*. Su acción bactericida se ejerce principalmente sobre los bacilos en crecimiento activo, aunque también puede ejercer acción sobre bacterias de crecimiento lento con menor potencia, sobretodo en un ambiente con potencial de hidrogeniones (ph) ácido.

La isoniazida, vía oral, se absorbe completamente en el tracto gastrointestinal y alcanza su concentración plasmática máxima en 1 a 2 horas, con un nivel plasmático medio de 3ug/ml con la dosis de 200 mg, lo cual excede la concentración inhibitoria del bacilo. Una dosis intramuscular posee una absorción más rápida, alcanzando su concentración plasmática máxima en 30-60 minutos. En ambos casos, los niveles descienden a las 24 horas.

La isoniazida no se une a proteínas y posee un volumen de distribución de 0.61/kg en los líquidos extra e intracelular. Esta droga es capaz de ingresar a los tejidos y líquidos del organismo como el líquido pleural, peritoneal y bilis. Puede también traspasar el líquido cefalorraquídeo aún en ausencia de meningitis, y se halla en la leche materna a concentraciones similares al plasma.

Mecanismos de biotransformación hepática

El hígado se encuentra expuesto a grandes cantidades de sustancias exógenas y sus metabolitos; y su cercanía al intestino delgado y a la circulación sistémica le permite maximizar el proceso de absorción de nutrientes y minimizar la exposición del organismo a sustancias tóxicas. La mayoría de las sustancias exógenas son lipofílicas por lo que son capaces de cruzar las membranas celulares de los enterocitos hacia el hepatocito, donde son biotransformados a sustancias más hidrofílicas que pueden ser eliminadas por el riñón o sistema gastrointestinal, a los que llegan unidas a proteínas producidas por el hígado.²⁵

La biotransformación hepática involucra 2 fases. Durante la Fase I se producen las reacciones de oxidación, reducción, hidroxilación y desmetilación, llevadas a cabo por el citocromo P450 (CYP450), el cual es un sistema de enzimas localizado en el retículo endoplásmico que posee cerca de 300 miembros. Esta superfamilia de enzimas se halla principalmente en el tracto gastrointestinal, pero puede encontrarse también en riñones, cerebro y otros tejidos.²⁶

Por su parte, el sistema de oxidación dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), se hallan también en el retículo endoplásmico y son monooxigenasas que contienen flavina que oxidan aminas y compuestos sulfúricos. Es así que durante la primera fase de la biotransformación hepática de los fármacos ocurre principalmente la producción de compuestos

intermediarios tóxicos, los cuales se convierten en menos tóxicos en la fase II.²⁵

En esta segunda fase las sustancias químicas se unen a moléculas hidrofílicas como el glucorónido, sulfato y aminoácidos, con lo que se producen compuestos más hidrofílicos que pueden ser excretados con mayor facilidad. Otra reacción perteneciente a la Fase II es la unión covalente del glutatión a los metabolitos a través de la glutatión-S –transferasa (GST). Es por ello que estas reacciones de la segunda fase son generalmente conocidas como reacciones de detoxificación.²⁵

La actividad de las dichas enzimas puede variar ampliamente dependiendo de factores intrínsecos y extrínsecos. Es así que las variaciones genéticas o polimorfismos en el citocromo P450 pueden alterar la sensibilidad del organismo a la lesión hepática inducida por fármacos. De igual manera, algunas sustancias pueden actuar como inductores de dicho sistema de enzimas (citocromo P450) mientras que otro grupo de sustancias actúan como inhibidores de éste. Aquellas que actúan como inductores, lo hacen aumentando su síntesis, mientras que las segundas bloquean su actividad metabólica. Otros factores importantes son las diferencias en la expresión de dicho sistema enzimático dependientes de la raza, especie y género; lo cual conlleva a diferencias cualitativas y cuantitativas en cuanto a la toxicidad hepática.²⁵

Mecanismos de toxicidad hepática

Los mecanismos de toxicidad hepática pueden ser de dos tipos: intrínsecos e idiosincráticos. Los primeros son reacciones predecibles y dependientes de la dosis, mientras que los segundos son aquellas que pueden ocurrir a cualquier dosis, tienen un periodo de latencia variable, y pueden ser producidas por un metabolito o mediante un mecanismo autoinmune.¹⁶

Las reacciones intrínsecas se observan en una minoría de fármacos, mientras que las idiosincráticas son las que se hallan más frecuentemente y las responsables de hepatotoxicidad por fármacos antituberculosos. Las reacciones de idiosincrasia a su vez pueden dividirse en: metabólica e inmunoalérgica.¹

Los mecanismos fisiopatológicos implicados en las reacciones de idiosincrasia son desconocidos, sin embargo la hipótesis más aceptada es la formación de metabolitos reactivos durante la fase I de biotransformación hepática, en las reacciones controladas por el citocromo P 450 (CYP450), que dañarían las células hepáticas. La producción de estos metabolitos estaría determinada por la presencia de polimorfismos genéticos o la ausencia de alguno de los citocromos.⁷

La formación de un metabolito reactivo a partir de un fármaco inicial puede culminar en tres procesos: necrosis, apoptosis o lesión inmune. Dicho metabolito determina la presencia intracelular de radicales liberados o compuestos electrofílicos que se unen covalentemente

con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Ello lleva a la disminución de los niveles de glutatión intracelular y a la inducción de la peroxidación lipídica de la membrana celular, produciendo a su vez rotura celular y salida de componentes citosólicos al espacio extracelular. Ello finalmente determinaría la muerte celular por apoptosis. Mientras tanto, la unión covalente del metabolito reactivo con ácidos nucleicos lleva a la condensación progresiva de la cromática nuclear, lo cual se ve implicado también en la muerte celular por apoptosis. Asimismo, el exceso de ácidos biliares en el citosol hepático, producto del daño hepático produce una traslocación del Fas (proteína perteneciente a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral alfa), el cual se une covalentemente a su ligando fisiológico (FasL) y conlleva al inicio de la cascada de caspasas que culmina en la muerte celular programada. Dicho mecanismo de muerte podría ser también consecuencia del estrés oxidativo procedente del metabolismo de las toxinas, el cual produce depleción de ATP, oxidación de grupos sulfhidrilo de las proteínas, trastornos de homeostasis iónica y aumento de la concentración celular de Ca^{++} .⁷

Las reacciones de idiosincrasia de tipo inmunoalérgicas ocurren en la minoría de los casos y los mecanismos implicados son la formación de aductos (productos formados por unión directa de dos moléculas, sin que se produzcan cambios estructurales) entre el metabolito reactivo y las proteínas o con la enzima microsomal que ha generado dicho metabolito. Éstos migran, vía vesicular o junto con las moléculas de histocompatibilidad de

membrana, hacia la membrana celular, donde se comportan como neoantígenos y estimulan la respuesta inmune celular y humoral.⁷

Por último, las lesiones hepáticas por mecanismos idiosincráticos pueden también deberse a alteraciones en la fase de detoxificación hepática, la cual tiene como propósito neutralizar metabolitos reactivos. Lo que llevaría a la formación de síndrome de colestásis (inhiben transportadores específicos de la bilis), esteatosis microvesicular, y esteatohepatitis (alteran B oxidación mitocondrial).⁷

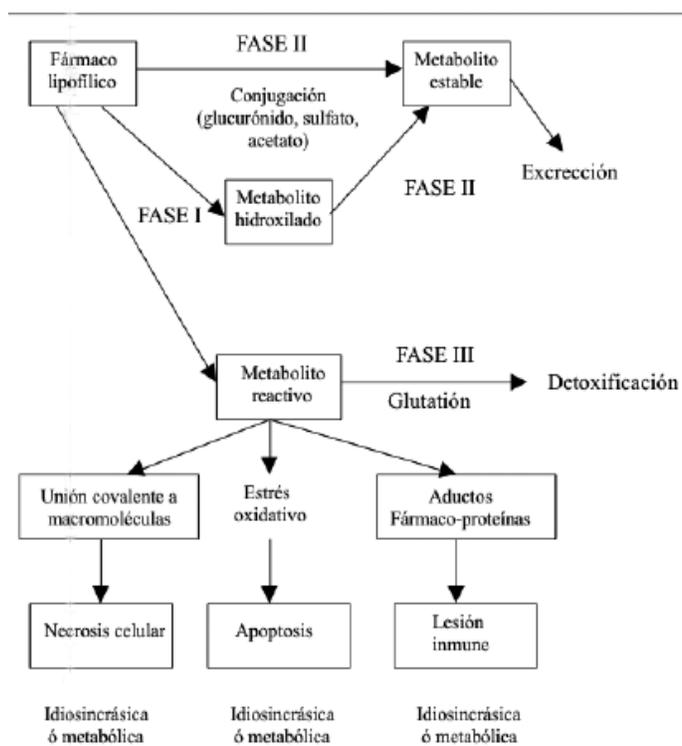


Figura 4. Metabolismo de fármacos en el hígado.
Fuente. Tomado de Tejada C. (2010)⁷

Patrón de daño celular²⁷

Se han reconocido al menos 6 tipos de patrones de daño celular en la toxicidad hepática inducida por fármacos.

El primer mecanismo se lleva a cabo mediante la unión covalente de fármacos a proteínas intracelulares, lo cual produce disfunción celular y resulta en la pérdida de gradiente de iones, disminución de los niveles de adenosina trifosfato (ATP), disrupción de la actina, edema celular y finalmente ruptura celular.

El segundo mecanismo afecta a las proteínas de transporte en las membranas canaliculares, obstruyendo la salida de la bilis y produciendo formas colestásicas de daño hepatocelular.

Un tercer mecanismo incluye la unión del fármaco a enzimas, produciendo así los llamados aductos, los cuales al migrar a la membrana celular inducen la formación de anticuerpos, y así producen una respuesta citolítica directa por parte de los linfocitos T.

Asimismo, algunos fármacos pueden inducir un mecanismo de apoptosis, en conjunto con una respuesta inmune, mediante la vía del factor de necrosis tumoral alfa y las vías Fas, con pérdida de volumen celular y fragmentación de la cromatina nuclear.

El último de los mecanismos hace referencia al daño mitocondrial producido por algunos fármacos, el cual conlleva a la disrupción de la oxidación de los ácidos grasos, e interrupción de la producción de energía. En

éste ocurre la unión del fármaco a enzimas de la cadena respiratoria o al ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial, lo cual resulta en incremento del estrés oxidativo, llevando a un metabolismo anaeróbico con acidosis láctica y acumulación de triglicéridos (microvesículas dentro de las células).

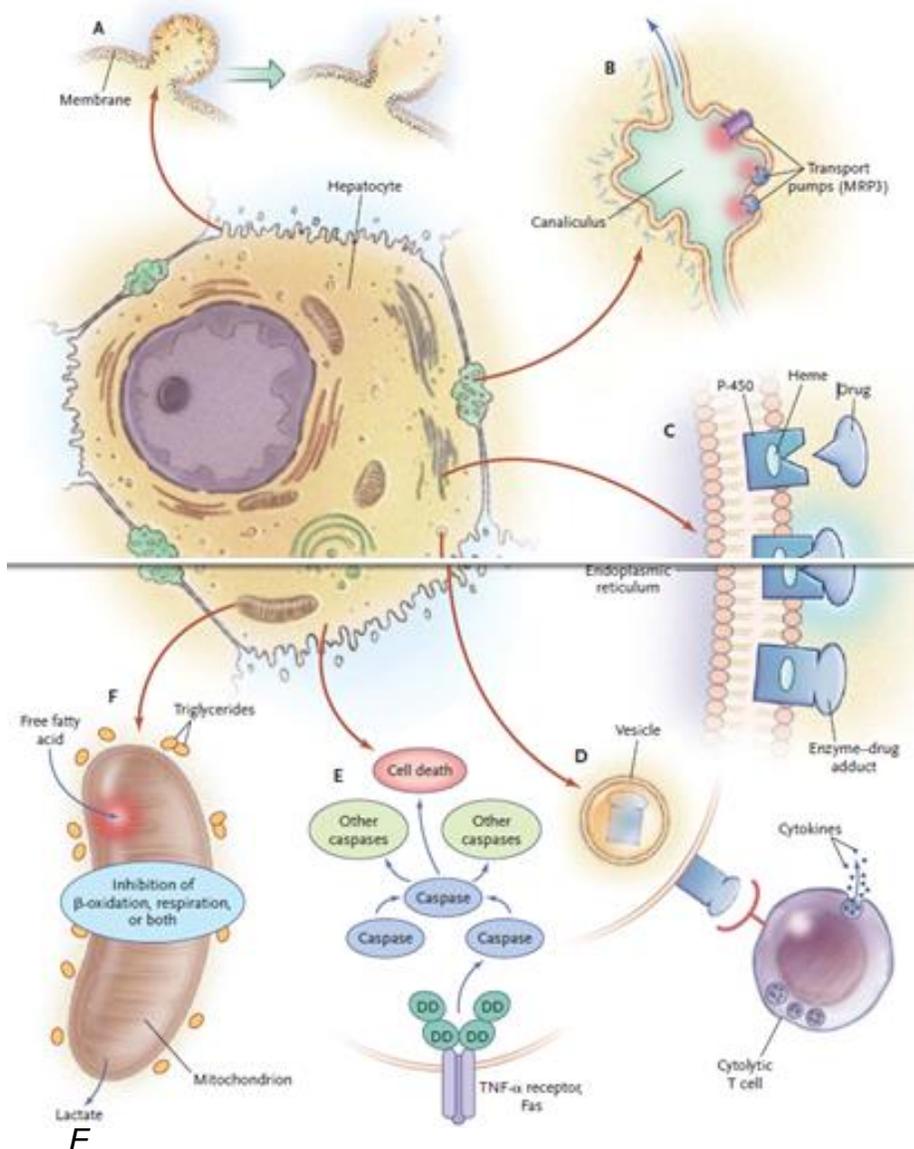


Figura 5. Mecanismos de injuria hepática. Fuente.

Tomado de William ML. (2003).²⁷

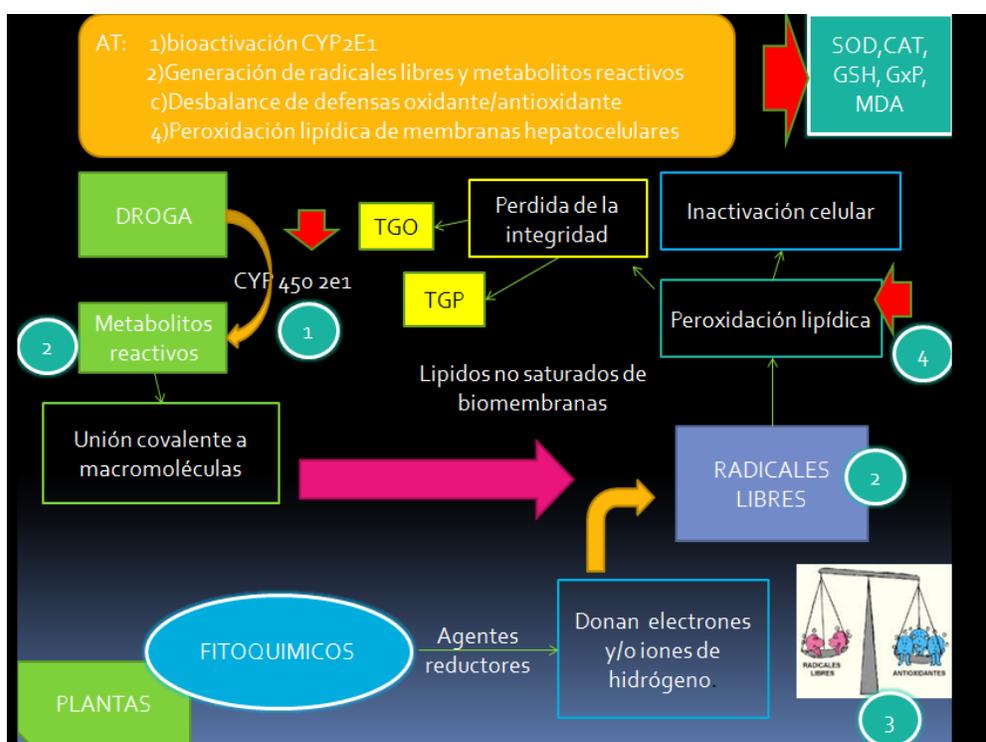
Toxicidad por antituberculosos¹²

Sude E. *et.al* , mediante estudios in vitro e in vivo, ha demostrado que los mecanismos implicados en la toxicidad por antituberculosos son los siguientes:

- a) bioactivación del citocromo P450 2E1 (CYP 2E1)
- B) generación de radicales libres y metabolitos reactivos
- c) desbalance entre las defensas oxidantes y antioxidantes
- d) peroxidación de las membranas lipídicas que origina la pérdida de la integridad hepatocelular y falla hepática.

Al ingresar los antituberculosos al organismos, éstos son biotransformados en el hígado, activando el CYP450, y generando metabolitos reactivos, que si sobrepasan los mecanismos antioxidantes del organismo, llevan a la producción de radicales liberados y a un desbalance entre los oxidantes/antioxidantes, llevando así a la producción de estrés oxidativo. Los radicales liberados producidos, al ser especies químicamente inestables que poseen un electrón no apareado, buscan estabilizarse al retirar

electrones de los lípidos no saturados de la membrana celular, llevando así a la peroxidación lipídica, pérdida de la integridad celular, salida de enzimas hepáticas transaminasa glutámico-oxacélica (TGO)y transaminasa glutámico-pirúvica (TGP) y posteriormente inactivación celular por apoptosis. Ello se muestra en el siguiente e



TGO:transaminasa glutámico oxacélica.TGP:transaminasa glutámico-pirúvica. CAT:catalasa.SOD: superóxido desmutasa.GSH:glutatión. GxP:glutatión peroxidada. MDA: peroxidación lipídica

Figura 6. Mecanismo de toxicidad por antituberculosos. Fuente: Sude E. et al.¹²

Los fitoquímicos son los compuestos activos de las plantas medicinales, éstos actúan como agentes

reductores al ingresar al organismo, donando electrones y/o iones de hidrógeno a los radicales liberados, estabilizándoles y reduciendo su toxicidad. Lo cual disminuye de ésta manera la peroxidación lipídica e inactivación celular. Los fitoquímicos pueden también inactivar el citocromo P450 2E1, disminuyendo así la producción de metabolitos reactivos; y pueden también incrementar los sistemas de defensas antioxidantes.

Toxicidad hepática por isoniazida

El mecanismo de toxicidad hepática inducida por isoniazida es considerado un mecanismo idiosincrático.²²

Se han propuesto diversos mecanismos de toxicidad hepática inducida por este fármaco. Siendo la más aceptada la producción de un metabolito reactivo, la acetilhidrazina que actúa como un agente acetilador y uniéndose covalentemente a macromoléculas, dañando así los hepatocitos.¹⁴

Al ingresar al organismo, la isoniazida es acetilada mediante la enzima N-acetiltransferasa 2 (NAT 2) produciendo acetilhidracina y isonicotínico. Luego la acetilhidracina es hidrolizada a hidracina o acetilada a diacetilhidracina.²⁵ Diversos estudios sugieren que tanto la acetilhidracina como la hidracina son los principales agentes productores de toxicidad hepática debido a que actuarían como agentes acetiladores, uniéndose

covalentemente con macromoléculas y causando daño hepático.²⁸

Durante la producción de hidracina mediante la hidrólisis de la acetilhidracina interviene el complejo enzimático del citocromo P450 2E1 (CYP2E1); por lo que las variaciones tanto genéticas como por factores externos de ésta pueden incrementar el riesgo de toxicidad hepática inducida por isoniazida.²⁹

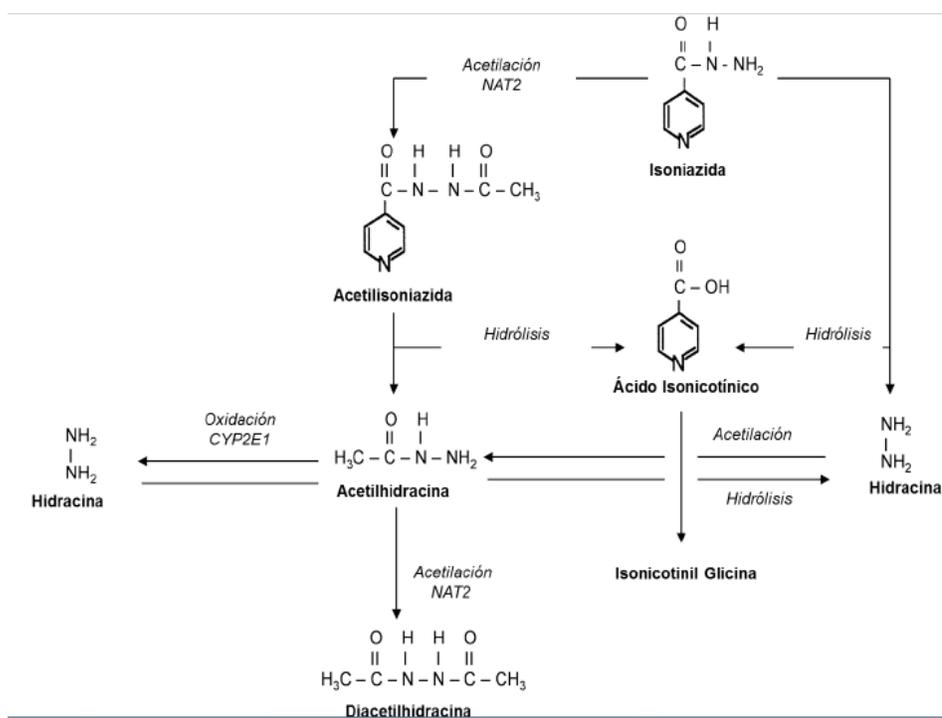


Figura 7. Biotransformación de la isoniazida. Fuente.

Tomado de Enriquez GC.²⁸

La mayoría de estudios afirma que el mecanismo de toxicidad hepática inducida por isoniazida es de tipo metabólico idiosincrático y no autoinmune. Ello se basa

en la aparente ausencia anticuerpos y reacciones clínicas de hipersensibilidad como erupción dérmica y fiebre; en los primeros estudios. Sin embargo, en la investigación realizada por Metushi *et. al.*, se hallaron anticuerpos contra isoniazida en los sueros de 8 de los 19 pacientes analizados. En 11 de ellos se hallaron anticuerpos anti-citocromo P450 2E1; en 14, anticuerpos anti citocromo 3A4 (anti-CYP 3A4) y en 10, anticuerpos anti-citocromo 2C9 (anti-CYP2C9). Lo cual podría indicar un mecanismo autoinmune implicado en la toxicidad hepática inducida por isoniazida.²⁹

Se ha estudiado también el rol de los polimorfismos genéticos en los pasos enzimáticos del metabolismo de la isoniazida y se ha demostrado que en éste juegan un rol importante la n-acetiltransferasa 2 (NAT2), el citocromo 2E1 (CYP2E1) y la glutatión-S-transferasa (GSTM1). Los polimorfismos de éstos podrían llevar a mayor riesgo de producción de hepatotoxicidad.³⁰

Se han descrito tres fenotipos dependientes del polimorfismo hallado de la enzima NAT2, éstos son: acetiladores rápidos, intermedios y lentos. En estos últimos se hallan concentraciones marcadamente disminuidas de dicha enzima y son éstos los que poseen mayor riesgo de toxicidad hepática inducida por isoniazida, aunque aún existe controversia al respecto.³⁰

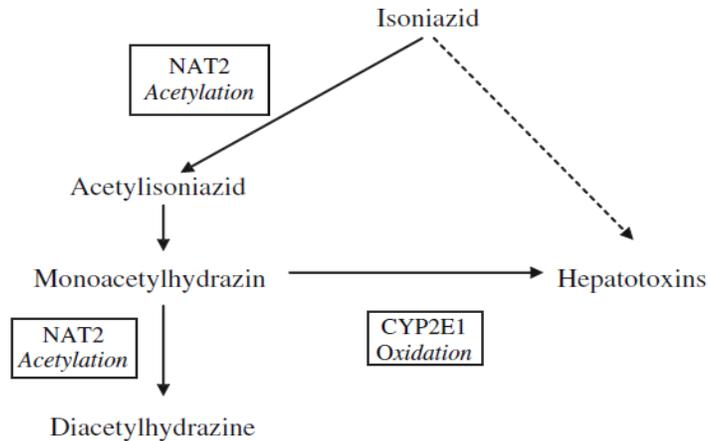


Figura 8. Metabolismo de la isoniazida. Fuente.
Tomado de Vuilleumier *et.al.*(2006).³⁰

Patología

Las lesiones hepáticas pueden presentarse histopatológicamente con diversos patrones como: necrosis local, hepatitis, colestasis, esteatosis, granulomas, lesiones vasculares y enfermedades venooclusivas.²⁵

En el caso de hepatotoxicidad inducida por isoniazida se pueden observar cambios no específicos que simulan a los producidos por hepatitis viral con necrosis zonal. Éstos pueden ser masivos hasta en el 10% de los casos y en el 30% de los casos se observa necrosis hepática subaguda.

20

Diagnóstico

Las manifestaciones clínicas pueden ser muy variadas y encontrarse desde elevaciones leves de las enzimas hepáticas hasta falla hepática fulminante asociado al

tratamiento con fármacos antituberculosos. Éstas van a depender del tipo de célula que se encuentre más dañada. Es así que la lesión de los hepatocitos produce una hepatitis aguda o crónica, esteatosis, hepatitis colestásica, cirrosis, hepatitis granulomatosa o tumores. Mientras que la lesión de los colangiocitos produce colangitis aguda o crónica y mas raramente colangitis esclerosante, y la toxicidad de células endoteliales conlleva a la producción de enfermedad venooclusiva hepática, peliosis hepática, síndrome de Budd-Chiari, o desarrollo de angiosarcoma. Por último, la lesión de células estrelladas (de Ito) puede causar fibrosis hepática.⁷

Las lesiones hepatocelulares se caracterizan por elevación marcada de las enzimas hepáticas, a las que le siguen elevaciones en las bilirrubinas y fosfatasa alcalina. Mientras que las lesiones de tipo colestásico se caracterizan por elevaciones marcadas de la fosfatasa alcalina que son relativamente mayores a la elevación de las enzimas hepáticas y en ocasiones se presentan antes que éstas.

Por su parte, las reacciones de hipersensibilidad se caracterizan por presentarse de manera retardada o frecuentemente luego de varias exposiciones al fármaco y se asocian a la presencia de fiebre, rash y eosinofilia.¹⁷

Los síntomas clásicos de hepatitis como anorexia, náusea, fatiga y la aparición de ictericia son los primeros síntomas de toxicidad hepática asociado a fármacos. Sin embargo, es importante descartar otras causas de lesión hepática como infección por el virus de la hepatitis A, B o menos frecuentemente C, hepatopatía alcohólica, hepatitis

autoinmune, lesión de las vías biliares e incluso problemas hemodinámicos. Para lo cual se deben realizar exámenes complementarios tales como la medición de la inmunoglobulina M para el virus de la hepatitis A, antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, anticuerpo contra VHC, globulinas, anticuerpos antinucleares o anticuerpos anti-musculo liso. Asimismo una historia de alcoholismo crónico y un nivel de aspartato aminotrasferasa (AST) mayor que alanina aminotransferasa (ALT) en un rango de 2:1 conlleva a la sospecha clínica de hepatopatía alcohólica. De igual manera deben descartarse trastornos genéticos y metabólicos como hemocromatosis, en donde se encontraría niveles elevados de ferritina, hierro sérico, saturación de hierro; o enfermedad de Wilson, el cual se sospecha en pacientes jóvenes con niveles bajos de ceruloplasmina. Finalmente de encontrarse niveles bajos de alfa-1 antitripsina se sugeriría la posibilidad de lesión hepática asociada a la deficiencia de esta proteína.

Los síndromes clínicos que más frecuentemente se asocian a toxicidad hepática aguda son la lesión celular aguda y el síndrome colestásico.¹⁷

Lesión hepática aguda: es aquella alteración en la función hepática que se presenta con una evolución menor de 3 meses y se presenta con síntomas de malestar general, dolor abdominal e ictericia asociado a elevación de ALT.¹⁷

1. Lesión hepatocelular: se caracteriza por un incremento aislado de ALT mayor del doble del límite superior normal o por una relación ALT/FA mayor de 5 veces su valor normal.

2. Lesión colestásica: se caracteriza por un incremento aislado de la fosfatasa alcalina mayor de dos veces el límite superior normal o una relación ALT /fosfatasa alcalina menor de 2.

Lesión hepática crónica: se define cuando las anormalidades bioquímicas persisten por más de tres meses. Esto puede ocurrir por una exposición crónica al fármaco o por una secuela de daño agudo. Estas lesiones pueden ser: necroinflamatorias, colestásicas, esteatóticas, por fosfolípidos, fibrosis hepática, cirrosis, lesiones vasculares, granulomatosas o neoplásica.

Silimarina¹

La silimarina es el principio activo del Cardo Mariano, *Silybum marianum*, y es un producto natural con demostrado efecto hepatoprotector. Ésta actúa a nivel de la membrana celular lesionada , estabilizándola , y protegiendo del daño por sustancias nocivas al tejido hepático. Se reporta incluso que posee efecto protector en la intoxicación producida por la seta venosa *Amanita falloides*, donde es capaz de proteger el tejido hepático y prevenir la muerte.

Se sustenta además que la silimarina es capaz de inducir producción hepática de proteínas, con lo que favorece la regeneración hepática y que aumenta 35% los niveles de glutatión en el tejido hepático. Siendo el glutatión un aminoácido necesario para la detoxificación hepática, ya

que neutraliza los radicales liberados y residuos metabólicos.

Los mecanismos de acción de la silimarina son tres 1) modificación de la membrana celular externa del hepatocito para impedir el ingreso de toxinas; 2) estimulación de la síntesis ribosomal de proteínas y 3) capacidad de regeneración hepática mediante el incremento de la actividad de la polimerasa A nucleolar y un efecto antioxidante que disminuye las concentraciones de radicales liberados formados a partir de metabolitos reactivos.

2.2 Formulación de hipótesis

2.2.1 Hipótesis general

Hipótesis alterna (H1): El extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* “Boldo” posee efecto protector en la toxicidad inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra.

Hipótesis nula (H0): El extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* “Boldo” no posee efecto protector en la toxicidad inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra.

CAPITULO III: Diseño metodológico

3.1 Tipo de investigación

Se realizó un estudio experimental completo.

3.2 Población y muestra de estudio

Animales de experimentación

Se utilizaron 24 ratas Holtzman hembra obtenidas de los bioterios del Instituto Nacional de Salud (**Anexo N°1**)

Calculo del tamaño muestral

Para este estudio se halló el tamaño muestral con la siguiente fórmula para comparación de medias:

$$n = \frac{2(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 s^2}{d^2}$$

Figura 9. Fórmula para el cálculo del tamaño muestral.

donde:

n : son los individuos necesarios en cada una de las muestras

$z \alpha$: es el valor z correspondiente al riesgo deseado

$z \beta$: es el valor z correspondiente al riesgo deseado

$2 s$: es la varianza de la variable cuantitativa que tiene el grupo control o de referencia

d : es el valor mínimo de la diferencia que se desea detectar (datos cuantitativos).

Se acepto un riesgo de 0,05 y se desea una potencia estadística del 90 % para detectar diferencias. Y se estimo una diferencia de medias del 19% y una desviación estándar de 10, Con lo que se obtuvo un tamaño muestra del 6 animales por grupo.

Material químico y fitoquímico

Las tabletas de isoniazida (100 mg) fueron obtenidas de la Farmacia Universal. Para la preparación del medicamento a administrar, 1 tableta fue molida en un mortero y diluida en 5 ml de suero fisiológico para obtener una concentración de 20 mg/ml.

La suspensión de silimarina se obtuvo a partir de las cápsulas de gelatina de Milk Thistle de Xtralife-Natural Products (60 cápsulas de 250 mg). Para preparar el medicamento, 2 cápsulas fueron molidas y se diluidas en

12.5 ml de suero fisiológico para obtener una concentración de 40 mg/ml.

Las hojas de Boldo (*Peumus boldus*) se compraron en la casa naturista Martin Rasch y fueron llevadas al Museo de Historia Natural de la UNMSM para su identificación y autenticación (**Anexo N°2**)

Protocolo de experimentación

Los animales fueron colocados en jaulas individuales de acero inoxidable en un bioterio del Instituto de Patología de la UNMSM.

Los animales tuvieron un periodo de aclimatización de 7 días, con ciclos alternados de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, en un ambiente estándar de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) y humedad constantes ($55 \pm 5\%$). Estos rangos fueron mantenidos mediante la utilización de un termostato conectado a un calefactor en el caso de la temperatura y una bola seca en el caso de la humedad relativa. Ambos parámetros fueron controlados utilizando un higrotermómetro electrónico.

Se alimentó a las ratas con 20 gramos de ratina al día (dieta normocalórica y normoproteica adquirida en el Centro de Ventas de la Universidad Agraria La Molina) y agua ad libitum.

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

Antes del experimento, se pesó y obtuvo una muestra arterial por punción cardiaca de cada rata para los análisis basales de enzimas hepáticas (TGO y TGP), bilirrubinas totales y fraccionadas; y proteínas totales y fraccionadas.

Los animales fueron tratados, diariamente por 14 días, de acuerdo al siguiente protocolo:

Cuadro 1. Protocolo de experimentación

GRUPO A (control positivo)	Éste grupo estuvo constituido por 6 ratas a las que se les administró un dosis intraperitoneal diaria de solución salina (1ml/kg). ¹²
GRUPO B (control negativo)	Este grupo estuvo constituido por 6 ratas que recibieron una dosis intraperitoneal diaria de isoniazida (50 mg/kg) ¹²
GRUPO C	Este grupo estuvo constituido por 6 ratas que recibieron 1 dosis diaria de silimarina (200 mg/kg por canulación gástrica y una hora después recibieron una dosis intraperitoneal de isoniazida (50 mg/kg) ¹²
GRUPO D I p r o t	Este grupo estuvo constituido por 6 ratas que recibieron una dosis diaria de 160 mg/kg de extracto acuoso de hojas de Bolso (<i>Peumus boldus</i>) por canulación gástrica y una hora después recibieron 1 dosis intraperitoneal de isoniazida (50 mg/kg) ^{11,12}

El protocolo anterior se llevó a cabo como sigue:

Cuadro 2. Esquema de tratamiento de los grupos experimentales.

Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Solución salina	Solución salina	Silimarina 200 mg/kg	EAB 160 mg/kg
DESPUES DE 1 HORA			
	H(50 mg/kg)	H(50 mg/kg)	H(50 mg/kg)
DESPUES DE UNA HORA: REALIMENTACION			

Al finalizar el experimento, se obtuvo 1 ml de sangre arterial por punción cardiaca para el análisis control de enzimas hepáticas (TGO y TGP) bilirrubinas totales y fraccionadas; y proteínas totales y fraccionadas.

Los animales fueron sacrificados por el método de degollamiento y se obtuvieron los hígados intactos para análisis histopatológico.

Obtención del extracto acuoso de Boldo (ANEXO N°3)

Para la obtención del extracto acuoso de *Peumus Boldus* se siguió el método tradicional de infusión.

Las hojas fueron secadas en una estufa del laboratorio Khert (ODHG-9030A) a 38°C de temperatura por dos días. Luego de lo cual se pesaron 80 gramos de ésta en una balanza electrónica, previamente calibrada. Posteriormente, éstas fueron molidas en un molino de café hasta obtener un polvo fino, el cual se diluyó en 500 cc de agua a 100°C por 30 minutos. De dicha manera, se obtuvo un extracto acuso de Boldo a una concentración de 160 mg/ml.

Obtención de muestra sanguínea y análisis bioquímico (Anexo N°4)

Se obtuvieron muestras basales y finales de sangre arterial de cada rata mediante el método de punción cardíaca para el análisis de las enzimas hepáticas (TGO, TGP), bilirrubinas totales y fraccionadas; y proteínas totales y fraccionadas, al inicio y al final del experimento. Para lo que se contó con la ayuda de un personal experto del Departamento de Fisiología de la UNMSM.

Dicho procedimiento se realizó como sigue:

- 1) Se colocó un pedazo de algodón embebido en éter etílico dentro de un recipiente
- 2) Se introdujo la cabeza del animal para anestesiarlo por unos segundos.

3) Se colocó una jeringa con aguja N°27 en la región precordial y se obtuvo 1 ml de sangre arterial

4) La muestra fue colocada en un tubo seco sin heparina y fueron analizadas utilizando el analizador automático Hitachi 902 y con kits reactivos de la casa comercial Wiener lab.

Análisis histológico

Luego de terminada la experimentación, se sacrificó las ratas y se obtuvieron los hígados intactos, los cuales fueron lavados en suero fisiológico y se realizó el examen macroscópico siguiendo los siguientes parámetros

1) color: cada hígado fue descrito como rojo vinoso, rojo pálido, moteado o moteado con áreas azul violetas.

2) tamaño: se midió el largo y ancho de cada hígado en centímetros.

3) peso: se pesó cada hígado en una balanza electrónica, previamente calibrada.

4) aspecto: se observó el aspecto no congestivo o congestivo de cada hígado.

Se realizaron cortes de 0,5x 1,0 cm de espesor y se coloraron 4 pedazos de cada hígado, en casetes individuales y fueron conservados en formol neutro por 48 horas. Posteriormente, éstos se deshidrataron, embebieron en parafina y se colorearon con Hematoxilina-

eosina (HE) para su estudio histológico. Para esta última fase de dicho proceso se contó con la ayuda de un personal experto en corte y tinción de tejidos del Instituto de Patología de la UNMSM.

Se obtuvo 1 lámina representativa de cada hígado y se observaron 10 campos de cada lámina mediante el microscopio de luz a 400x. Las láminas fueron observadas con ayuda y supervisión de un médico Anatómo Patólogo experto y valoradas utilizando una escala semicuantitativa propuesta por Dalaklioglu *et.al.*, con los siguientes parámetros:³¹

1. Núcleos picnóticos y vacuolización perinucleolar
2. Congestión vascular sinusoidal y dilatación sinusoidal
3. Número de células de Kupffer activadas.

Cada uno de éstos parámetros fue valorado de 0 a 3, como sigue: 0: ausente, 1: leve, 2: moderado y 3: marcado.

3.3 Variables

3.3.1 Definición operacional de variables

Para efectos de este estudio de investigación, el efecto hepatoprotector del extracto acuoso de hojas de Boldo (*Peumus boldus*) fue medido mediante las siguientes variables:

1. Criterios clínicos: se utilizó como criterio clínico la diferencia de pesos de los animales al inicio y al final de la investigación.

2. Criterios bioquímicos: se midieron los niveles de enzimas hepáticas (TGO, TGP), proteínas totales y bilirrubinas totales en muestras arteriales obtenidas al inicio y al final de la investigación.

3. Criterios histopatológicos: los tejidos hepáticos de los animales serán analizados mediante criterios histopatológicos, de la siguiente manera.

1) Macroscopía: se valoraron los parámetros de peso, color, aspecto y tamaño (largo y ancho)

2) Microscopia: se valoraron mediante la utilización de una escala semicuantitativa que posee los parámetros de a) núcleos picnóticos y vacuolización perinuclear, b) congestión vascular en sinusoides y dilatación sinusoidal y c) número de células de Kupffer activadas. Cada uno de estos criterios será valorado en una escala de 1-3, como sigue: 0: ausente, 1: leve, 2: moderado y 3: marcado.²⁹

3.3.2 Operacionalización de variables: **Anexo N°5**

3.3.3 Matriz de consistencia: **Anexo N° 6**

3.4 Procedimientos y análisis de datos

Los resultados se presentan con su media y desviación estándar. Los datos fueron analizados en SPSS versión 19. Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para valorar la significancia de la diferencia de medias de cada variable entre los grupos de experimentación. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

3.5 Consideraciones éticas

Se siguieron los principios y leyes establecidos por el Consejo Internacional de Organizaciones Médicas (CIOM-OMS 1985) para la Investigación Biomédica con Animales.

Los animales fueron cuidados y mantenidos en ambientes higiénicos y con rangos de temperatura y humedad aptos para ellos. Y fueron manipulados con la ayuda y supervisión de un veterinario experto del Departamento de Cirugía Experimental del INSN y un personal experto del Departamento de Fisiología de la UNMSM.

CAPITULO IV:

4.1 Resultados

El estudio se llevó a cabo con 24 ratas hembras de la cepa Holtzman. Se determinó el efecto protector del extracto acuoso de *Peumus boldus* ("Boldo") mediante los parámetros: clínico (variación de peso), bioquímicos (perfil hepático) y morfológicos (macroscopía y microscopía)

Parámetro clínico:

Se determinó la variación en el peso de los animales en los diferentes grupos experimentales. La media de los pesos iniciales del grupo A fue 200 gr +/- 0; del grupo B 170 gr +/- 17,88, del grupo C 163 gr +/-8,16 y del grupo D 173, 33 gr +/- 19,66. Mientras que la media de los pesos finales del grupo A fue de 197,166 +/-1,7 22, del grupo B, de 153,55 +/- 2,7, del grupo C fue de 171, 41 +/- 3, 36 y del grupo D fue de 166,75 +/- 6,16

La media de diferencia de peso en el grupo A fue 2,833 gr +/-1,722, del grupo B 16,41 gr +/- 17,94, del grupo C -0,08 gr +/-19,28 y del grupo D 6,5 gr +/- 19,28. Hallándose diferencia significativa ($p= 0 .012$) en la variación de peso entre los grupos experimentales analizada por la prueba no paramétrica de Kruskal –Wallis

Cuadro 3. Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en el peso de los animales en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas.

(Se muestran los valores en su media y desviación estándar).

PESO (g)*	Grupo A Control (solución salina)	Grupo B H (50)*	Grupo C H(50)+ SIL(200)*	Grupo D H(50)+ EAB(160)*	P valor **
Basal	200 +/- 0	170 +/-17,88	163 +/-8,16	173,33 +/- 19,66	0,008
Final	197,166 +/-1,7 22	153,55 +/- 2,7	171,41 +/- 3,36	166,75 +/- 6,16	0,000
DIF*	2,833 +/-1,722	16,41 +/- 17,94	-0,08 +/-19,28	6,5 +/- 19,28	0,012

*H=isoniazida, SIL=silimarina, EAB=extracto acuoso de boldo, DIF=diferencia, g=gramos

** P valor, se considera significativo $p < 0,05$

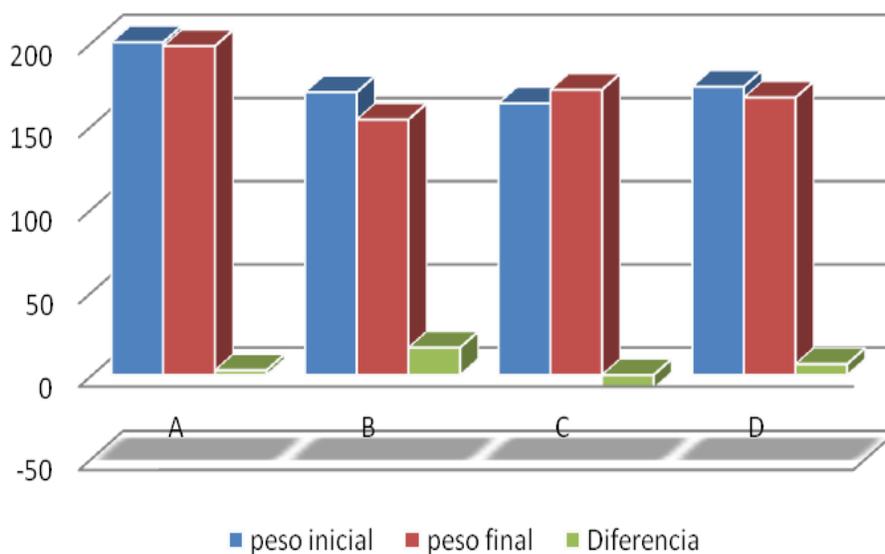


Figura 10. Comparación de promedios de peso basal, final y diferencia de pesos entre los grupos experimentales

Parámetros bioquímicos:

En el análisis bioquímico del perfil hepático, se hallaron las medias y sus desviaciones estándares de las mediciones basales y finales de bilirrubinas totales y fraccionadas, proteínas totales y fraccionadas, TGO y TGP.

Bilirrubinas totales

Las medias de las bilirrubinas totales basales fueron similares en todos los grupos y no se halló diferencia significativa entre ellos (P.Kruskall Wallis, $P=0.058$). Las bilirrubinas totales finales se encontraron más elevadas en el grupo B comparado con los demás grupos y más elevadas en el grupo D que en el C; hallándose diferencia significativa entre los grupos (P.Kruskall Wallis, $p=0.001$). La variación de este marcador fue mayor en el grupo B comparado con los grupos A, C y D; y mayor en el grupo D comparado con el grupo C; hallándose diferencia significativa (P. Kruskall Wallis, $p=0.00$).

Cuadro 4. Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en los niveles séricos de bilirrubina total en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas.

(Se muestran los valores en su media y desviación estándar).

BT* (mg/dl)	A Control (solución salina)	B H** (50)	C H(50)+ SIL(200)**	D H(50)+ EAB (160)**	P valor**
Basal	0.09 +/-00	0.06 +/-0.01	0.07 +/-0.02	0.08 +/-0.02	0.058
Final	0.11 +/- 00	0.31 +/-0.11	0.12 +/-0.02	0.15 +/- 0.05	0.001
DIF*	0.17 +/-0.01	0.25 +/-0.13	0.05 +/-0.02	0.08 +/-0.06	0.000

*BT=bilirrubina total, H=isoniazida, SIL=silimarina, EAB=extracto acuoso de boldo, DIF=diferencia.

**P valor, se considera significativo $p < 0,05$.

Bilirrubina directa

No se halló diferencia significativa en la medición basal de este marcador en los grupos experimentales (P.Kruskall Wallis, $p=0.632$); mientras que la medición final de ésta fue mayor en el grupo B comparado con los grupos A, C y D, siendo los resultados significativos (P. Kruskall Wallis, $P=0.000$). Se halló mayor elevación de las bilirrubinas directas en el grupo B comparado con los grupos A, C y D, hallándose diferencia significativa (P. Kruskall Wallis, $P=0.001$)

Cuadro 5. Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en los niveles séricos de bilirrubina directa en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas.

(Se muestran los valores en su media y desviación estándar).

BD (mg/dl)*	Grupo A Control (solución salina)	Grupo B H(50)*	Grupo C H(50)+ SIL(200)*	Grupo D H(50)+ EAB(160)*	P valor **
Basal	0.02 +/-0.00	0.02 +/-0.02	0.03 +/- 0.04	0.02+/- 0.01	0.632
Final	0.03 +/- 0.01	0.22 +/-0.1	0.05 +/-0.01	0.06+/- 0.02	0.000
Dif*	0.01+/- 0.01	0.2 +/-0.11	0.03 +/-0.04	0.05 +/-0.03	0.001

*BD=bilirrubina directa (en miligramos/decilitro) H=isoniazida, SIL=silimarina, EAB=extracto acuoso de boldo, DIF=diferencia.

** P valor, se considera significativo $p < 0,05$

Bilirrubina indirecta

La medición basal de bilirrubina indirecta fue similar en todos los grupos experimentales. No se halló diferencia significativa en la medición final (P. Kruskall Wallis, $P=0.382$) de este marcador ni en la variación de éste en el basal y final del experimento (P. Kruskall Wallis, $P=0.104$).

Cuadro 6. Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en los niveles séricos de bilirrubina indirecta en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas.

(Se muestran los valores en su media y desviación estándar).

BI (mg/dl)*	Grupo A Control (solución salina)	Grupo B H(50)*	Grupo C H(50)+ SIL(200)*	Grupo D H(50)+ EAB(160)*	P valor **
Basal	0.07 +/-0.00	0.04 +/-0.2	0.06+/- 003	0.06 +/- 0.01	0.039
Final	0.07 +/-0.01	0.08 +/-0.02	0.06+/-0.02	0.1 +/-0.04	0.382
DIF	0.01 +/-0.01	0.05 +/-0.04	0.01+/-0.02	0.03+/-0.04	0.104

*BI=bilirrubina indirecta (en miligramos/decilitro) H=isoniazida, SIL=silimarina, EAB=extracto acuoso de boldo, DIF=diferencia.

** P valor, se considera significativo $p < 0,05$

Proteínas totales

No se halló diferencia significativa en la medición basal de proteínas totales entre los grupos experimentales (P. Kruskal Wallis, $P=1.752$). Mientras que los valores finales de este marcador fueron más elevados entre los grupos C y D, comparado con los grupos A y B, hallándose una diferencia significativa (P. Kruskal Wallis, $P=0.001$). Este marcador se elevó más en los grupos C y D.

Cuadro 7. Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en los niveles séricos de proteínas totales en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas.

(Se muestran los valores en su media y desviación estándar).

PT (g/dl)*	Grupo A Control (solución salina)	Grupo B H(50)*	Grupo C H(50)+ SIL(200)*	Grupo D H(50)+ EAB(160)*	P valor **
Basal	6.49 +/-0.11	6.48 +/-0.44	5.53 +/-2.69	6.57 +/-0.35	1.752
Final	6.73 +/-0.18	6.96 +/-0.25	7.57 +/-0.32	7.54 +/-0.23	0.001
DIF*	0.1 +/-0.05	0.49 +/-0.62	2.06 +/-2.7	0.98 +/-0.19	0.003

*PT=proteínas totales (en gramos/decilitro), H=isoniazida, SIL=silimarina, EAB=extracto acuoso de boldo, DIF=diferencia.

** P valor, se considera significativo $p < 0,05$

Albumina

La medición basal de la albúmina fue similar en todos los grupos al inicio del experimento. Mientras que ésta fue más elevada en los grupos C y D, comparado con los grupos A y B, siendo ello significativo (P. Kruskal Wallis, $P=0.006$).

Este marcador se elevó más en los grupos C y D, comparado con los grupos A y B, siendo estos resultados significativos (P. Kruskal Wallis, $P=0.00$)

Cuadro8. Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en los niveles séricos de albúmina en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas.

(Se muestran los valores en su media y desviación estándar).

ALB (g/dl)	Grupo A Control (solución salina)	B H(50)*	C H(50)+ SIL(200)*	D H(50)+ EAB(160)*	P valor **
Basal	4.07 +/-0.03	4.2 +/-0.09	3.56 +/- 1.7	4.21 +/-0.13	0.182
Final	4.3 +/-0.29	4.53 +/-0.28	4.96 +/-0.17	4.9 +/-0.14	0.006
DIF*	0.76 +/-0.37	0.33 +/-0.35	1.39+/- 1.66	0.69 +/-0.18	0.004

*ALB=albúmina (en gramos/decilitro), H=isoniazida, SIL=silimarina, EAB=extracto acuoso de boldo, DIF=diferencia.

** P valor, se considera significativo $p < 0,05$

Globulina

No se halló diferencia significativa entre los grupos experimentales en la medición basal y final de globulina.

Cuadro 9. Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en los niveles séricos de globulina en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas.

(Se muestran los valores en su media y desviación estándar).

GLOB (g/dl)*	Grupo A Control (solución salina)	Grupo B H(50)*	Grupo C H(50)+ SIL(200)*	Grupo D H(50)+ EAB(160)*	P valor **
Basal	2.41 +/- 0.08	2.33 +/-0.38	2.00 +/-0.98	2.35 +/-0.33	0.407
Final	2.43 +/-0.1	2.53 +/-0.25	2.62 +/-0.18	2.64 +/-0.15	0.094
DIF*	0.02 +/-0.24	0.2+/-0.62	0.62+/-1.03	0.29 +/-0.19	0.144

*GLOB=globulina (en gramos/decilitro), H=isoniazida, SIL=silimarina, EAB=extracto acuoso de boldo, DIF=diferencia.

** P valor, se considera significativo $p < 0,05$

Transaminasa glutámico oxalacética (TGO)

Los valores iniciales de TGO fueron similares en todos los grupos, mientras que los valores finales de ésta fueron más elevados en los grupos B y C, comparados con los grupos D y A, siendo la diferencia significativa (P. Kruskal Wallis, $P=0.04$).

Se halló mayor elevación de esta enzima en el grupo B, comparado con los grupos A, C y D; siendo estos

resultados estadísticamente significativa (P. Kruskall Wallis, P=0.043)

Cuadro10. Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en los niveles séricos de TGO en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas.
(Se muestran los valores en su media y desviación estándar).

TGO (U/L)*	Grupo A Control (solución salina)	Grupo B H(50)*	Grupo C H(50)+ SIL(200)	Grupo D H(50)+ EAB(160)*	P valor **
Basal	142.5 +/-6.12	124.16 +/-14.75	143.66+/-21.21	141.00+/-13.95	0.158
Final	159.67 +/-3.27	176 +/-4.69	176.5 +/-26.64	174.33+/-24.75	0.040
DIF*	17.17 +/-9.39	51.83 +/-18.55	32.83 +/-45.45	33.33+/- 16.18	0.043

*TGO=transaminasa glutámico oxalacética (en unidades internacionales/litro), H=isoniazida, SIL=silimarina, EAB=extracto acuoso de boldo, DIF=diferencia de pesos, g=gramos

** P valor, se considera significativo p<0,05

Transaminasa glutámico pirúvica (TGP)

Los valores iniciales de la enzima TGP fueron similares en todos los grupos, mientras que los valores finales fueron más elevados en el grupo B, comparado con los grupos A, C y D, siendo ellos estadísticamente significativo (P. Kruskall Wallis, P=0.006).

Finalmente, esta enzima se elevó mas en el grupo B comparado con los grupos A, C y D, siendo estos

resultados estadísticamente significativos (P. Kruskal Wallis, P=0.049)

Cuadro 11. Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en los niveles séricos de TGP en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas.

(Se muestran los valores en su media y desviación estándar).

TGP (UI/L) *	Grupo A Control (solución salina)	Grupo B H(50)*	Grupo C H(50)+ SIL(200)*	Grupo D H(50)+ EAB(160)*	P valor **
Basal	39.5+/-1.22	41.66+/- 4.41	42.33 +/-4.22	41.00+/-6.35	0.527
Final	50 +/- 2.45	70.67+/-13.28	56 +/- 11.54	55.83+/-2.56	0.006
DIF*	10.5+/-3.67	29+/-13.72	13.67 +/-13.59	14.83+/-7.66	0.049

*TGP=transaminasa glutámico pirúvica (en unidades internacionales/litro), H=isoniazida, SIL=silimarina, EAB=extracto acuoso de boldo, DIF=diferencia.

** P valor, se considera significativo p<0,05

Macroscopía hepática

1) *Aspecto*

- Grupo A :los hígados mostraron un color rojo vinoso, aspecto normal y sin lesiones aparentes (Figura 11A)
- Grupo B: los hígados mostraron un aspecto moderadamente congestivo y un color rojo pálido con áreas moteadas y algunas azul violetas (Figura 11B).
- Grupo C: los hígados mostraron aspecto similar al normal y un color rojo pálido (Figura 11C)
- Grupo D: los hígados mostraron un aspecto similar al normal y un color rojo pálido con áreas moteadas (Figura N 11D)



Figura 11A

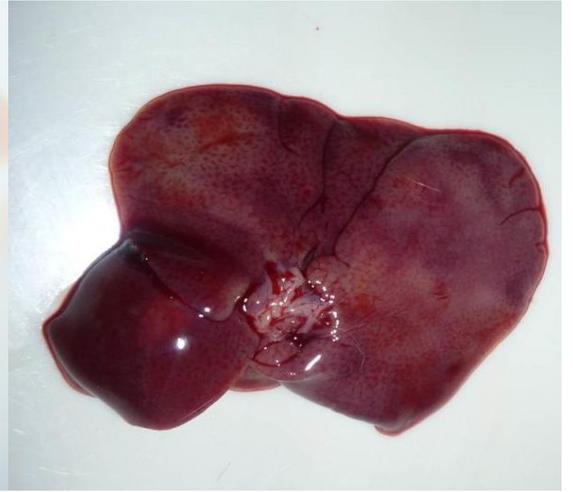


Figura 11B



Figura 11C



Figura 11D

Figura 11. Aspectos macroscópicos de los hígados en los grupos experimentales.

2) *Peso*

En el grupo A la media de peso del hígado fue de 6,38 +/- 0,9, mientras que la media del grupo B fue de 7,6 +/-0,54, del grupo C fue de 5,78 +/- 0,92 y del grupo D fue de 6,1 +/-0,39. Se encontró una diferencia significativa de peso de los hígados en los grupos experimentales (P. Kruskall Wallis, $p= 0,009$)

Cuadro12. Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en el peso de los hígados en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas.

(Se muestran los valores en su media y desviación estándar).

Grupos	A	B	C	D	P
	Control	H(50)*	H(50)+	H(50)+	valor
	(solución		SIL(200)*	EAB(160)*	**
	salina)				
Peso(g)*	6,38+/-0,9,	7,6+/-0,54	5,78+/-0,92	6,1+/-0,39	0,009

*H=isoniazida, SIL=silimarina, EAB=extracto acuoso de boldo, g=gramos.

** P valor, se considera significativo $p<0,05$

3) Largo

Se halló una media de 4,55 +/- 0,15 en el grupo A; de 6,01 +/- 0,17 en el grupo B; de 4,51 +/-0,52 en el grupo C y de 4,26 +/-0,51 en el grupo D. Se halló diferencia significativa del largo de los hígados en los grupos experimentales (P. Kruskall Wallis, p= 0,002)

Cuadro 13. Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en el largo de los hígados en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas.

(Se muestran los valores en su media y desviación estándar).

Grupo	A	B	C	D	P
	Control (solución salina)	H(50)*	H(50)+ SIL(200)*	H(50)+ EAB(160)*	Valor **
Largo (cm)*	4,55+/-0,15	6,01+/-0,17	4,51+/-0,52	4,26+/-0,51	0,002

*H=isoniazida, SIL=silimarina, EAB=extracto acuoso de boldo, cm=centímetros.

** P valor, se considera significativo p<0,05

4) Ancho

Se halló una media de 2,65 +/-0,21 en el grupo A; de 4,66 +/- 0,39 en el grupo B; de 2,51 +/-0,24 en el grupo C y de 2,36 +/-0,2 en el grupo D. e encontró diferencia significativa del ancho de los hígados en los grupos experimentales (P. Kruskall Wallis, p= 0,001)

Cuadro 14. Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en el ancho de los hígados en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas.

(Se muestran los valores en su media y desviación estándar).

Grupos	A	B	C	D	P
	Control (solución salina)	H(50)*	H(50)+ SIL(200)*	H(50)+ EAB(160)*	valor **
Ancho(cm)	2,65+/-0,21	4,66+/-0,39	2,51+/-0,24	2,36+/-0,2	0,001

*H=isoniazida, SIL=silimarina, EAB=extracto acuoso de boldo, cm=centímetros.

** P valor, se considera significativo p<0,05

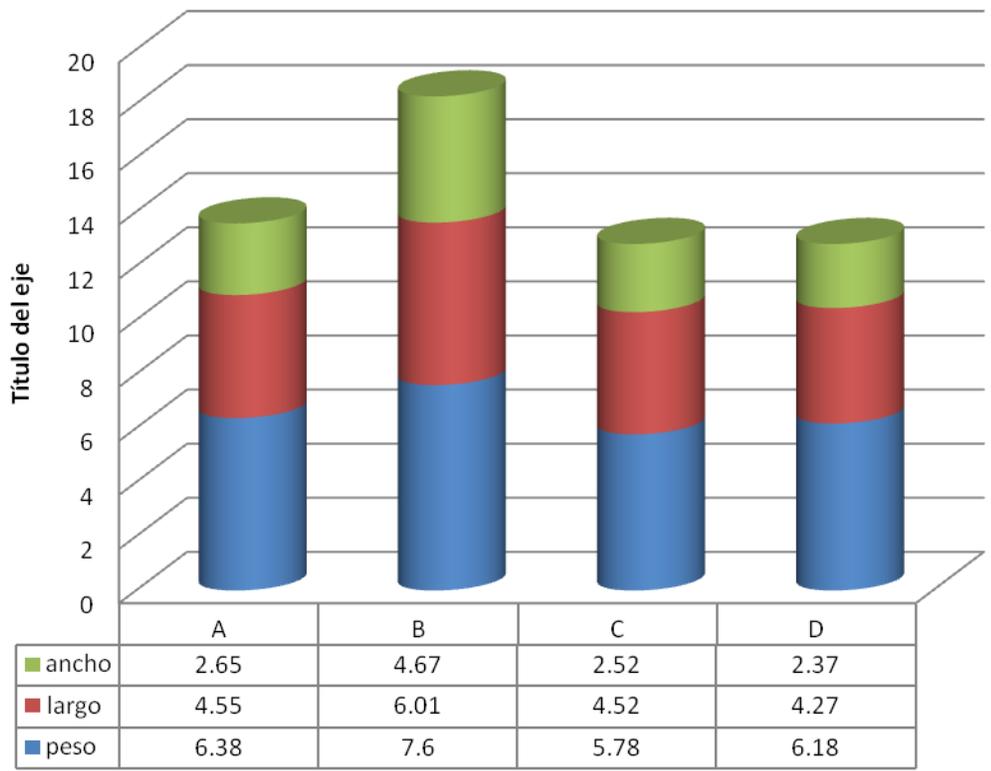


Figura 12. Comparación de los promedios de peso, largo y ancho de los hígados entre los grupos experimentales

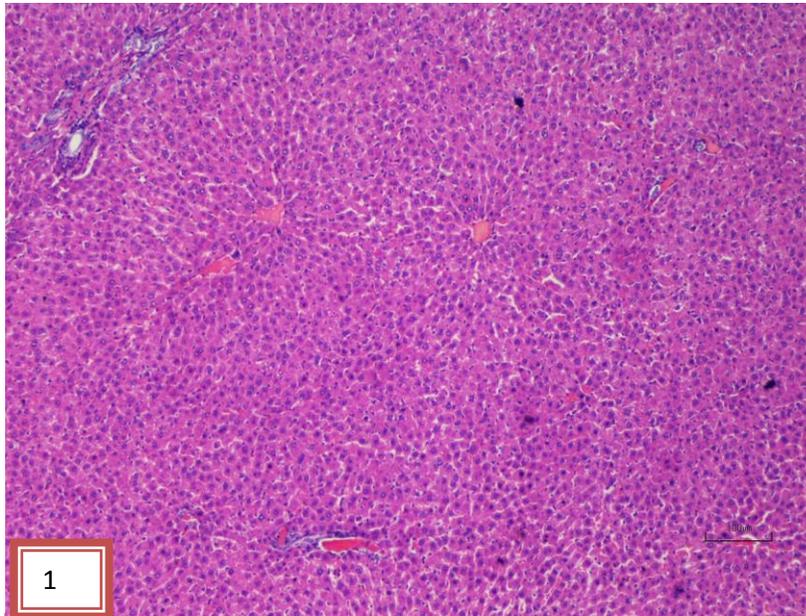
Microscopía

- 1) Grupo A: el tejido hepático presentó arquitectura normal.(Figura 13 A1 -H&E.100X y Figura 13 A2-H&E 400X) y espacio porta normal (Figura 13 A3-H&E.400X)

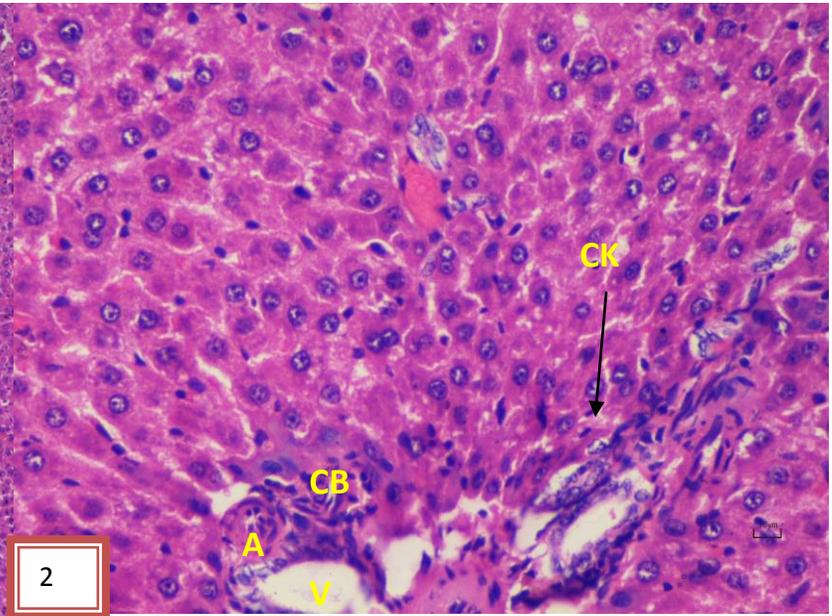
- 2) Grupo B: Se halló marcada vacuolización perilobulillar que altera la arquitectura normal del hepatocito, congestión vascular sinusoidal, dilatación sinusoidal e inflamación centrolobulillar (Figura 13B1-H&E.100X y Figura 13 B2-H&E 400X) y espacio porta con abundantes células de Kupffer activadas.(Figura 13.B3-H&E.400X)

- 3) Grupo C: Se halló moderada congestión vascular sinusoidal, dilatación sinusoidal y conservación de la arquitectura normal hepática. (Figura 13.C1-H&E.400X) y espacio porta normales (Figura 13.C2-H&E.400X).

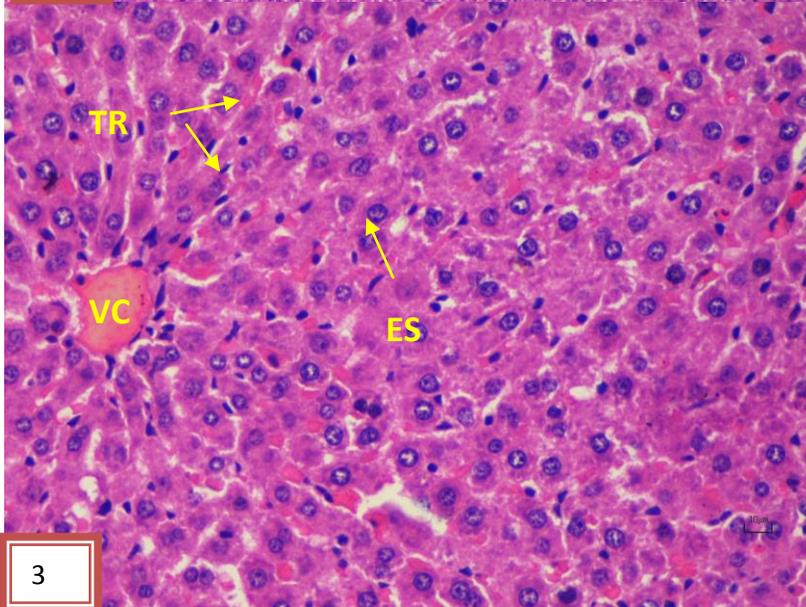
- 4) Grupo D: los hallazgos fueron comparables con los del grupo C y A, encontrándose estructura hepática conservada (Figura 13 D1-H&E.400X) y espacio porta normal (Figura 13.D2-H&E.400X)



1



2

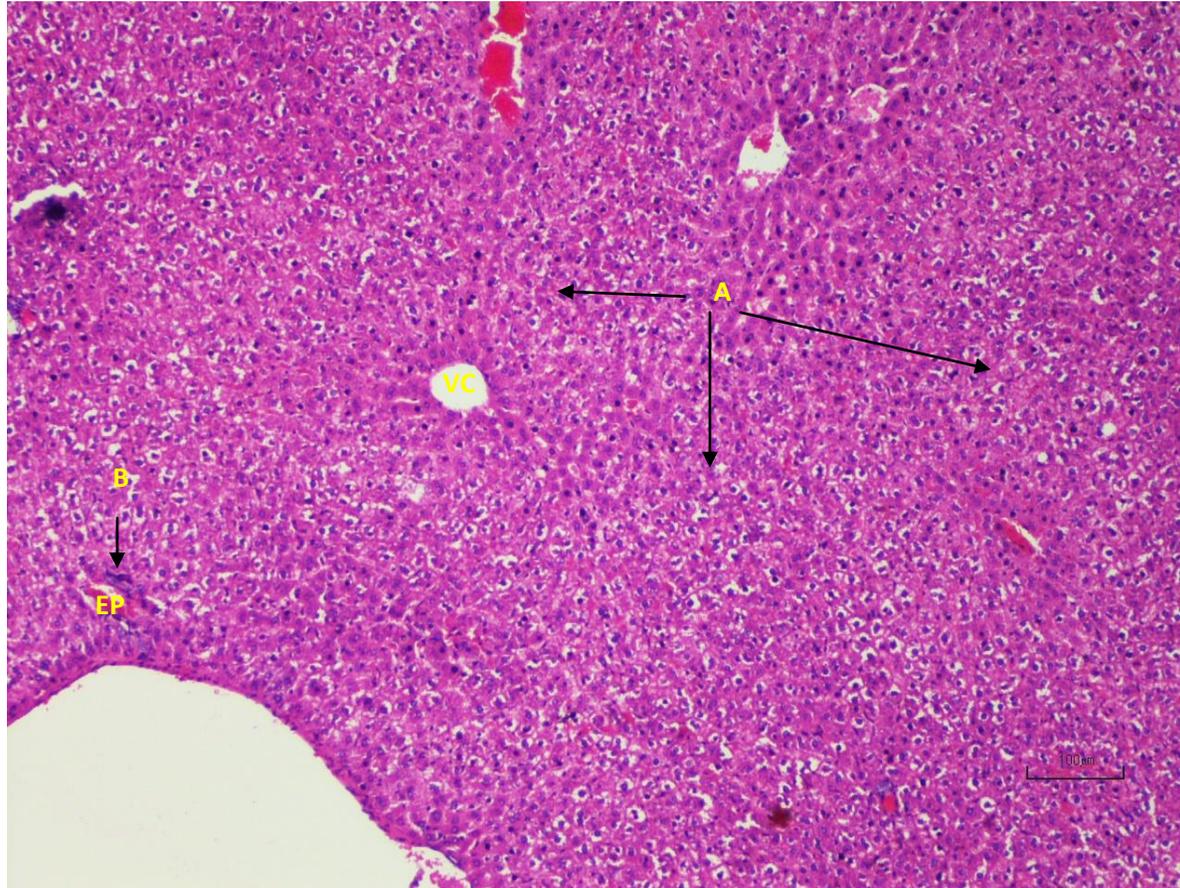


3

Figura 13A-1. Se muestra tejido hepático con parénquima normal de animales control (H&E-100X).

Figura 13 A-2. Se observa espacio porta normal. A: arteria, V: vena, CB: co ducto biliar, células de Kupffer no activadas (CK) (H&E-400X)

Figura 13 A-3. Se observa lobulillo hepático normal con hepatocitos organizados que forman las trabéculas de Remak (TR) y espacio sinusoidal permeable (ES) (H&E-400X)



*Figura 13 B-1.*Parénquima hepático de animales que recibieron isoniazida (Grupo B) que muestra marcada microvacuolización (A) que desorganiza la arquitectura hepatocelular. Y espacio porta (EP) con abundantes células de Kupffer hiperplásicas (B). VC: vena centrolobulillar.(H&E-100X)

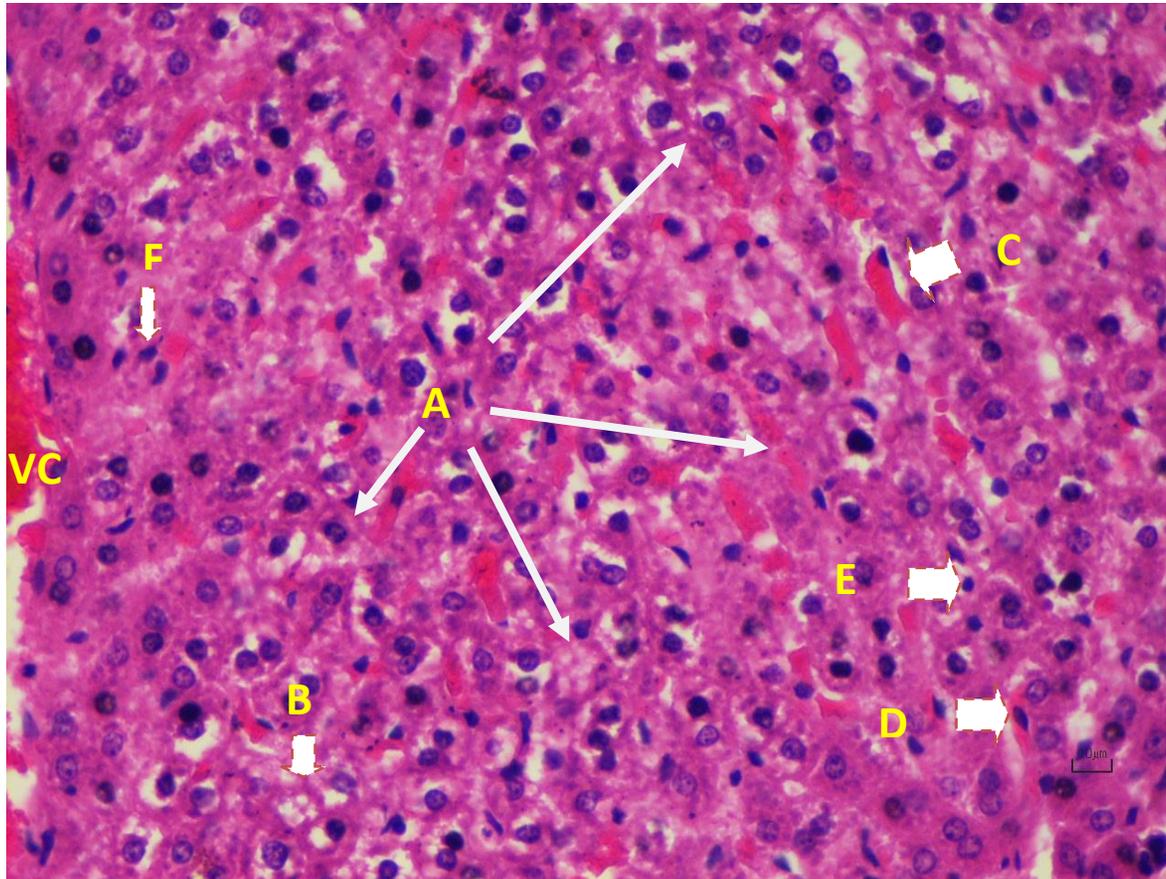


Figura 13B-2. Hepatocitos de ratas tratadas con isoniazida, donde se muestra marcada microvacuolización (A) que llega en algunas zonas a esteatosis (B), moderada congestión sinusoidal (C), núcleo picnótico (C). Hepatocitos apoptóticos (D) y abundantes células de Kupffer activadas (F)

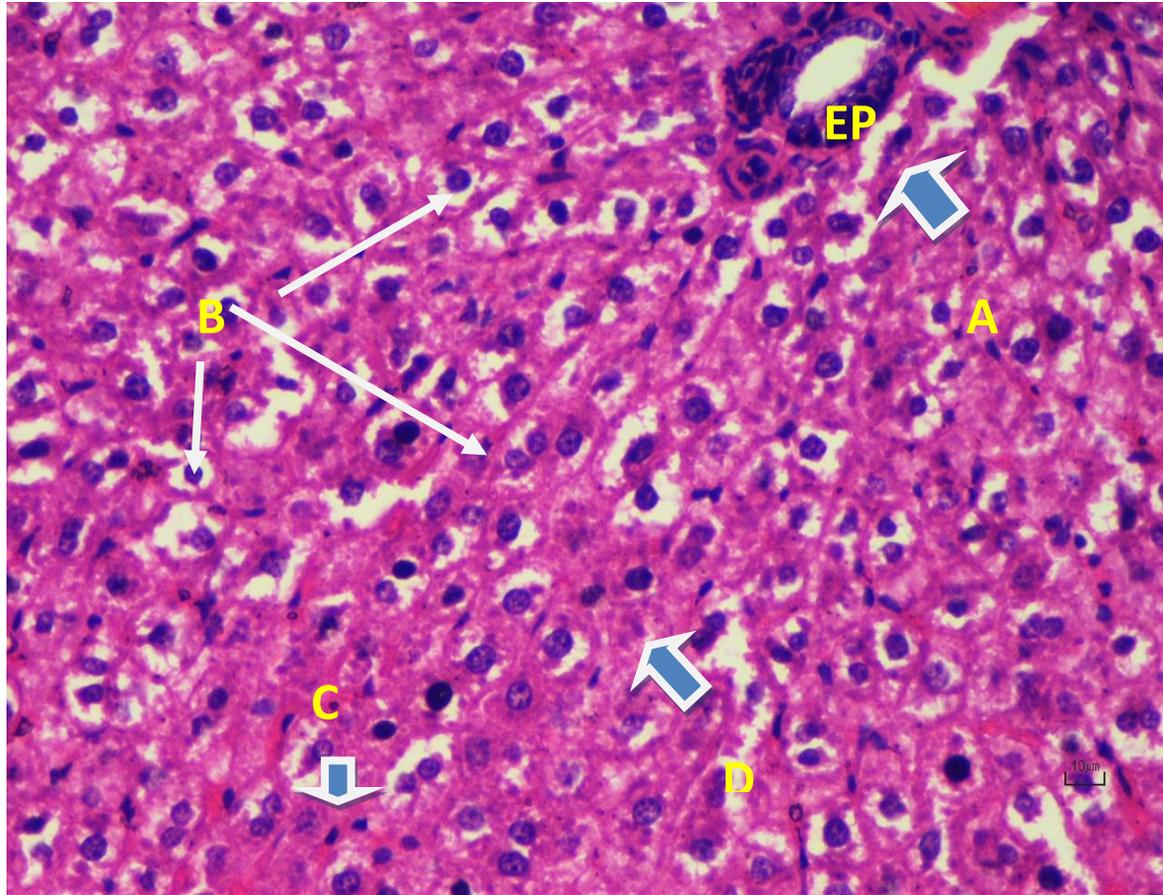


Figura 13 B-3. Corte histológico de animales que recibieron isoniazida, mostrando espacio porta (EP) con abundantes células de Kupffer hiperplásicas(A) y parénquima hepático con marcada microvacuolización (B), Núcleo picnótico (C) y cariorrexis(D).(H&E-400X)

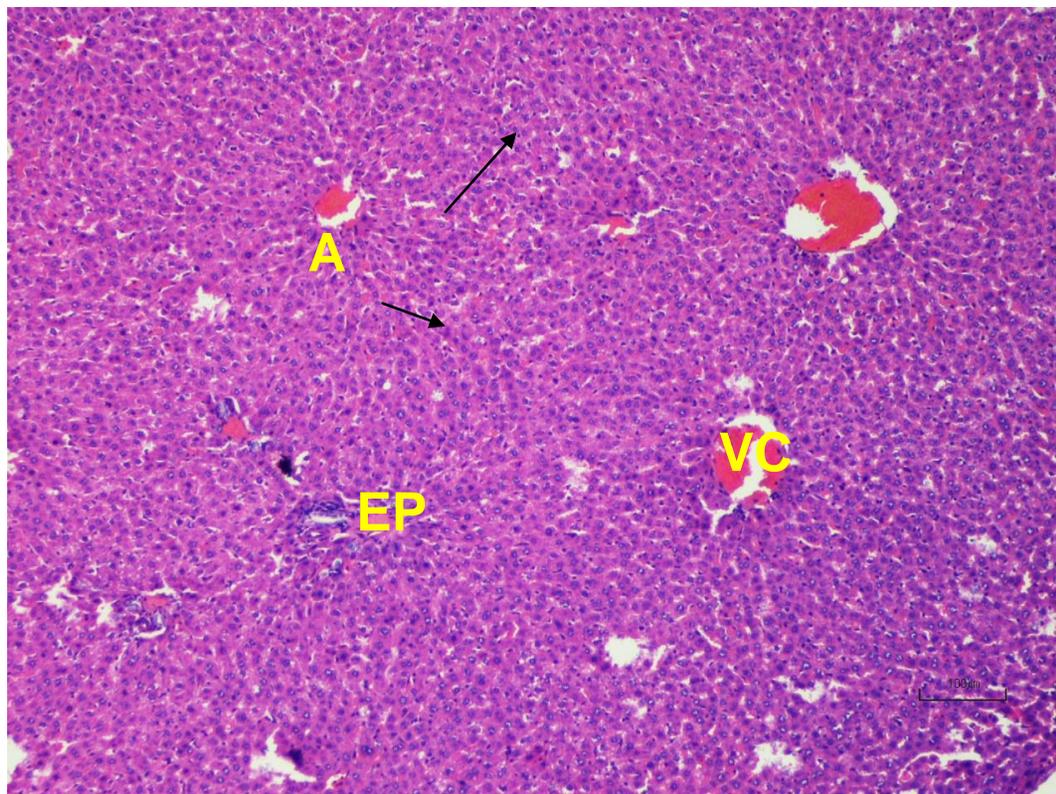


Figura 13 C1-Corte histológico de tejido hepático de ratas que recibieron silimarina (Grupo C). Se observan hepatocitos que conservan su organización en cordones alrededor de la vena centrolobulillar (VC). Espacio porta (EP) normal. Leve congestión sinusoidal (A) (H&E-100X)

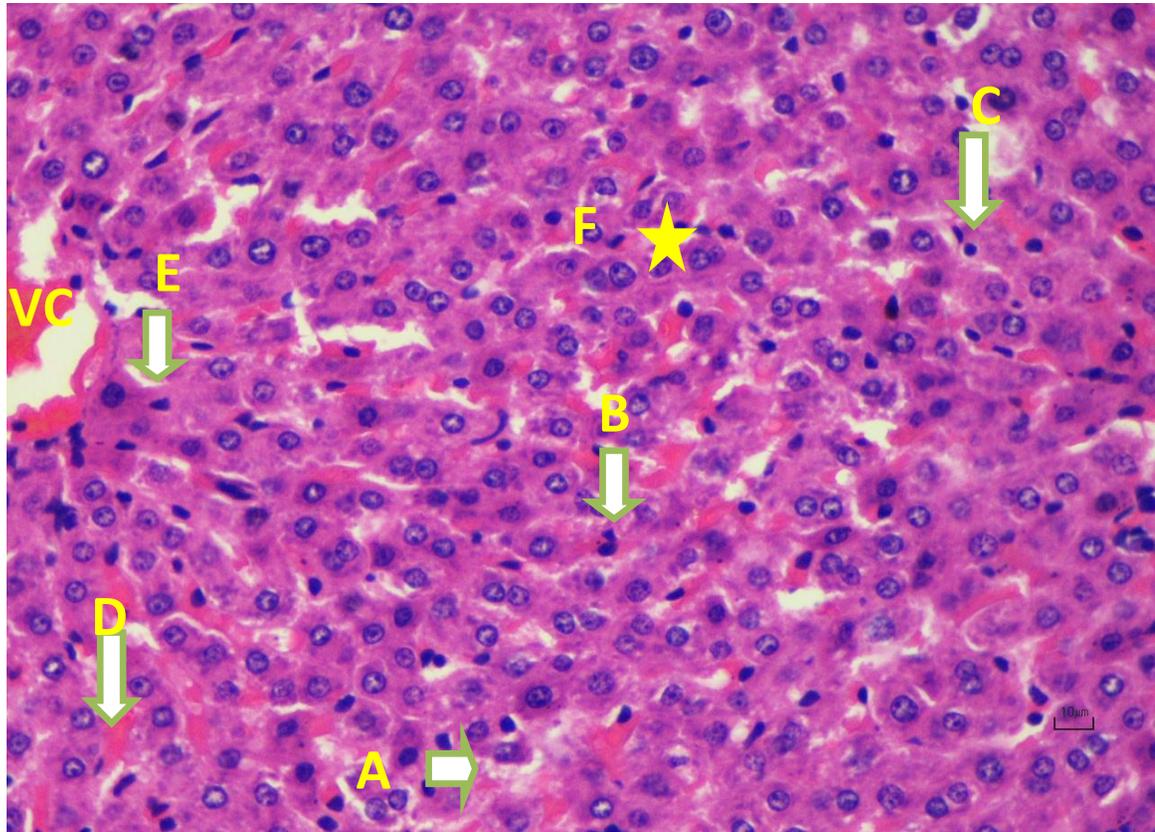


Figura 13 C2-Lobulillo hepatico de animales que recibieron silimarina, donde se muestra hepatocitos ordenados alrededor de la vena centrolobulillar (VC), inicio de microvacuolización (A), algunos núcleos picnóticos (B), nucleos apoptóticos (C), leve congestión sinusoidal (D), algunas células de Kupffer activadas (E) y discreta desorganización hepatocelular (F) (H&E-400X)

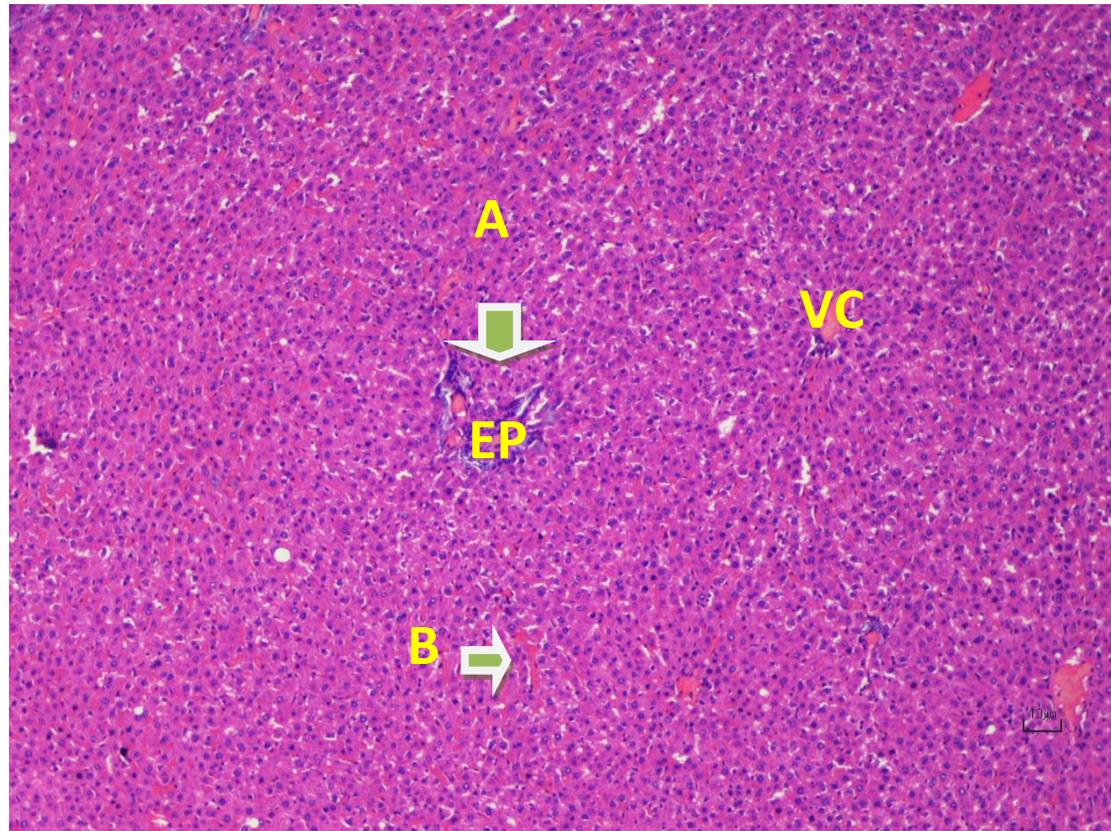


Figura 13 D1-Se muestra lobulillo hepático de animales tratados con EAB. Se observa arquitectura hepatocelular conservada. Espacio porta (EP) normal, con alguna células de Kupffer hiperplásicas(A) y leve congestión sinusoidal (B). VC: vena centrolobulillar (H&E-100X)

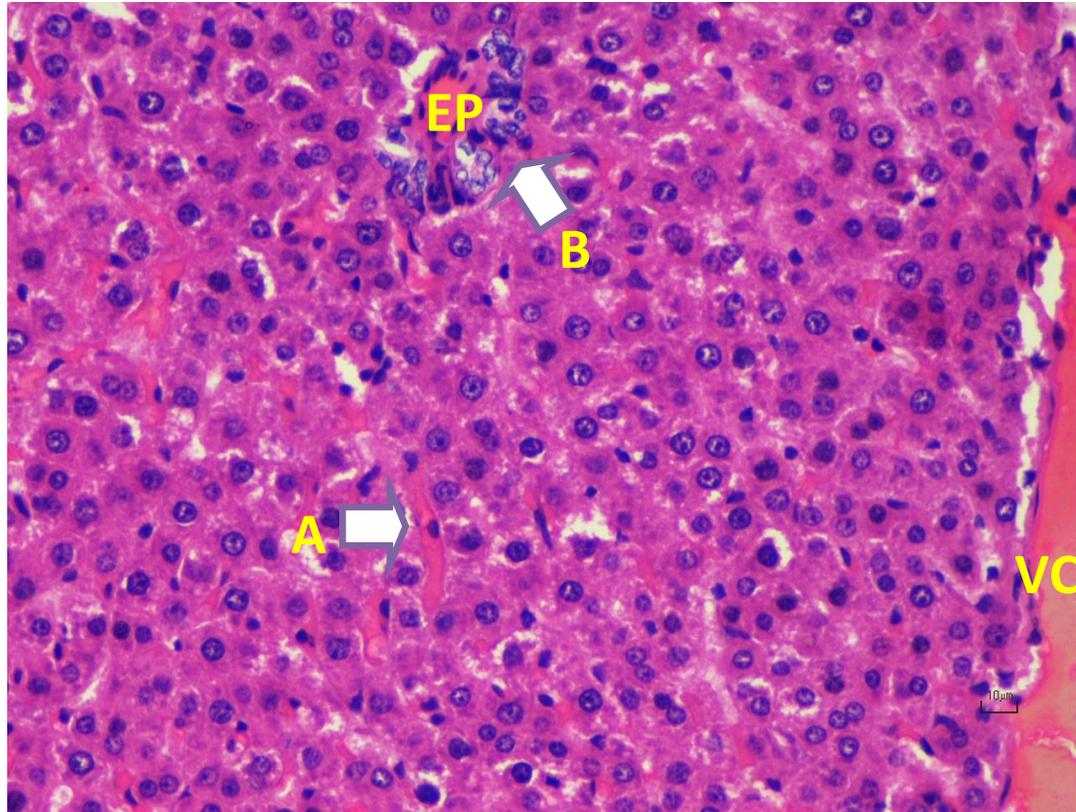


Figura 13 C2-Se observa tejido hepático con estructura conservada, leve congestión sinusoidal(A) y espacio porta (EP) sin alteraciones, con algunas células de Kupffer activadas (B) (H&E-400X)

Luego de asignar un puntaje a cada lámina mediante la utilización de la escala semicuantitativa previamente descrita, se obtuvo una media de 0,33 +/-0,51 para el grupo A; de 5,83 +/- 0,75 para el grupo B; de 2,5 +/-1 ,97 para el grupo C y de 0,83 +/-0,4 para el grupo D.

Se halló diferencia significativa de los cambios histopatológicos en los grupos experimentales (P. Kruskal Wallis, $p= 0,00$)

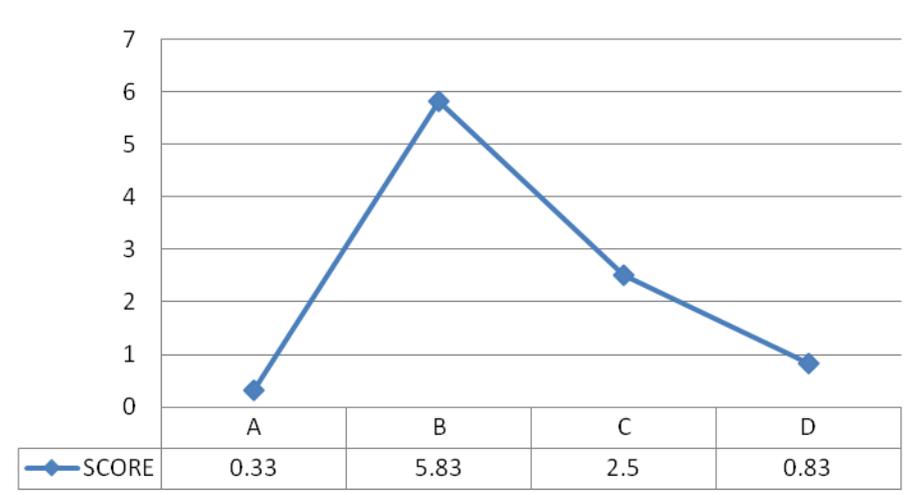


Figura 14. Comparación de cambios histopatológicos entre los grupos experimentales.

Cuadro 15. Características macroscópicas y microscópicas del tejido hepático en los grupos experimentales

GRUPO	A	B	C	D	P valor**
	Control (solución salina)	H(50)*	H(50)+ SIL(200)*	H(50)+ EAB(160)*	
PESO	6,38 +/- 0,9	7,6 +/-0,54	5,78 +/- 0,92	6,1 +/-0,39	0,009
LARGO	4,55 +/- 0,15	6,01 +/- 0,17	4,51 +/-0,52	4,26 +/-0,51	0,002
ANCHO	2,65 +/-0,21	4,66 +/- 0,39	2,51 +/-0,24	2,36 +/-0,2	0,001
ASPECTO	normal	Moderadamente congestivo	Similar al normal	Similar al normal	
COLOR	Rojo vinoso (Figura 11A)	Moteado con áreas azul violetas (Figura 11B).	Rojo pálido (Figura 11C)	Moteado (Figura 11D)	

MICROSCOPIA	Arquitectura normal (Figura 12 A)	Gran vacuolización perinucleolar, congestión vascular sinusoidal, dilatación sinusoidal, inflamación centrolobulillar, núcleos picnóticos y destrucción de la arquitectura celular (Figura 12 B)	Moderada congestión vascular, sinusoidal, dilatación sinusoidal y conservación de la arquitectura normal hepática. (Figura 12 C)	Menor congestión vascular sinusoidal y conservación de la estructura de los lobulillos hepáticos. (Figura 12 D)	
Score	0,33 +/-0,51	5,83 +/- 0,75	2,5 +/-1 ,97	0,83 +/-0,4	0,000

*H=isoniazida, SIL=silimarina, EAB=extracto acuoso de boldo

**P valor, se consideró significativo $p < 0,05$.

4.2 Discusiones

La boldina es el principal compuesto activo identificado en las hojas de *Peumus boldus* y al que se le atribuye sus propiedades antioxidantes. Se ha descrito que la boldina previene el daño celular mediado por vías enzimáticas y no enzimáticas en los organismos vivos. Asimismo, se ha descrito que ésta es capaz de inhibir el daño peroxidativo de la membrana celular iniciado y propagado por la formación de radicales liberados.³ Éstos se encuentran implicados en la toxicidad hepática inducida por isoniazida, debido a que se producen en gran cantidad durante el metabolismo de éste fármaco. Por lo que en teoría, el extracto acuoso de *Peumus boldus* podría disminuir el daño hepático producido por la formación de metabolitos reactivos y radicales liberados a partir de la isoniazida.³²

En esta investigación se buscó determinar el efecto protector del extracto acuoso de *Peumus boldus* en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra.

Para lo que se adquirieron 24 ratas que fueron distribuidas en 4 grupos, aleatoriamente, de la siguiente manera: grupo A (control), grupo B (recibió isoniazida 50 mg/kg), grupo C (recibió una combinación de isoniazida 50 mg/kg y silimarina 200 m/kg), y grupo D

(recibió isoniazida 50 mg/kg y extracto acuoso de boldo 160mg/kg).

El extracto acuoso de boldo fue obtenido en forma de infusión como descrito por Ochoa *et.al*, y se eligió la dosis de 160 mg/kg debido a que en el trabajo realizado por este autor se concluye que esta dosis confiere mayor hepatoprotección comparado con las dosis de 120 mg/kg y 80 mg/kg.¹¹

Asimismo, en este experimento se utilizó un extracto acuoso y no uno alcohólico por el riesgo de éste de producir hepatotoxicidad.¹

Por su parte, se eligió trabajar con ratas debido a que se ha logrado reproducir la hepatotoxicidad inducida por antituberculosos en éstas en estudios anteriores.¹² Sin embargo, Sarich *et.al*. propusieron que los conejos son modelos experimentales que reproducen con alta sensibilidad la injuria hepática inducida por isoniazida. Asimismo, Anwar S *et.al*. propusieron que la utilización de fenobarbital, un inductor enzimático, produce hepatotoxicidad en el 90% de los animales que reciben isoniazida concomitantemente, por lo que recomienda su uso en modelos experimentales.³³

En cuanto a la administración del tratamiento, la isoniazida fue administrada vía intraperitoneal, siguiendo el protocolo establecido por Sude E. *et al*. Sin embargo, Anwar *et.al*. sugiere la administración de ésta por vía oral debido a que de ésta manera se administra en humanos.

De ésta manera, la isoniazida llega al hígado por vía portal, exponiendo de gran manera al tejido hepático. ^{12,33.}

De igual manera, la dosis de isoniazida administrada en los animales de experimentación fue mucho mayor a la que se prescribe generalmente en humanos. Ello es debido a que la isoniazida se metaboliza más rápidamente en ratas que en humanos y debido a que el tiempo de administración en los animales fue mucho menor a la duración de la terapia en humanos. ¹²

En el análisis del parámetro clínico, se observó una pérdida de peso en los grupos A, B y D., siendo ésta mayor en el grupo B. Lo cual podría explicarse por un mayor daño hepático o por un menor apetito en los animales del grupo B. Mientras que el grupo C aumentó en promedio de peso hacia el final del experimento. Se halló diferencia significativa en la variación de pesos entre los grupos experimentales. (P.Kruskall Wallis, $p=0,012$). Esto resultados son similares a los hallados por Veloz D., en cuanto al efecto protector del extracto acuoso de *Peumus boldus* en la toxicidad hepática inducida por paracetamol. En este estudio, los animales que recibieron dicho extracto acuoso de boldo a mayores concentraciones (66% y 100%) tuvieron pesos basales y finales similares al control, mientras que los animales del grupo que recibió solo paracetamol y del que recibió extracto acuoso de boldo a menor concentración (33%) tuvieron una pérdida de peso significativa. Ello se explica mediante un efecto protector del boldo que afecta el

apetito del animal y conlleva a menor pérdida de peso o incluso a un incremento de éste.¹

En el análisis del perfil hepático, se encontró que los parámetros fueron similares al inicio del experimento. Al finalizar el éste, se observó que la bilirrubina total, bilirrubina directa y TGP fueron mayores en el grupo B, en comparación con el grupo A, C y D. Mientras que las proteínas totales y fraccionadas fueron menores en el grupo B, en comparación con los otros grupos.

Asimismo la elevación de bilirrubinas totales, bilirrubina directa, bilirrubina indirecta, TGO y TGP fue mayor en el grupo B en comparación con los demás grupos; y la elevación de proteínas totales y albúmina fue menor en el grupo B en comparación con los grupos C y D. Todo ello se podría explicar por un mayor daño hepático en el grupo B en comparación con los grupos C y D.

Éstos resultados son similares a los hallados por Palanisami N *et.al.*, quien describe que las enzimas TGO y TGP sirven como fiables marcadores de función hepática; siendo la TGP más fiable que la TGO debido a que la TGO puede encontrarse en el hígado, músculo cardíaco, músculo esquelético, riñones, cerebro, páncreas, pulmones, leucocitos y eritrocitos; mientras que la TGP se encuentra presente sólo en el tejido hepático. La elevación de estas enzimas en el suero indica el incremento de la permeabilidad y daño o necrosis celular; por lo que la disminución de la actividad de ésta enzima en el grupo que recibió boldo indicaría que éste posee un efecto protector en la toxicidad hepática inducida por isoniazida.³⁴

Asimismo, Martin *et. al.* describen a las enzimas TGO, TGP y a las bilirrubinas totales como marcadores de injuria hepática en la toxicidad inducida por antituberculosos, debido a que los xenobióticos causarían daño de la membrana celular que provocaría la salida de éstas enzimas a la circulación, lo cual elevaría los niveles de estos marcadores.³⁵

En la macroscopía hepática se observó que los hígados del grupo B tuvieron aspecto congestivo, color rojo pálido con áreas moteadas y áreas azul violetas y su tamaño y peso fueron mayores en comparación con los otros grupos. Mientras que los hígados del grupo A mostraron un aspecto normal y un color rojo vinoso, los del grupo C un aspecto similar al normal y un color rojo pálido; y los del grupo D un aspecto similar al grupo C y un color rojo pálido con áreas moteadas, levemente congestivo. El promedio de peso, largo y ancho de los hígados del grupo B fue mayor en comparación con el grupo A, C y D. Lo cual se podría explicar por una mayor congestión hepática. Asimismo, el peso promedio de los hígados fue mayor en el grupo D en comparación con los grupos A y C; mientras que el promedio de largo y ancho de los tejidos hepáticos fue menor en el grupo D, en comparación con los grupos A y C.

El daño hepático inducido por isoniazida se refleja macroscópicamente en el mayor tamaño y peso de los hígados, lo cual ha sido evidenciado en el trabajo realizado por Ambrose *et.al.*³⁶

La toxicidad hepática inducida por isoniazida se evidencia, generalmente, como degeneración balonada, necrosis focal y mínimos cambios colestásicos; pudiendo encontrarse también degeneración grasa microvesicular y moderada triaditis portal. Ello fue corroborado por el trabajo realizado por Kalra BS *et.al.*³⁷

Asimismo, se describen cambios histopatológicos como: inflamación portal, inflamación celular perivenular (principalmente neutrófilos), necrosis hepatocelular, dilatación sinusoidal, necrosis hepatocelular, vacuolización centrolobulillar y degeneración balonada.³⁸

En este estudio, los cambios histopatológicos hallados fueron: vacuolización perinuclear, congestión vascular sinusoidal, dilatación sinusoidal, núcleos picnóticos, inflamación periportal y células de Kupffer activadas; los cuales fueron mayores en el grupo B, en comparación con los grupos A, C y D. Mientras que el grupo A conservó su estructura lobulillar normal, el grupo C presentó moderada congestión vascular sinusoidal, dilatación sinusoidal y leve vacuolización perinuclear; y el grupo D presentó leve congestión vascular sinusoidal, dilatación sinusoidal y no se halló vacuolización perinuclear. Finalmente, la media del score total asignado a cada grupo experimental fue mayor en el grupo B en comparación con los grupos A, C y D; y mayor en el grupo C que en el grupo D, lo cual se explicaría por mayor cantidad de alteraciones en la morfología hepática.

Estos hallazgos, corroboran el efecto hepatoprotector de la silimarina en este modelo experimental. Ello concuerda con el estudio realizado por Maryam S.etal, donde se demostró que la silimarina antagoniza la toxicidad hepática inducida por isoniazida.³⁹

Mediante el análisis de parámetros descritos anteriormente, se puede explicar que dichos cambios se deben a un efecto protector del Boldo en la toxicidad hepática inducida por isoniazida.

Finalmente, si bien se han atribuido propiedades hepatoprotectoras del *Peumus boldus*, otros estudios han demostrado la presencia de cantidades considerables de Tetrahidroisoquinolonas, el cual es una neurotoxina encontrada en pesticidas y que ha sido implicada en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson. Ello fue evidenciado en el trabajo realizado por Mejía et.al. , donde la administración de 200 mg/kg/día de extracto acuoso de boldo por 21 días a ratas Holtzman hembra produjo disminución de los niveles de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra.¹⁰

CAPITULO V:

5.1 Conclusiones

1. El extracto acuoso de boldo posee efecto protector en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra, según parámetros clínicos, bioquímicos y morfológicos.
2. El extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* posee protección en la toxicidad hepática inducida por isoniazida comparable con el efecto protector de la silimarina.

5.2 Recomendaciones

- 1) Se recomienda realizar estudios acerca de la eficacia y seguridad de la utilización del extracto acuoso de *Peumus boldus* en humanos.
- 2) Se recomienda realizar un análisis completo del perfil hepático con el fin de caracterizar mejor el efecto del extracto acuoso de boldo en la toxicidad hepática inducida por isoniazida.
- 3) Se recomienda la determinación de la oxidación de los tejidos mediante la medición de enzimas como catalasa, superóxido desmutasa y glutatión reducida; con el fin de cuantificar mejor el efecto del extracto acuoso de boldo en la toxicidad hepática inducida por isoniazida.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Veloz D. Determinación de la actividad hepatoprotectora de Boldo (*Peumus boldus*) en ratas (*Rattus norvegicus*) con intoxicación hepática inducida por paracetamol.[Tesis].Riobamba-Ecuador. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.(2013)Disponible en: <http://dspace.esepoch.edu.ec/bitstream/123456789/2474/1/56T00342.pdf>
2. Ríos D., Sandoval D., Pineda A. ,Gómez C. Detection of boldine via HPLC in *Peumus boldus* Molina propagated by in vitro culture. Molecular Medicinal Chemistry. January-April 2010; 21: 113-116. Disponible en:<http://www.idecefyn.com.ar/MMC21PDF/mmcV2124FIN.pdf>
3. Gerhardt D, Horn AP, Gaelzer MM, Frozza RL, Delgado-Cañedo A, Pelegrini AL, Henriques AT, Lenz G, Salbego C. Boldine: a potential new antiproliferative drug against glioma cell lines. Invest New Drugs. 2009 Dec;27(6):517-25. doi: 10.1007/s10637-008-9203-7.
4. OMS. Global Tuberculosis Report. WHO. 2014. Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/global_report/es/
5. ESN-PCT Fuente: Informe Operacional MINSA y Otras Instituciones ESNPCT/DGSP/MINSA/PERÚ. Fecha: 07-Mayo-2013 / AMHE.

6. Shih TY, Young TH, Lee HS, Hsieh CB, Hu OY. Protective effects of kaempferol on isoniazid- and rifampicin-induced hepatotoxicity. The AAPS Journal [2013, 15(3):753-762]. doi: 10.1208/s12248-013-9490-6. <http://europepmc.org/articles/PMC369143>

7. Tejada, C. Hepatotoxicidad por Fármacos. Rev Clin Med Fam 2010, 3(3): 177-191 Oct. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4321/S1699-695X2010000300006>.

8. Warmelink I, ten Hacken NH, Van Der Werf TS, Van Altena R. Weight loss during tuberculosis treatment is an important risk factor for drug-induced hepatotoxicity. Br J Nutr. 2011 Feb; 105(3):400-8. doi: 10.1017/S0007114510003636.

9. Shih TY, Young TH, Lee HS, Hsieh CB, Hu OY. Protective effects of kaempferol on isoniazid- and rifampicin-induced hepatotoxicity. The AAPS Journal [2013, 15(3):753-762]. doi: 10.1208/s12248-013-9490-6. <http://europepmc.org/articles/PMC369143>

10. Mejía DJW, Mendoza QDE, Moreno REL, Gonzales MCA, Remuzgo AF, Morales ILA, et. al. Efecto neurotóxico del extracto acuoso de boldo (Peumus boldus) en un modelo animal. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2014; 31(1):62-8.

11. Ochoa C, et. al. Efecto protector de Peumus Boldus en ratas con toxicidad hepática inducida por paracetamol. CIMEL 2008;13(1):20-25. Disponible en :

http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/cimel/v13_n1/pdf/a05v13n1.pdf

12. Sude E, Fikriye U, Fricket I. Silymarin protects liver against toxic effects of anti-tuberculosis drugs in experimental animals. *Nutr Metab (Lond)*. 2008; 5: 18. doi: 10.1186/1743-7075-5-18
13. Kalra BS, Aggarwal S, Khurana N, Gupta U. Effect of cimetidine on hepatotoxicity induced by isoniazid-rifampicin combination in rabbits. *Indian J Gastroenterol*. 2007 Jan-Feb; 26(1):18-21.
14. Singh M, Sasi P, Gupta VH, Rai G, Amarapurkar DN, Wangikar PP. Protective effect of curcumin, silymarin and N-acetylcysteine on antitubercular drug-induced hepatotoxicity assessed in an in vitro model. *Hum Exp Toxicol*. 2012. Aug;31(8):788-97. doi: 10.1177/0960327111433901.
15. Simirgiotis MJ, Schmeda-Hirschmann G. Direct identification of phenolic constituents in Boldo Folium (*Peumus boldus* Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. January 2010, 1217(4), 22 :443–449. doi:10.1016/j.chroma.2009.11.014
16. Gómez CU. , Agudelo BY, Berrouet MM, Escobar TI. Toxicidad hepática por medicamentos antituberculosos. *Iatreia*. 2008; 21(1):41-48. Disponible en:

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932008000100005&lng=en

17. Navarro VJ, Senior JR. Drug – related Hepatotoxicity. *N Engl J Med* 2006; 354:731-739. DOI: 10.1056/NEJMra052270.

18. Bhatia S, Tullu MS, Kannan S, Gogtay NJ, Thatte UM, Lahiri KR. An unusual recurrence of antitubercular drug induced hepatotoxicity in a child. *J Postgrad Med.* 2011 Apr-Jun; 57(2):147-52. doi: 10.4103/0022-3859.81874.

19. Possuelo LG, Castelan JA, de Brito TC, Ribeiro AW, Cafrune PI, Picon PD, et.al. .Association of slow N-acetyltransferase 2 profile and anti-TB drug-induced hepatotoxicity in patients from southern brazil. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008 Jul; 64(7):673-81. doi: 10.1007/s00228-008-0484-8.

20. Saukkonen JJ, Cohn DL, Jasmer RM, Schenker S, Jereb JA, Nolan CM, et.al. An official ATS statement: Hepatotoxicity of antituberculosis therapy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Oct 15;174(8):935-52. Retrieved from <http://search.proquest.com/docview/199611034?accountid=12268>.

21. Li C, Long J, Hu X, Zhou Y. GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms and risk of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity: An updated meta-analysis. *Eur J*

Clin Microbiol Infect Dis. 2013 Jul;32(7):859-68. doi:
10.1007/s10096-013-1831

22. Hassen AA. , Belachew T, Yami A, Ayen WY. Anti-tuberculosis drug induced hepatotoxicity among TB/HIV co-infected patients at jimma university hospital, ethiopia: Nested case-control study. PLoS One. 2013 May 16;8(5):e64622. doi: 10.1371/journal.pone.0064622

23. Coca NS, Oliveira MS, Voieta I, Antunes CM, Lambertucci JR. Antituberculosos drug-induced hepatotoxicity: A comparison between patients with and without human immunodeficiency virus seropositivity. Rev Soc Bras Med Trop. 2010 Nov-Dec;43 (6):624-8.

24. Litter M. Quimioterapia de la tuberculosis y lepra. Compendio de Farmacología. Quinta edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial El Ateneo.2001. Capitulo 49: 761 -770.

25. Singh A., Bhat T. & Sharma O. Clinical Biochemistry of Hepatotoxicity. Singh, J Clin Toxicol 2011. S4:001. doi:10.4172/2161-0495.S4-001

26. William M L. Drug-induced hepatotoxicity. N Engl J Med 1995; 333:1118-1127. DOI: 10.1056/NEJM199510263331706. Retrieved from <http://search.proquest.com/docview/223977680?accountid=12268>.

27. William M L. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med* 2003; 349:474-485. DOI: 10.1056/NEJMra021844 Retrieved from <http://search.proquest.com/docview/223930215?accountid=12268>.

28. Enriquez CG. “Efecto protector del HGF ante el daño hepático inducido por la isoniazida y rifampicina” [Tesis] México D.F. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. Sección de Patología experimental del Departamento de Patología (2012) Disponible en: <file:///C:/Users/FREE/Desktop/trabajo/43%20trabajo%20de%20experimentacion.pdf>

29. Metushi IG, Sanders C; Acute Liver Study Group, Lee WM, Uetrecht J. Detection of anti-isoniazid and anti-cytochrome P450 antibodies in patients with isoniazid-induced liver failure. *Hepatology*. 2014 Mar; 59(3):1084-93. doi: 10.1002/hep.26564.

30. Vuilleumier N, Rossier MF, Chiappe A, Degoumois F, Dayer P, Mermillod B, Nicod L, Desmeules J, Hochstrasser D. CYP2E1 genotype and isoniazid-induced hepatotoxicity in patients treated for latent tuberculosis. *Eur J Clin Pharmacol*. 2006 Jun;62(6):423-9.

31. Dalaklioglu S, Genc GE, Aksoy NH, Akcit F, Gumuslu S. Resveratrol ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of lipid

peroxidation. *Hum Exp Toxicol.* 2013;32 (6) 662-671. DOI: 10.1177/0960327112468178

32. Tayal V, Kalra BS, Agarwal S, Khurana N, Gupta U. Hepatoprotective effect of tocopherol against isoniazid and rifampicin induced hepatotoxicity in albino rabbits. *Indian J Exp Biol.* 2007 Dec;45(12):1031-6

33. Hassan AS, Ahmed JH, Al-Haroon SS. A study of the effect of *Nigella sativa* (Black seeds) in isoniazid (INH)-induced hepatotoxicity in rabbits. *Indian J Pharmacol.* 2012 Nov-Dec;44(6):678-82. doi: 10.4103/0253-7613.103239.

34. Palanisamy N, Manian S. Protective effects of *Asparagus racemosus* on oxidative damage in isoniazid-induced hepatotoxic rats: an in vivo study. *Toxicol Ind Health.* 2012 Apr;28(3):238-44. doi: 10.1177/0748233711410911.

35. Martin SJ, Baskaran UL, Vedi M, Sabina EP. Attenuation of anti-tuberculosis therapy induced hepatotoxicity by *Spirulina fusiformis*, a candidate food supplement. *Toxicol Mech Methods.* 2014 Dec;24(8):584-92. doi: 10.3109/15376516.2014.956910.

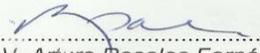
36. Ambrose SS, Solairaj P, Subramoniam A. Effectiveness of ellagic acid on isoniazid-rifampicin induced liver damage in rats. *J Pharmacol Pharmacother.* 2013 Jan-Mar; 4(1): 60–62. doi: 10.4103/0976-500X.107685

37. Kalra BS, Aggarwal S, Khurana N, Gupta U. Effect of cimetidine on hepatotoxicity induced by isoniazid-rifampicin combination in rabbits. *Indian J Gastroenterol.* 2007; Jan-Feb;26(1):18-21.
38. Hassan AS, Ahmed JH, Al-Haroon SS. A study of the effect of *Nigella sativa* (Black seeds) in isoniazid (INH)-induced hepatotoxicity in rabbits. *Indian J Pharmacol.* 2012 Nov-Dec;44(6):678-82. doi: 10.4103/0253-7613.103239.
39. Maryam S, Bhatti ASA, Shahzad AW. Protective effect of Silymarin in Isoniazid Induced Hepatotoxicity in rabbits. *ANNALS.*2010.16(1):43-47. Disponible en: file:///C:/Users/FREE/Downloads/138-499-1-PB.pdf

ANEXOS

- Anexo N°1: Certificado sanitario de los animales de experimentación (Instituto Nacional de Salud)
- Anexo N°2: Certificado de autenticidad de las hojas de *Peumus boldus* (Museo de Historia Natural)
- Anexo N°3: Obtención del extracto acuoso de *Peumus boldus*
- Anexo N°4: Obtención de muestra sanguínea mediante punción cardiaca
- Anexo N°5: Operacionalización de variables
- Anexo N°6: Matriz de consistencia

Anexo N°1: Certificado sanitario de los animales de experimentación
(Instituto Nacional de Salud)

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS COORDINACIÓN DE BIOTERIO			
CERTIFICADO SANITARIO N°		221-2014	
Producto	: Rata Albina	Lote N°	: R - 11 - 2014
Especie	: <u>Rattus norvegicus</u>	Cantidad	: 10
Cepa	: Holtzman	Edad	: 1 mes
Peso	: 80-120 g.	Sexo	: hembras
G.R.	: 030513	Destino	: Olivares Huamán, Jorge Luis
Lima	: 03-11-2014		
El Médico Veterinario, que suscribe, Arturo Rosales Fernández . Coordinador de Bioterio Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias *.			
*Referencia : PR.T-CNPB-153, Procedimiento para el ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para Animales de Experimentación.			
Chorrillos, 03 de Noviembre del 2014 (Fecha de emisión del certificado)			
NOTA : El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.		 M.V. Arturo Rosales Fernández C.M.V.P. 1586	

Anexo N^o2: Certificado de autenticidad de las hojas de
Peumus boldus (Museo de Historia Natural)



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Promoción de la Industria Responsable y del Compromiso Climático"

CONSTANCIA N° 346-USM-2014

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (hojas) recibida de **Elsa YOVERA LEYVA** ha sido estudiada y clasificada como: ***Peumus boldus* Molina** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: MAGNOLIIDAE

ORDEN: LAURALES

FAMILIA: MONIMIACEAE

GENERO: *Peumus*

ESPECIE: *Peumus boldus* Molina

Nombre vulgar: "boldo"
Determinado por Blgo. Severo Baldeon.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 28 de octubre del 2014



Haydee Montoya Terrefos
Dra. Haydee Montoya Terrefos
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

Av. Arenales 1256, Jesús María
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú

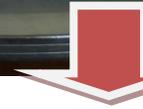
Teléfono: (51) 471-0117, 470-4471,
470-7918, 619-7000 anexo 5703

e-mail: museohn@unmsm.edu.pe
<http://museohn.unmsm.edu.pe>

ANEXO N°3.Obtención de la muestra sanguínea mediante punción cardíaca.



ANEXO N°4. Obtención del extracto acuoso de *Peumus boldus*.



ANEXO N°5 .OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable	Dimensión		Valores finales	Naturaleza de la variable	Escala de medición	Instrumento
Criterios clínicos	Peso inicial		En gramos	Cuantitativa, continua	Razón	
	Peso final		En gramos	Cuantitativa, continua	Razón	
Criterios histopatológicos	Macroscopía	Color	Rojo vinoso Rojo pálido Moteado Moteado con áreas azul violetas	Cualitativa	Nominal	
		Aspecto	Congestivo No congestivo	Cualitativa,	Nominal	
	Tamaño	En centímetros	Cuantitativa, continua	Razón		
	Peso	En gramos	Cuantitativa, continua	Razón		
	Microscopia	Núcleos picnóticos y vaoulización perinuclear	0-3	Cuantitativa, discreta	Razón	Escala semicuantitativa

Criterios bioquímicos		Congestión vascular de sinusoides y dilatación sinusoidal	0-3	Cuantitativa, discreta	Razón	Escala semicuantitativa
		Número de células de Kupffer activadas	0-3	Cuantitativa, discreta	Razón	Escala semicuantitativa
	TGO		U/L	Cuantitativa, continua	Razón	
	TGP		U/L	Cuantitativa, continua	Razón	
	Bilirrubinas totales		Mg/dl	Cuantitativa, continua	Razón	
	Bilirrubina directa		Mg/dl	Cuantitativa, continua	Razón	
	Bilirrubina indirecta		Mg/l	Cuantitativa, continua	Razón	
	Proteínas totales		g/dl	Cuantitativa, continua	Razón	
	Albúmina		g/dl	Cuantitativa, continua	Razón	
	Globulina		g/dl	Cuantitativa, continua	Razón	

ANEXO N°6: MATRIZ DE CONSISTENCIA

Problemas	Objetivos	Hipótesis	Variables e indicadores	Justificación	Metodología
<p>Problema general:</p> <p>¿Tiene efecto protector el extracto acuoso de las hojas de <i>Peumus boldus</i> "Boldo" en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra?</p>	<p>Objetivo general :</p> <p>Determinar el efecto protector del extracto acuoso de las hojas de <i>Peumus boldus</i> "Boldo" en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra</p>	<p>Hipótesis general:</p> <p>El extracto acuoso de <i>Peumus boldus</i> "Boldo" posee efecto protector en la toxicidad inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra.</p>		<p>*La tuberculosis es en la actualidad un grave problema de salud pública.</p> <p>*La isoniazida es una de las principales drogas utilizadas para el tratamiento de la tuberculosis, siendo la principal causa de suspensión del tratamiento, la toxicidad hepática inducida por estos medicamentos.</p>	<p>Tipo de estudio: experimental completo</p> <p>Muestra de estudio: Se utilizaran 24 ratas Holtzman hembra</p> <p>Análisis estadístico: Se utilizara el paquete estadístico SPSS versión 19. se presentaran los resultados en sus medias y desviaciones estándares.</p>
<p>Problema específico 1:</p> <p>¿Tiene efecto protector el extracto acuoso de las hojas de <i>Peumus boldus</i> "Boldo" en la variación del parámetro clínico</p>	<p>Objetivo específico 1:</p> <p>Determinar la variación en el parámetro clínico producida por el efecto protector del extracto acuoso de las hojas de <i>Peumus</i></p>		<p>VD: parámetro clínico</p> <p>VI: hepatotoxicidad inducida por isoniazida</p>	<p>*Este estudio se registrá mediante las leyes y principios bioéticos internacionales para la Investigación con Animales establecido por el Consejo Internacional</p>	<p>Para la comparación de medias entre los grupos experimentales se utilizará la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis</p>

<p>producida por la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra?</p>	<p><i>boldus</i> “Boldo” en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra.</p>	<p>de Organizaciones Medicas (CIOM-OMS 1985). * Existen muy pocos estudios acerca de las propiedades antioxidantes del Boldo y sus posibles efectos benéficos y hepatoprotectores</p>
<p>Problema específico 2: ¿Tiene efecto protector el extracto acuoso de las hojas de <i>Peumus boldus</i> “Boldo” en la alteración de los parámetros bioquímicos producida por la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra</p>	<p>Objetivo específico 2: Determinar la alteración en los parámetros bioquímicos producidos por el efecto protector del extracto acuoso de las hojas de <i>Peumus boldus</i> “Boldo” en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra.</p>	<p>VD: parámetros bioquímicos. VI: hepatotoxicidad inducida por isoniazida * Este estudio servirá para aportar nueva evidencia científica acerca de los efectos del extracto acuoso de Boldo sobre la toxicidad hepática inducida por isoniazida.</p>

<p>Problema específico 3: ¿Tiene efecto protector el extracto acuoso de las hojas de <i>Peumus boldus</i> “Boldo” en los cambios macroscópicos en la morfología hepática producida por la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra</p>	<p>Objetivo específico 3: Determinar los cambios macroscópicos en la morfología hepática producidos por el efecto protector del extracto acuoso de las hojas de <i>Peumus boldus</i> “Boldo” en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra.</p>	<p>VD: cambios macroscópicos en la morfología hepática</p> <p>VI: hepatotoxicidad inducida por isoniazida</p>
<p>Problema específico 4: ¿Tiene efecto protector el extracto acuoso de <i>Peumus boldus</i> “Boldo”</p>	<p>Objetivo específico 4 Determinar los cambios histopatológicos producidos por el efecto protector</p>	<p>VD: criterios histopatológicos de hepatotoxicidad .</p> <p>Vi: hepatotoxicidad inducida por</p>

en los cambios histopatológicos producidos por la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra	del extracto acuoso de las hojas de <i>Peumus boldus</i> "Boldo" en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra.	isoniazida.
---	---	-------------
