

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**Actividad hepatoprotectora de *Ananas comusus* (piña)  
en ratas con toxicidad hepática inducida por isoniacida**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

**AUTOR**

Oliver Alberto REY VIDAL

**ASESOR**

Gloria GORDILLO ROCHA

Lima - Perú

2017

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Mg. Gloria Gordillo Rocha, quien brindó su apoyo constante para el desarrollo de la Tesis.

Al personal docente del Departamento de Bioquímica, quienes me han guiado a través del proceso de la obtención del título profesional.

## **DEDICATORIA**

**A Dios, que está conmigo siempre**

**A mis padres Ysabel y José, a mis hermanos Alexander y Katherine por ser mi apoyo incondicional en los momentos más difíciles de mi vida y motivarme a crecer cada día.**

**A todas las personas que conocí en las aulas universitarias, que con sus consejos, enseñanzas y amistad hicieron de mí una mejor persona.**

## INDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	12
1.1	Objetivo general .....	13
1.2	Objetivos específicos.....	13
1.3	Hipótesis.....	13
II.	GENERALIDADES.....	14
2.1	Antecedentes.....	14
2.2	Marco teórico .....	17
2.2.1	Piña.....	17
2.2.2	Toxicidad hepática.....	21
2.2.3	Epidemiología.....	22
2.2.4	Factores de riesgo.....	23
2.2.5	Farmacología de la isoniacida.....	25
2.2.6	Mecanismos de biotransformación hepática .....	26
2.2.7	Mecanismos de toxicidad hepática (HTX) .....	28
2.2.8	Toxicidad hepática por isoniacida .....	31
2.2.9	Patología .....	35
2.2.10	Diagnóstico .....	39
2.2.11	Silimarina.....	43

III.	PARTE EXPERIMENTAL .....	46
3.1	Tipo de estudio .....	46
3.2	Muestra .....	46
3.3	Conservación de animales de laboratorio.....	47
3.4	Material Farmacológico .....	48
3.5	Materiales en general .....	48
3.6	Procedimientos.....	49
3.6.1	Obtención del Extracto Etanolico .....	49
3.6.2	Determinación de la prueba de solubilidad.....	49
3.6.3	Marcha fitoquímica .....	50
3.6.4	Curva de calibración.....	53
3.7	Obtención del extracto acuoso de piña .....	55
3.8	Determinación de la actividad hepatoprotectora.....	55
3.8.1	Variables y análisis estadístico .....	56
IV.	RESULTADOS .....	58
4.1	Peso de las ratas.....	58
4.2	Pruebas bioquímicas .....	58
4.2.1	Albúmina.....	59
4.2.2	Proteínas totales .....	59
4.2.3	Bilirrubina directa .....	60

4.2.4	Bilirrubina total.....	61
4.2.5	Gamma glutamil transpeptidasa (GGT) .....	61
4.2.6	Aspartatoaminotransferasa (AST).....	62
4.2.7	Alaninoaminotransferasa (ALT).....	62
4.3	Macroscopia hepática.....	63
4.3.1	Aspecto.....	63
4.3.2	Peso .....	64
4.3.3	Largo.....	65
4.3.4	Ancho.....	65
4.4	Microscopia hepática.....	66
4.4.1	Puntaje necroinflamatorio .....	71
V.	DISCUSION.....	72
VI.	CONCLUSIONES .....	78
VII.	RECOMENDACIONES .....	79
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
IX.	ANEXOS.....	89

## INDICE DE IMAGENES

<b>Imagen 1.</b> Fruto y tallo de <i>Ananas comosus</i> .....	18
<b>Imagen 2.</b> Modelo molecular de bromelina.....	20
<b>Imagen 3.</b> Mecanismo de acción de grupo tiol proveniente de cisteína.....	21
<b>Imagen 4.</b> Biotransformación de xenobióticos (Fase I y II).....	28
<b>Imagen 5.</b> Manifestaciones de injuria hepática .....	30
<b>Imagen 6.</b> Formación de metabolitos inerte y tóxicos de isoniacida.....	32
<b>Imagen 7.</b> Formación de hepatotoxinas por isoniacida.....	34
<b>Imagen 8.</b> Manifestaciones de toxicidad hepática.....	38
<b>Imagen 9.</b> Causas y diagnóstico de toxicidad hepática.....	40
<b>Imagen 10.</b> Manifestaciones clínicas de hepatotoxicidad.....	43
<b>Imagen 11.</b> Mecanismos de toxicidad por antituberculosos y la acción de silimarina.....	45
<b>Imagen 12.</b> Flor y semillas de <i>Silybum marianum</i> “Silimarina”.....	46
<b>Imagen 13.</b> Hígados extraídos.....	66
<b>Imágenes 14 y 15.</b> Análisis histológico de hígados del grupo A.....	70
<b>Imágenes 16 y 17.</b> Análisis histológico de hígados del grupo B.....	71
<b>Imágenes 18 y 19.</b> Análisis histológico de hígados del grupo C.....	72
<b>Imágenes 20 y 21.</b> Análisis histológico de hígados del grupo D.....	73

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Disoluciones de BSA.....	51
<b>Tabla 2.</b> Concentración y absorbancias a 540 nm.....	51
<b>Tabla 3:</b> Protocolo de experimentación .....	56
<b>Tabla 4.</b> Esquema de tratamiento de los grupos experimentales.....	58
<b>Tabla 5.</b> Variación de peso en los grupos experimentales.....	60
<b>Tabla 6.</b> Efecto del extracto acuoso de piña en niveles de albúmina sérica de los animales en la toxicidad hepática inducida por isoniacida.....	61
<b>Tabla 7.</b> Efecto del extracto acuoso de piña en niveles de proteínas totales de los animales en la toxicidad hepática inducida por isoniacida.....	62
<b>Tabla 8.</b> Efecto del extracto acuoso de piña en niveles de bilirrubina directa sérica de los animales en la toxicidad hepática inducida por isoniacida.....	62
<b>Tabla 9.</b> Efecto del extracto acuoso de piña en niveles de bilirrubina total sérica de los animales en la toxicidad hepática inducida por isoniacida.....	63
<b>Tabla 10.</b> Efecto del extracto acuoso de piña en niveles de gamma glutamiltranspeptidasa sérica de los animales en la toxicidad hepática inducida por isoniacida .....	64
<b>Tabla 11.</b> Efecto del extracto acuoso de piña en niveles de aspartatoaminotransferasa (AST) sérica de los animales en la toxicidad hepática inducida por isoniacida .....	64
<b>Tabla 12.</b> Efecto del extracto acuoso de piña en niveles de alaninoaminotransferasa (ALT) sérica de los animales en la toxicidad hepática inducida por isoniacida .....	65
<b>Tabla 13.</b> Efecto del extracto acuoso de piña en el peso de los hígados en la toxicidad hepática inducida por isoniacida .....	67
<b>Tabla 14.</b> Efecto del extracto acuoso de piña en el largo de los hígados en la toxicidad hepática inducida por isoniacida .....	67



**Tabla 15.** Efecto del extracto acuoso de piña en el ancho de los hígados en la toxicidad hepática inducida por isoniacida .....68

**Tabla 16.** Puntaje necro inflamatorio..... 74

## **INDICE DE GRAFICOS**

**Gráfico 1.** Comparación de los promedios de peso, largo y ancho de los hígados entre los grupos experimentales .....68

**RESUMEN.** El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto hepatoprotector de *Ananas comosus* (piña) en ratas con intoxicación hepática inducida por isoniácida. Es un estudio transversal experimental. Se empleó una población de 24 ratas Holtzman hembras, separadas aleatoriamente en 4 grupos y administrando por 14 días a cada grupo: A (control dieta y agua), B (isoniácida 50 mg/kg), C (silimarina 200 mg/kg e isoniácida 50 mg/kg) y D (piña 400 mg/kg e isoniácida 50 mg/kg). Se usaron las pruebas no paramétricas de Wilcoxon y Kruskal Wallis. Nuestros resultados demostraron que en el grupo B los niveles de albúmina ( $4.75 \pm 1.37$ ) y proteínas totales ( $2.65 \pm 2.21$ ) se encuentran disminuidos; y los niveles de: bilirrubina total ( $1,94 \pm 0,99$ ), alanino aminotransferasa ( $32,16 \pm 17,51$ ) y aspartato aminotransferasa ( $263,54 \pm 12,5$ ) se encuentran incrementados en comparación con el grupo control (grupo A). No se halló diferencia significativa entre los grupos en cuanto a la variación de bilirrubina directa ( $p = 0.334$ ) y gamma glutamil transpeptidasa ( $p = 0.08$ ). Los hígados del grupo B mostraron un aspecto congestivo, fueron más grandes y pesaron más. Según puntaje necroinflamatorio, el grupo B presentó mayor daño ( $4.17 \pm 1.33$ ) en comparación con los grupos A ( $0.67 \pm 0.82$ ), C ( $3.33 \pm 1.37$ ) y D ( $1.67 \pm 0.52$ ). Se evidenció el efecto hepatoprotector mediante parámetros clínicos, bioquímicos y morfológicos.

**Palabras clave:** piña, bromelina, isoniácida, hepatoprotector

**SUMMARY** The objective of this research was to determinate the protective effect the aqueous extract *Ananas comosus* “piña” on isoniazid-induced liver toxicity in female Holtzman rats. It is a transversal experimental study. In 24 female Holtzman rats were dosed for 14 days and divided randomly, in 4 groups: A (control), B (isoniazid 50 mg/kg), C (silimarina 200 mg/kg and isoniazid 50 mg/kg) y D (pineapple 400 mg/kg and isoniazid 50 mg/kg). Wilcoxon and Kruskall Wallis tests were used. The results of group B show that albumin ( $4.75 \pm 1.37$ ) and total proteins ( $2.65 \pm 2.21$ ) were diminished; and increased levels of total bilirubin ( $1.94 \pm 0.99$ ), alanine aminotransferase ( $32, 16 \pm 17,51$ ) and aspartate aminotransferase ( $263,54 \pm 12,5$ ) compared with group A as well. No significant difference was found in direct bilirubin ( $p = 0.334$ ) and gamma-glutamyl transpeptidase ( $p = 0.08$ ). Livers of group B were more congestive, bigger and heavier than the other groups. According to necroinflammatory effect, group B showed to be more damaged ( $4.17 \pm 1.33$ ) than groups A ( $0.67 \pm 0.82$ ), C ( $3.33 \pm 1.37$ ) and D ( $1.67 \pm 0.52$ ). The protective effect was evidenced by clinical, biochemical and morphological parameters.

**Keywords:** Pineapple, bromelain, isoniazid, liver protector

## I. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó en el 2015, 9 millones de casos nuevos de tuberculosis y 1,8 millones de defunciones debido a esta causa. Siendo más prevalente en países en vía de desarrollo<sup>1</sup>. La isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol, constituyen los medicamentos de primera línea contra *Mycobacterium tuberculosis*<sup>2</sup> ya que son altamente eficaces en pacientes nuevos. La terapia antituberculosa requiere, debido a las características especiales del patógeno, de la combinación y el uso prolongado de diversos fármacos potencialmente hepatotóxicos como la isoniacida. Siendo la incidencia de toxicidad hepática inducida por éstos fármacos variable. Sin embargo, durante su biotransformación hepática, ésta puede formar metabolitos reactivos que dañan los hepatocitos mediante el incremento de estrés oxidativo, principalmente la isoniacida. Esto puede conllevar a la suspensión de la terapia y aparición de cepas más resistentes, conocidas como TB-MDR (tuberculosis multidrogorresistente)

La toxicidad hepática es el efecto adverso más preocupante del tratamiento antituberculoso. Puede deberse a toxicidad directa o a mecanismos de hipersensibilidad<sup>3</sup>.

Se ha demostrado que el estrés oxidativo es el principal mecanismo que genera daño hepático, por lo que los productos naturales, como la *Ananas comosus*, podrían disminuir debido a sus propiedades hepatoprotectora. El fruto contiene azúcares totales, flavonoides, polifenoles totales, carotenoides, vitaminas B1 y B2, C, calcio, hierro, potasio y un conjunto de proteasas que son: ananaína, comosaina, bromelina, siendo esta última las más estudiada como antiinflamatorio, antitrombótico, anti-tumoral e inmunomodulador.

### 1.1 Objetivo general

- Determinar el efecto hepatoprotector de *Ananas comosus* (piña) en ratas con intoxicación hepática inducida por isoniacida

### 1.2 Objetivos específicos

- Determinar la variación en los parámetros bioquímicos producidos por el efecto hepatoprotector del extracto acuoso de *Ananas comosus* “piña”, en toxicidad hepática inducida por isoniacida en ratas.
- Determinar los cambios macroscópicos en la morfología hepática producidos por el efecto hepatoprotector del extracto acuoso de *Ananas comosus* “piña”, en la toxicidad hepática inducida por isoniacida en ratas.
- Determinar los cambios histopatológicos producidos por el efecto hepatoprotector del extracto acuoso de *Ananas comosus* “piña”, en la toxicidad hepática inducida por isoniacida en ratas.

### 1.3 Hipótesis

- Hipótesis alterna (H1): El extracto acuoso de *Ananas comosus* “piña” posee efecto hepatoprotector en la toxicidad inducida por isoniacida en ratas albinas hembras de cepa Holtzman.
- Hipótesis nula (H0): El extracto acuoso de *Ananas comosus* “piña” no posee efecto hepatoprotector en la toxicidad inducida por isoniacida en ratas albinas hembras de cepa Holtzman

## II. GENERALIDADES

### 2.1 Antecedentes

La hepatotoxicidad, efecto secundario más frecuente de la isoniacida, tiene cronología propia. Suele ocurrir en los primeros meses de tratamiento según una revisión reciente. La hepatotoxicidad ocurre generalmente dentro de semanas a meses en lugar de los días a semanas de inicio que se ven con reacciones de hipersensibilidad. A diferencia de una reacción de hipersensibilidad clásica, la reexposición de isoniazida no siempre provoca una recurrencia rápida de la hepatotoxicidad. Aproximadamente el 60% de la incidencia de hepatotoxicidad en el estudio USPHS ocurrió en los primeros 3 meses de tratamiento, y el 80% de la incidencia ocurrió en los primeros 6 meses. Una revisión retrospectiva de la mortalidad encontró que el intervalo mediano desde el inicio del tratamiento hasta el inicio de los síntomas fue de 16 semanas.<sup>4</sup>

Según el estudio de Page et al. (2006) El porcentaje de pacientes con hepatotoxicidad clínicamente reconocida fue significativamente mayor en el grupo de tratamiento de 9 meses con isoniacida que en el grupo de tratamiento de 4 meses con rifampicina.

La edad media de los pacientes que presentaron hepatotoxicidad fue de 39,7 años (mediana de edad, 44 años, rango de edad, 16-66 años). Nueve (69%) De 13 pacientes eran mujeres; 7 (54%) de los 13 pacientes eran hispanos; y ningún paciente había documentado la infección por el VIH.<sup>5</sup>

El extracto de piña contiene diversos componentes antioxidantes, destacándose entre ellas la bromelina, una enzima que ha sido estudiada por sus diversas propiedades. Estudios clínicos demuestran que la enzima es un agente antiinflamatorio en artritis reumatoide, daños en tejido blando, inflamación de colon, dolor crónico y asma. El principal mecanismo estudiado in vitro demuestra que inhibe producción de citoquinas IL-4 y en

menor grado citoquinas IL-2 e interferón gamma (IFN-), por modulación de la quinasa 2 reguladora extracelular (ERK-2). También ha demostrado reducir los receptores de superficie como el receptor hialuronato CD44, asociado con la migración de leucocitos e inducción de mediadores proinflamatorios.<sup>3</sup>

Tochi et al. (2008) estudiaron el efecto de la bromelina en dolor atípico de rodilla, reportó mejora significativa luego de un mes. Los resultados son consistentes cuando hay una dosificación temprana de bromelina. Además reportaron la eficacia de enzimas combinadas (bromelina, tripsina y rutina) versus diclofenaco con pacientes que padecen osteoartritis de rodilla en estudio doble ciego aleatorio. La combinación de enzimas y el diclofenaco son igual de eficaces, pero este último genera cierta toxicidad hepática. Por lo tanto, la combinación de enzimas resulta ser más segura y tolerable<sup>6</sup>.

Braun et al. (2005) realizaron un ensayo clínico en Alemania con niños menores de 11 años afectados por sinusitis aguda fueron tratados en 3 grupos distintos: con bromelina-POS®, en combinación con bromelina-POS® y las terapias estándar, o con las terapias estándar. El parámetro primario de medición de la eficacia de los diferentes grupos de tratamiento fue la duración de síntomas. Se concluyó que el grupo tratado sólo con bromelina mostró una diferencia significativa de recuperación más rápida comparada con el resto de grupos<sup>7</sup>.

Fitzhugh et al. (2008) demostraron que la bromelina reduce la migración de neutrófilos, ya que causa una débil adhesión de la IL-8 en los receptores CD128a/CXCR1 y CD128b/CXCR2, reduciendo la quimiotaxis y activación de este tipo de células blancas en un 40%. El estudio indicó también que la bromelina no reduce la expresión ni producción de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas en la zona peritoneal. Adicionalmente, fMLP no fue afectada por bromelina cuando se experimentó la migración de neutrófilos estimulada por péptidos análogos

bacterianos, lo que se descarta un defecto global de migración leucocitaria<sup>8</sup>.

Inchingolo et al. (2010) concluyeron que, luego de evaluación un grupo de 46 personas, la bromelina es tan efectiva como el ketoprofeno en la disminución de edema y dolor post operatorio de extracción de tercer molar<sup>9</sup>.

Secor et al. (2012) Afirieron que la bromelina atenúa la inflamación causada por reacción alérgica a la ovoalbúmina, según experimento en donde se sensibilizan vía inyección peritoneal y luego exposición por aerosol de la proteína a los animales de experimentación, posteriormente tratados con bromelina se observa una disminución a la sensibilización por metacolina, eosinofilia, IL-13, linfocitos CD8+, CD19+ y menor daño en el tejido broncoalveolar<sup>10</sup>.

Sude et al. (2008) estudiaron los efectos benéficos de la silimarina en toxicidad hepática inducida por antituberculosos en ratas Wistar. Los animales fueron distribuidos en 6 grupos : Grupo 1 (control), grupo 2 (control silimarina 200mg/Kg vía canulación gástrica) , grupo 3 (isoniacida a 50mg/Kg y rifampicina a 100 mg/Kg vía intraperitoneal), grupo 4 (pirazinamida 350mg/Kg vía canulación gástrica, isoniacida a 50mg/Kg y rifampicina a 100 mg/Kg vía intraperitoneal) ; los grupo 5 y 6 recibieron los medicamentos de los grupos 3 y 4 respectivamente, añadiendo una dosis de 200mg/Kg de silimarina vía canulación gástrica. La dosificación de los grupos se mantuvo por 14 días. Se concluyó que la silimarina disminuye significativamente el daño hepático, reflejado en los análisis histopatológicos y bioquímicos<sup>11</sup>.



Maryam et al. (2010) evaluaron el efecto protector de la silimarina en la toxicidad hepática inducida por isoniácida en conejos albinos; divididos en 4 grupos: Grupo 1 (control), grupo 2 (silimarina 50 mg/kg), grupo 3 (isoniácida 50 mg/kg vía intra peritoneal) y grupo 4 (isoniácida 50 mg/kg vía intraperitoneal más silimarina 50mg/Kg). El esquema de dosificación se realizó durante 11 días. Los resultados indican que la silimarina tiene un efecto hepatoprotector, ya que disminuye significativamente los valores de bilirrubina y la incidencia y severidad de cambios histopatológicos en el hígado<sup>12</sup>.

Singh et al. (2012) demostraron el efecto protector de la silimarina y n-acetilcisteína administrados por 48 horas en la toxicidad inducida por antituberculosos in vitro de células hepáticas humanas de la línea de los carcinomas hepatocelulares (HePg2). Se observó la reducción de toxicidad mediante el incremento de la viabilidad celular, conservación de un aspecto morfológico saludable y conservación de la actividad respiratoria celular. De estos resultados se deduce la conservación de membrana celular, eliminación de daño mitocondrial y disminución de apoptosis<sup>13</sup>.

## **2.2 Marco teórico**

### **2.2.1 Piña**

La piña es una planta perenne monocotiledónea herbácea perteneciente a la familia Bromelaciae, cuyo nombre científico es *Ananas comosus* (L), ya que no presenta semilla se propaga vegetativamente por brotes laterales. Su fruto es dulce y jugoso, considerado una infrutescencia estéril denominada baya, puede pesar hasta 2Kg. La planta es terrestre y puede crecer hasta 1 metro de altura, con tallos cortos y peciolo expandido. En el campo se pueden sembrar hasta 75000 individuos por hectárea. Existen alrededor 17 variedades de cultivo de *Ananas comosus* que se ha esparcido hacia zonas tropicales, siendo los productores líderes: Australia, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, China, Filipinas, Ghana, Hawaii, India, Malasia, Nigeria, Perú, Tailandia, Venezuela y Vietnam<sup>14</sup>.

El fruto contiene un 15% de azúcares, ácido málico y cítrico, vitaminas B1, B2, B3, B6 y C, minerales como fósforo, potasio, calcio, hierro, magnesio, calcio, bajas cantidades de lípidos y proteínas<sup>15</sup>.



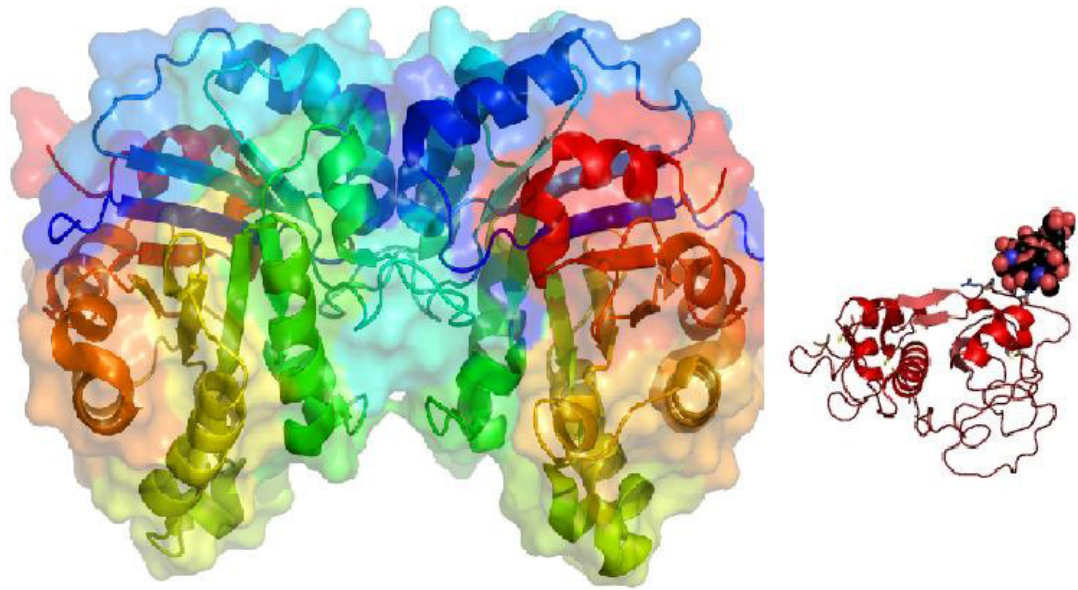
**Imagen 1. Fruto y tallo de *Ananas comosus***

La piña, perteneciente a la familia Bromelaciae es una fuente abundante de cisteinproteasas (EC 3.4.22) la mayor cantidad de endopeptidasa encontrada en extractos de tallo es la bromelina de tallo (EC 3.4.22.32). Mientras que la bromelina de fruto (EC 3.4.22.33) se encuentra en mayor cantidad en el fruto.

Adicionalmente, se hallaron 2 cisteinproteinasas en el tallo que son la ananaína (EC 3.4.22.31) que representa el 5% de las proteínas totales del extracto de tallo. El pH óptimo tanto en sustratos naturales como sintéticos es aproximadamente de 7. Esta enzima no es glicosilada y está formada por una cadena simple de 23,5 kDa, pI > 10 y la comosaína, endopeptidasa menos abundante (<1%) de proteínas totales, es una glicoproteína de 24,5 kDa y pI >10.

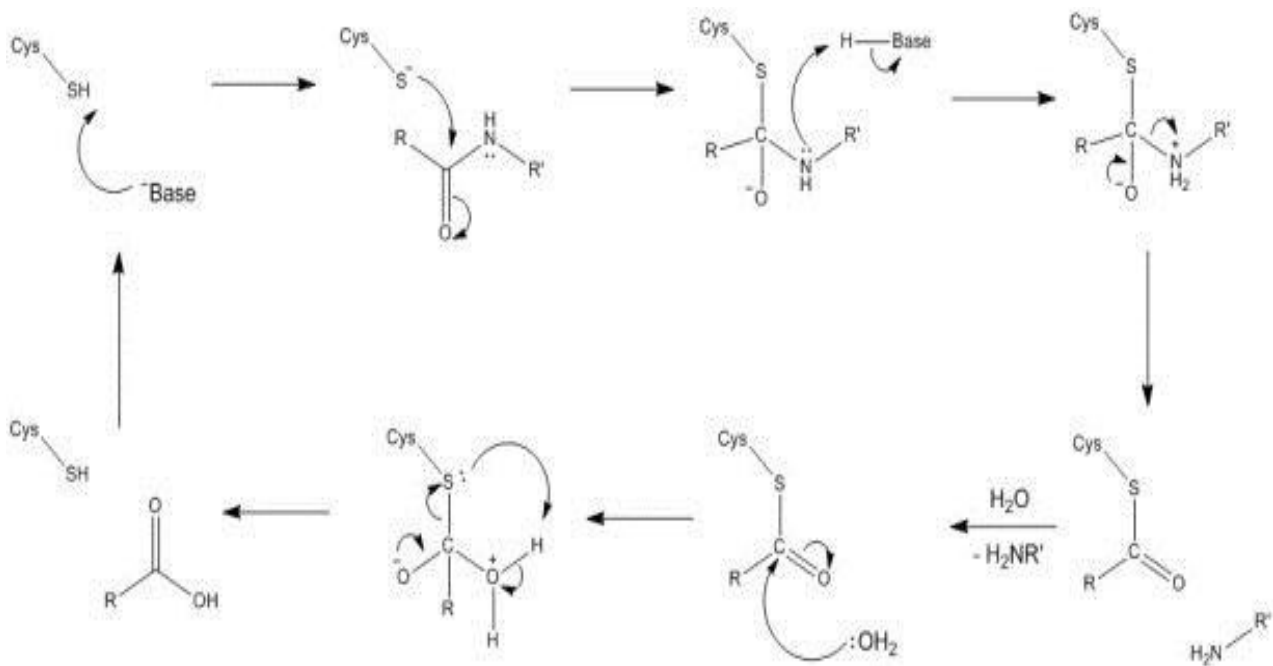
La bromelina de tallo (EC 3.4.22.32) es la más abundante en los extractos de tallo de la planta, es una única cadena polipeptídica glicosidada de 24,5 kDa, con un  $pI = 9,55$ , y cuenta con un pH óptimo a diferentes temperaturas sobre varios sustratos naturales y sintéticos. Presenta una actividad máxima a  $60^{\circ}\text{C}$  y pH 7. Está constituida por una secuencia 212 aminoácidos en los que destacan: arginina, ácido aspártico, serina, prolina, alanina, valina, glicina y metionina. Se encuentran enrollados en dos partes separadas por un puente que tiene un lugar activo con un grupo tiol (SH) libre. Su residuo aminoterminal es valina y carboxilo terminal glicina.<sup>18</sup>

La bromelina de fruto (EC 3.4.22.33) presente en mayor cantidad en los extractos de fruto, tiene un amplio pH óptimo frente a diversas sustancias naturales o sintéticas al igual que la bromelina de tallo. El pH ideal que la enzima actúa sobre la caseína y hemoglobina desnaturalizada es respectivamente, de 8,3 y 8. Su estructura consta de 351 aminoácidos en los que prevalecen: ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, alanina, valina, tirosina, leucina e isoleucina. La secuencia entorno al sitio activo es Asn –Glix-Asn-Pro-Cys-Ala-Cys. Tiene preferencia por el sustrato sintético Bz-Phe- Val – Arg –NHMeC y no por Z-Arg-Arg-NHMeC, en contraste con la bromelina de tallo. La bromelina de fruto es una cadena polipeptídica no glicosidada de aproximadamente 25kDa cuyo  $pI$  es 4,6.<sup>16,17</sup>



**Imagen 2. Modelo molecular de bromelina**

En ambos caso la enzima se inhibe con derivados mercurio divalentes ( $\text{Hg}^{2+}$ ) como el p-CMB (ácido p-cloromercuribenzoico), acetato fenilmercúrico, cloruro mercúrico y cobre divalentes ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Disminuye su actividad con sustancias que contengan hierro trivalente ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y cistatinas, lo que demuestra que los grupos  $-\text{SH}$  reactivos son necesarios para la actividad. Esta pérdida de actividad puede ser recuperada con concentraciones de cisteína. El agente nucleofílico es el átomo de azufre de la cisteína que formaría un intermediario covalente durante la reacción.<sup>18</sup>



**Imagen 3. Mecanismo de acción de grupo tiol proveniente de cisteína.**

### 2.2.2 Toxicidad hepática

La hepatotoxicidad se define como la lesión o daño en hígado a consecuencia de una exposición a un medicamento u otros agentes no farmacológicos. La reacción medicamentosa adversa es cualquier respuesta nociva y no intencional que se produce a dosis farmacológicas con fines profilácticos y terapéuticos.<sup>20</sup>

Las reacciones adversas que afectan al hígado son determinadas por alteración de al menos uno de los análisis bioquímicos hepáticos: aumento de alanino aminotransferasa (ALT) superior a dos veces el limite alto de la normalidad, aumento de la concentración de bilirrubina directa sérica más de dos veces el limite alto de la normalidad, aumento de aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina y la concentración de bilirrubina total, siempre que supere uno de ellos más de dos veces el limite alto de la normalidad.<sup>20,21</sup>

Para la isoniacida, se emplean los criterios diagnósticos para definir toxicidad hepática por medicamentos antituberculosos establecidos por el Centro de Evaluación e Investigación de Medicamentos de la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA) y la Asociación Americana para el estudio de Enfermedades Hepáticas en el 2001; dichos criterios fueron los siguientes:

- Elevación mayor de tres veces por encima del límite superior normal para las aminotransferasas y de dos veces para la fosfatasa alcalina (FA) , sin síntomas
- Elevación de las aminotransferasas mayor de tres veces el límite superior de lo normal con presencia de síntomas.
- Elevación de las aminotransferasas mayor de cinco veces el límite superior de lo normal con o sin presencia de síntomas
- Incremento de las bilirrubinas más de dos veces el valor normal

Es importante resaltar que con frecuencia el patrón de alteración hepática ocasionado por los medicamentos antituberculosos es mixto.<sup>21</sup>

### **2.2.3 Epidemiología**

La incidencia de toxicidad hepática generada específicamente por medicamentos antituberculosos fluctúa en 4,3 y 19%.

Gulbay et al (2006)., realizaron estudio retrospectivo durante 17 años, donde describieron los efectos adversos de los medicamentos antituberculosos en una población de 1149 pacientes; se encontró un 4,9% de alteraciones en perfil hepático, 2,4% de toxicidad hepática y 0,8% de falla hepática fulminante.<sup>22</sup>

En 1985, en un estudio de 44 pacientes tratados con 15mg/Kg de isoniacida y 15mg/Kg de rifampicina, se reportó una elevación de concentración de alanino aminotransferasa en 100 unidades en 36 pacientes (82%), de los cuales 15 desarrollaron hepatitis sintomática con ictericia.<sup>23</sup>

#### 2.2.4 Factores de riesgo

El desarrollo de hepatotoxicidad en pacientes depende de diversos factores:

- Edad: a mayor edad, mayor riesgo de toxicidad hepática. El riesgo es evidente desde los 35 años y aumenta a partir de los 60 años
- Embarazo: el tercer trimestre y los tres primeros meses del puerperio son los periodos en que hay mayor riesgo de toxicidad hepática.
- Alcohol: el consumo de alcohol aumenta el doble la incidencia de toxicidad hepática.
- Fármacos: los anti fúngicos, carbamazepina, metotrexato, paracetamol y sulfasalazina son algunas de las drogas que aumentan significativamente el riesgo de hepatotoxicidad.<sup>24</sup>
- Co-infección VIH: La coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un factor de riesgo importante, no se conoce el mecanismo exacto, pero se supone de la administración simultánea de antirretrovirales. En relación a la terapia antirretroviral y hepatitis por fármacos, dependiendo de los medicamentos usados puede verse el aumento de la incidencia desde 2 a 18%. Hassen et al. (2012) estudiaron en Etiopia, 296 pacientes TB/ VIH coinfección tratados desde Enero 2008 hasta diciembre 2011, 33 desarrollaron hepatotoxicidad (11,5%). El estudio sugiere que la presencia de tuberculosis pulmonar diseminada y/o índice de masa corporal < 18,5 Kg/m<sup>2</sup>, los pacientes TB/VIH coinfección, deben ser observados por la ocurrencia de hepatotoxicidad durante la fase intensiva de tratamiento de tuberculosos para prevenir morbilidad y mortalidad.<sup>25</sup>
- Hepatitis: La presencia de hepatitis B activa puede aumentar la toxicidad hepática por isoniazida: Incluso la infección con virus C, por sí sola aumenta el riesgo.

- Desnutrición: En los pacientes desnutridos, con índice de masa corporal bajo, especialmente con hipoalbuminemia o deficiencias vitamínicas, la toxicidad hepática aumenta.

Warmelink et al. (2011) validan que la pérdida de peso a partir de 2 Kg a más durante los 4 primeros meses de tratamiento antituberculoso, es un indicador de daño hepático y posible interrupción de la terapia. Además indican otros factores fueron la coinfección con el virus de hepatitis C (VHC), edad mayor de 60 años y tuberculosos multidrogo-resistente<sup>26,27</sup>

Sin embargo el factor más importante es el polimorfismo genético. El estudio del genotipo y fenotipo de la N-acetiltransferasa 2 (NAT2) ha revelado alelos diferentes, relacionados con rapidez o lentitud de acetilación: los acetiladores lentos poseen mayor riesgo de hepatotoxicidad por isoniacida.

Los acetiladores rápidos eliminan el 90% de isoniacida como acetilisoniacida mientras que los acetiladores lentos eliminan sólo el 67% y el resto es excretado sin modificaciones por la orina.

Possuelo et al. (2008) hicieron un estudio de cohortes prospectivo de Brasil, 254 pacientes se les administró medicamentos antituberculosos, y posteriormente se analizó su genotipo NAT2. Del total de pacientes analizados, 27,2% (69) fueron acetiladores lentos y 72,8% (185) fueron acetiladores rápidos. Sesenta y cinco pacientes eran VIH seropositivos (25,6%). Treinta y tres (13%) y 14 (5,5%) pacientes desarrollaron reacciones adversas gastrointestinales y hepatotoxicidad, respectivamente. De los pacientes que presentaron hepatotoxicidad, nueve (64,3%) fueron acetiladores lentos y cinco (35,7%) eran acetiladores rápidos. El estudio concluye que los pacientes VIH seropositivos que tienen perfil de acetilación lenta están altamente asociados a un mayor riesgo de desarrollar toxicidad hepática.<sup>27</sup>

En el 2002, se evaluó 224 pacientes con tuberculosis activa que recibían tratamiento antituberculoso. El estado de acetilación fue detectado por PCR. Treinta y tres pacientes (14,7%) fueron diagnosticados con toxicidad



hepática inducida por fármacos. Los acetiladores lentos tienen mayor riesgo de hepatotoxicidad que acetiladores rápidos (26.4% vs 11.1%). Los acetiladores lentos contaron con una cantidad significativamente mayor de aminotransferasas que acetiladores rápidos.<sup>28</sup>

Estos casos resaltan la susceptibilidad de los acetiladores lentos a cuadros más severos de hepatotoxicidad que los acetiladores rápidos.

### **2.2.5 Farmacología de la isoniacida**

La isoniacida es un fármaco derivado del ácido isonicotínico, que se usa de primera elección en el tratamiento antituberculoso.

Los siguientes microorganismos son generalmente sensibles a la isoniacida: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, y algunas cepas de *M. kansasii*. No se han observado resistencias cruzadas de la isoniacida con otros antituberculosos con la excepción de la etionamida con la que se encuentra relacionada estructuralmente. Aunque se puede desarrollar resistencia a la isoniacida si esta se utiliza sola, la incidencia de la resistencia primaria se encuentra bastante estabilizada y es del orden del 9%.

Su mecanismo de acción se basa en el metabolito activo, que es convertido por la catalasa micobacteriana. Inhibe la biosíntesis del ácido micólicos, lípidos de cadenas largas y ramificadas unidas al arabinogalactano, que forman parte esencial de la pared celular micobacteriana. La isoniacida también inhibe la peroxidasa micobacteriana, lo que aumenta la probabilidad de dañar a las micobacterias con oxígeno reactivo y peróxido de hidrógeno.

Después de administración oral o parenteral, la isoniacida se absorbe rápidamente obteniendo en 1-2 horas las concentraciones plasmáticas máximas de 3-5 ug/mL (distribución bimodal).

La isoniacida se distribuye muy bien en todos los órganos y tejidos, difunde fácilmente en todos los líquidos y células corporales y es detectable en líquido pleural y ascítico, como en el líquido cefalorraquídeo.

El 75-95% de una dosis de isoniacida se excreta en orina en un lapso de 24h, en su mayor parte de metabolitos, como acetilisoniacida y ácido nicotínico, generados por acetilación enzimática (NAT2) e hidrólisis respectivamente. La vida media de eliminación des de 1-4 horas, depende del paciente si es acetilador rápido o lento.<sup>30,31</sup>

### **2.2.6 Mecanismos de biotransformación hepática**

El hígado es fundamental para la biotransformación y disposición de xenobióticos. Este órgano está expuesto a numerosas sustancias exógenas y sus metabolitos. El metabolismo de componentes exógenos pueden modular los efectos nocivos, tanto incrementar la toxicidad (activación de metabolito toxico) como disminución de toxicidad (detoxificación). La mayoría de los xenobióticos son lipófilos, por ello pueden atravesar las membranas de las células intestinales. Al someterlos a los procesos bioquímicos en el hepatocito los convierten en sustancias más hidrofílicas que son exportados al plasma o bilis por proteínas de transporte y excretadas por el riñón o tracto gastrointestinal.<sup>32</sup>

El metabolismo de los fármacos o reacciones de biotransformación, se clasifican como reacciones de funcionalización de fase I y reacciones biosintéticas de fase II (conjugación).

Las reacciones de funcionalización de fase I se realizan en un complejo enzimático que realizan oxidación, reducción o hidrólisis. Es decir modifican al fármaco anexándole un grupo -OH, -COOH, -SH, - O -, NH<sub>2</sub>. La adición de estos grupos funcionales aumenta ligeramente la hidrosolubilidad del fármaco, pero puede alterar sus propiedades biológicas, como inactivación del medicamento activo. En algunos casos,

por lo general la hidrólisis de un enlace éster o amida, provoca la activación biológica del fármaco. Algunos ejemplos de enzimas involucradas en esta fase son: citocromo P450 (CYP), monooxigenasas con flavina (FMO) e hidrolasas de epóxidos.

Las reacciones de conjugación de la fase II culminan en la formación de un enlace covalente entre un grupo funcional en el compuesto original, o metabolito de fase I, con los derivados de manera endógena: ácido glucurónico, sulfato, glutatión, aminoácidos o acetato. Estos conjugados facilitan la eliminación de fármacos e inactivación de los metabolitos electrofílicos y potencialmente tóxicos producidos por oxidación, por tanto produce un metabolito más hidrosoluble y mayor peso molecular, lo que facilita su eliminación. Son ejemplos de esta fase: sulfoniltransferasas (SULT), N-acetiltransferasas (NAT), S-transferasas de glutatión (GST), glucuronosiltransferasas de UDP (UGT) y metiltransferasas (MT) <sup>30</sup>

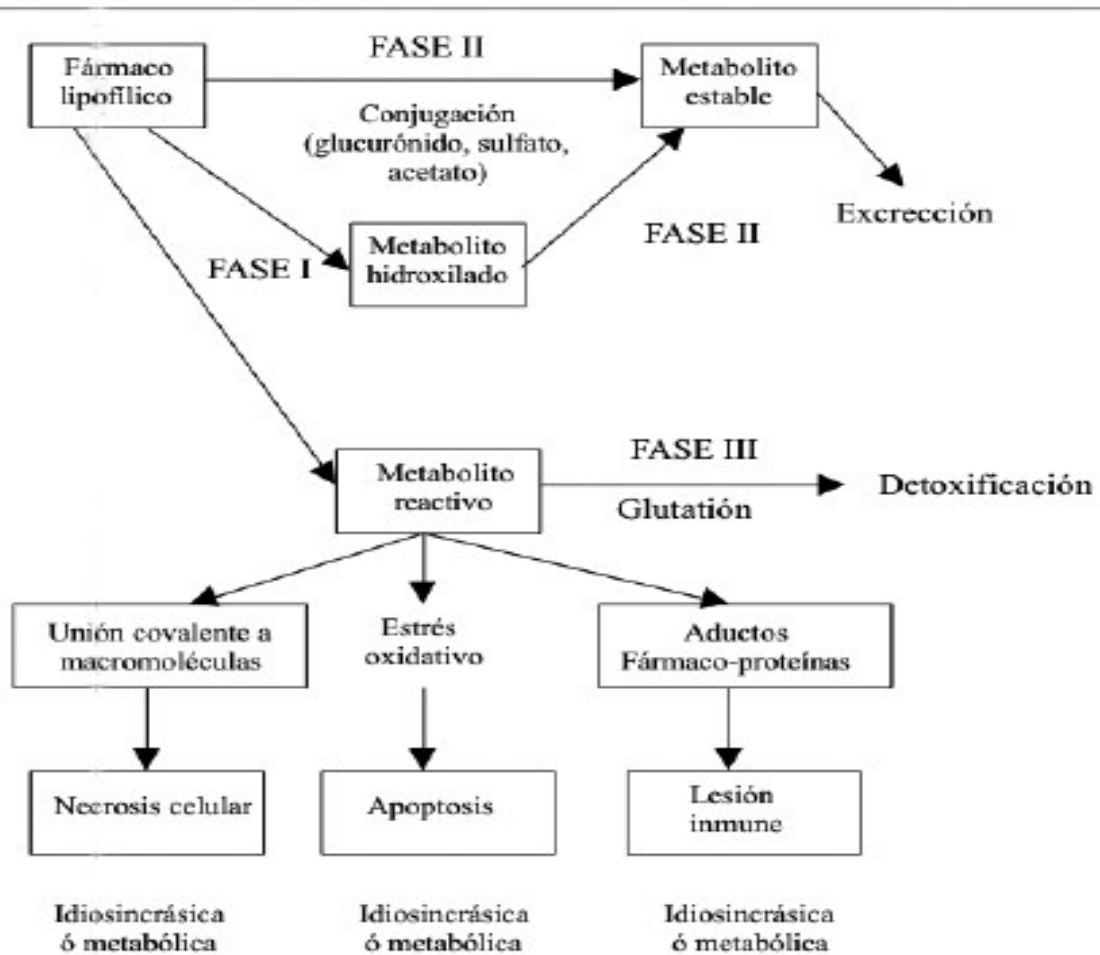


Imagen 4. Biotransformación de xenobióticos (Fase I y II) <sup>20</sup>

### 2.2.7 Mecanismos de toxicidad hepática (HTX)

Existen dos tipos de hepatotoxicidad: intrínseca e idiosincrásica. La toxicidad hepática (HTX) intrínseca o dosis dependiente, es predecible y reproducible y ocurre en una minoría de fármacos. Algunas hepatotoxinas actúan sobre el hepatocito, otras son compuestos tóxicos generados por metabolismo. Algunos ejemplos son: paracetamol y ácido acetilsalicílico.

LA HTX idiosincrásica ocurre de modo impredecible, no se relaciona con la dosis y no es reproducible en animales de experimentación.

Los metabolitos hepatotóxicos generalmente se producen en la fase I de la biotransformación, donde está involucrado el citocromo P450 (CYP). Existen 3 mecanismos principales ocasionados por éste citocromo:

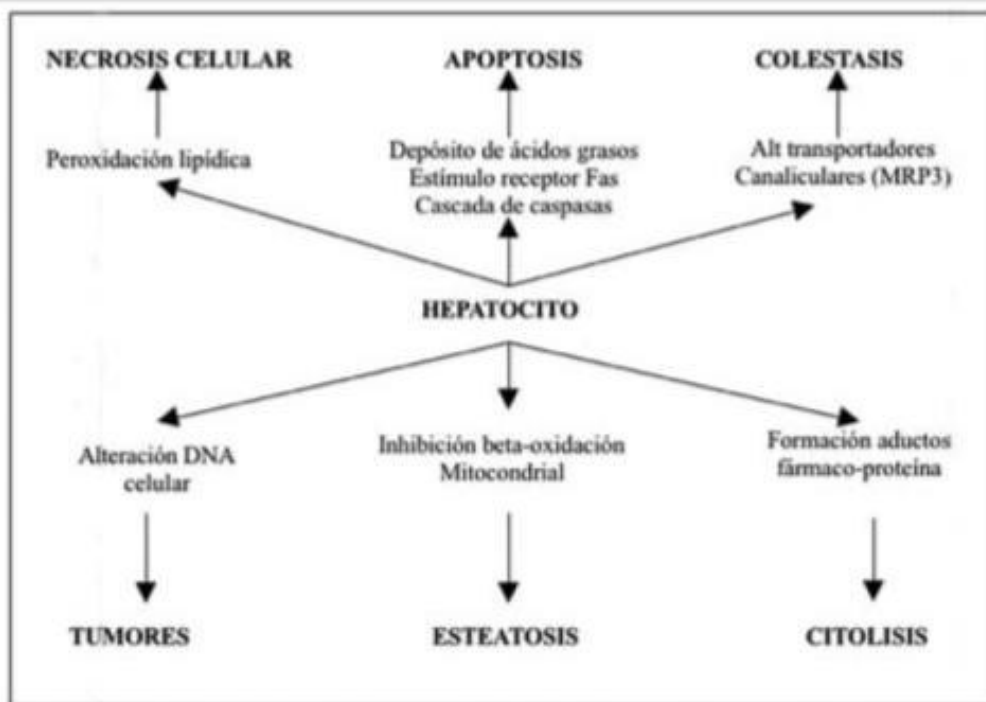
- Acumulación de cantidades excesivas de droga no metabolizada, originada por disminución de la actividad del CYP, que se debe generalmente a la inhibición del CYP por las drogas. Para que se manifieste la toxicidad: baja funcionalidad de P450 (polimorfismo genético), el fármaco de por si tiene potencial toxico, el fármaco no es metabolizado a productos inactivos.
- Metabolitos con radicales libres o electrofílicos, que resultan de la actividad del citocromo P450. Estos metabolitos son químicamente reactivos tóxicos a las membranas celulares y organelas celulares
- Producción de anticuerpos.<sup>33</sup>

Estos mecanismos generan a nivel intracelular radicales libres o compuestos electrofílicos que causan depleción de glutatión, con unión covalente a proteínas, lípidos o ácidos nucleicos e inducen peroxidación lipídica. La lesión citotóxica culmina en la muerte celular por apoptosis o necrosis. La necrosis es consecuencia de peroxidación de lípidos de membrana, dando lugar a rotura celular y salida de componentes citosólicos. La apoptosis trata de la condensación progresiva de cromatina nuclear, en relación por ácidos biliares y mediados por mecanismo dependiente de Fas (proteína receptora de factor de necrosis tumoral alfa). Exceso de ácidos biliares en el citosol hepático ocasiona la translocación del Fas citosólico a la membrana, uniéndose a ligando fisiológico (FasL) y desencadena la cascada de caspasas que termina con apoptosis celular.

El efecto citotóxico puede ser secundario al estrés oxidativo, que produce depleción de ATP, oxidación de grupos sulfhidrilo de proteínas, trastornos de homeostasis iónica y aumento de concentración intracelular de Ca<sup>++</sup>, lo que origina la pérdida de integridad celular. En algunos casos el metabolito

reactivo forma aductos con proteínas o con la propia enzima microsomal, generando neo antígenos: éstos migran a la membrana celular donde estimulan la respuesta inmune celular y humoral originando reacciones idiosincrásicas inmunoalérgicas o por hipersensibilidad.

Raros casos se produce un fallo en la conjugación (fase II), encargados de neutralizar los metabolitos reactivos, los cuales pueden dar lugar a determinados síndromes como la colestasis, al inhibir transportadores específicos de la bilis, o a la esteatosis microvesicular y esteatohepatitis al alterar la  $\beta$ -oxidación mitocondrial<sup>20</sup>

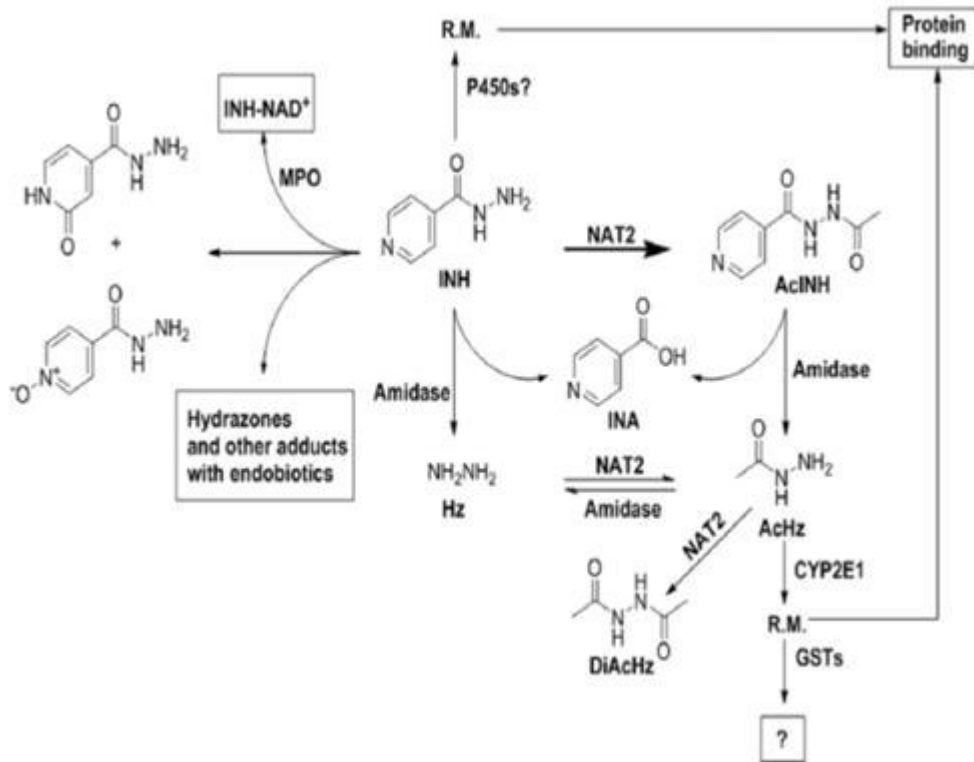


**Imagen 5. Manifestaciones de injuria hepática<sup>20</sup>**

### 2.2.8 Toxicidad hepática por isoniacida

Los aspectos clínicos del daño hepático inducido por isoniacida pueden ser clínica, bioquímica e histológicamente indistinta de hepatitis viral, excepto que el daño ocurre primariamente en personas a partir de 35 años. La relación posible entre pacientes susceptibles a daño hepático por isoniacida y metabolizadores rápidos (acetilación) del fármaco ha sido encontrada.

Examinando los metabolitos de isoniacida muestran que los pacientes con fenotipo de acetilador rápido hidrolizan mucho más isoniacida a ácido isonicotínico que los acetiladores lentos. La hidracina liberada de la isoniacida es primariamente acetilhidrazina, y estudios en animales han mostrado que este metabolito se convierte en un potente agente acetilador que produce necrosis hepática.<sup>34</sup> La ruta principal del metabolismo de isoniacida: (1) acetilación para formar acetilisoniacida vía N-acetiltransferasa (NAT) 2; e hidrólisis (2) para producir ácido isonicotínico e hidracina por amidasa. Acetilisoniacida también puede ser hidrolizada para formar ácido isonicotínico y acetilhidracina. Adicionalmente, hidracina puede ser acetilada a acetilhidracina y diacetilhidracina. Hidracina y acetilhidracina son oxidadas y generan metabolitos reactivos que están involucrados en la hepatotoxicidad por isoniacida, se propuso que esta mediado por el citocromo P450, especialmente el CYP2E.



**Imagen 6. Formación de metabolitos inerte y tóxicos de isoniacida** <sup>35</sup>

Los NATs (Enzyme Comission number EC 2.3.1.5 N-acetiltransferasas), son una clase de enzimas que catalizan la acetilación de arilaminas de acetil-CoA. NAT1 es encontrado en todos los tejidos, incluido en los endocrinos, en tanto NAT2 está limitado en el hígado y tracto gastrointestinal. Este último está involucrado en la acetilación de isoniacida, hidracina y acetilhidracina. NAT2 está involucrado en 3 pasos de la biotransformación de la isoniacida, incluyen la desactivación (formación de acetilisoniacida), bioactivación (formación de acetilhidracina) y detoxificación (formación de diacetilhidracina). Los acetiladores rápidos han sido propuestos con un mayor riesgo de daño hepático por isoniacida a comparación de los acetiladores lentos, que está basado en velocidad de formación de acetilhidracina en los acetiladores rápidos.



Según Pencheng et al.<sup>35</sup>, 86% de los pacientes probables y 60% con posible daño hepático fueron acetiladores rápidos. En otro estudio con 143 pacientes que recibieron isoniacida, 18 pacientes con niveles anormales y 18 pacientes con niveles normales de aminotransferasas fueron estudiados. Se encontró que 14 pacientes con niveles anormales de aminotransferasas fueron acetiladores rápidos, cuando solo 7 eran acetiladores rápidos con niveles normales de aminotransferasa. Los resultados deducen que los acetiladores rápidos tienen un mayor riesgo de injuria hepática en terapia con isoniacida.

Sin embargo estudios recientes indican que los acetiladores lentos tienen un mayor riesgo de hepatotoxicidad por isoniacida.

Huang et al.<sup>28</sup> estudiaron a 224 pacientes que recibieron terapia antituberculosa, los acetiladores lentos tienen mucho más riesgo de toxicidad hepática que los acetiladores rápidos (26.4% vs 11.1%). La frecuencia de depuración de isoniacida es más lenta en acetiladores lentos que acetiladores rápidos, que contribuye en la acumulación de isoniacida. En estos casos la disminución de dosis de isoniacida en acetiladores lentos puede reducir la incidencia de hepatotoxicidad.

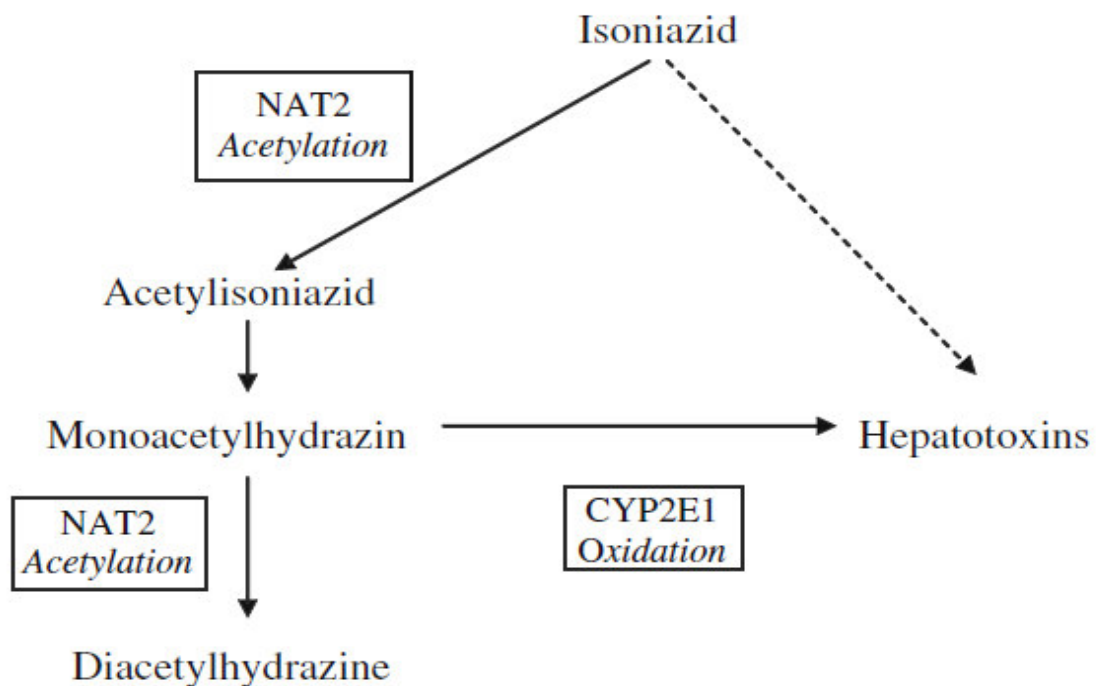
En general, el papel que desempeña el NAT2 en la hepatotoxicidad por isoniacida aún sigue siendo controversial y su mecanismo detallado aun es desconocido.

Amidasas (EC 3.5.1.4) son una clase de enzimas que catalizan la hidrólisis de amidas y usualmente tienen actividad carboxilestearasa que pueden hidrolizar esteres carboxílicos. Diferentes tipos de amidasas han sido identificados, como arginino amidasa análogo de tripsina, anandamida amidasa y N-aciletanolamina que hidroliza amidasas acidas.

Las amidasas pueden hidrolizar isoniacida a ácido isonicotínico e hidracina, además pueden hidrolizar el acetilisoniacida y acetil hidracina. En consecuencia, un alto nivel de actividad amidasa puede ocasionar la formación de hidracina y acetilhidracina y generar una alta incidencia de hepatotoxicidad por isoniacida ya que ambos son metabolitos tóxicos.

La CYP2E1 es conocida por la formación de especies reactivas oxidativas y otros metabolitos reactivos de hepatotoxinas. En base al rol importante de formación de metabolitos reactivos, CYP2E1, fue propuesto como un mecanismo de hepatotoxicidad por isoniacida. Muchos estudios investigaron el polimorfismo de en la hepatotoxicidad por isoniacida, pero los resultados fueron inconsistentes en diferentes poblaciones.<sup>35</sup>

Se ha estudiado también el rol de los polimorfismos genéticos en los pasos enzimáticos del metabolismo de la isoniacida 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.<sup>36</sup>



**Imagen 7. Formación de hepatotoxinas por isoniacida**

### 2.2.9 Patología

Aunque el hepatocito es la célula diana habitual del efecto tóxico de los medicamentos sobre el hígado y la hepatitis aguda icterica o anictérica la forma de presentación más frecuente de la hepatotoxicidad (90% de los casos), cualquier célula parenquimatosa o no parenquimatosa del hígado puede resultar dañada de forma aislada o combinada, pudiendo simular cualquier tipo de enfermedad hepática conocida. Por lo tanto, el tipo de lesión va a depender fundamentalmente de la célula hepática predominantemente afectada:

La lesión de los hepatocitos puede producir hepatitis aguda o crónica, necrosis, esteatosis, hepatitis colestásica, cirrosis, hepatitis granulomatosa o tumores.

El daño de los colangiocitos desembocaría en la aparición de colangitis aguda o crónica, o más raramente colangitis esclerosante.

La toxicidad sobre las células endoteliales podría usar de enfermedad venooclusiva hepática, peliosis hepática, síndrome de Budd-Chiari o incluso del desarrollo de un angiosarcoma. El ataque de las células estrelladas (células de Ito) puede causar fibrosis hepática.

Necrosis: este tipo de daño es generado por sustancias exógenas como paracetamol y tetracloruro de carbono a consecuencia del cese de síntesis proteica por inhibición de síntesis de RNA. Este efecto nocivo se observa en una zona particular del lóbulo hepático. Se manifiesta con muy elevados niveles de alaninoaminotransferasa e interrupción de la función hepática que puede generar una falla hepática atípica.

Hepatitis: este tipo de lesión muestra necrosis hepatocelular asociado con infiltración de células relacionadas con inflamación. Este caso debe ser caracterizado en 3 clases, viral, focal y crónica. La hepatitis viral, puede ser causado por uno de los 5 tipos de hepatitis (A, B C, D o E).

Hepatitis focal donde focos dispersos de células necrosadas pueden estar acompañados por infiltración linfocitaria. La hepatitis crónica, que es similar a la hepatitis autoinmune, serológicamente e histológicamente, pueden ser causados por diclofenaco, metildopa, nitrofurantoina y minociclina. Los inhibidores de transcriptasa inversa no nucleósidos, especialmente nevirapina están asociados con hepatitis y necrosis hepática.

Colestasis: Caracterizado por el deterioro del flujo biliar, picazón e ictericia. Se reporta que la amoxicilina, clorpromazina, eritromicina están asociados con etiología de colestasis. Puede ser colestasis inflamatoria, blanca o ductal. La colestasis inflamatoria puede ser causada por alopurinol o carbamazepina. Colestasis blanda sin inflamación parenquimal puede ser causada por esteroides anabólicos y andrógenos, mientras que la colestasis ductal muestra destrucción progresiva de conducto biliar causado por clorpromazina y flucloxacilina.

Esteatosis: este tipo de daño se manifiesta con una acumulación de triglicéridos, que puede ser pequeño (microvesicular) o grande (macrovesicular) en hígado graso. Aspirina, ketoprofeno, tetraciclina, inhibidor de transcriptasa inversa nucleósidos y ácido valproico pueden generar esteatosis microvesicular, a su vez el paracetamol y metotrexato pueden originar esteatosis macrovesicular. Los inhibidores de transcriptasa inversa nucleósidos como zidovudina y estavudina están asociados con acidosis láctica, que puede ser fatal.

Granuloma: los granulomas hepáticos están asociados con granulomas ubicados en áreas portales o periportales y muestran vasculitis e hipersensibilidad. Fármacos como alopurinol, sulfonamidas, pirazinamida, fenitoina, isoniacida y penicilina han sido descubiertos como los causantes de esta lesión.

Lesiones vasculares: esta condición es causada por daño en el endotelio vascular y pueden ser causados por agentes quimioterapéuticos y esteroides anabólicos.

Venoclusión: Las venas hepáticas se obstruyen, bloqueando el suministro de sangre al hígado. Es una obliteración no trombótica de pequeñas venas intrahepáticas por fibrina sub endotelial asociados con congestión y posible necrosis fatal de hepatocitos centrilobulares. Los alcaloides pirrolizidonicos han sido asociados con este severo desorden hepático, así como la ciclofosfamida.<sup>19,32</sup>

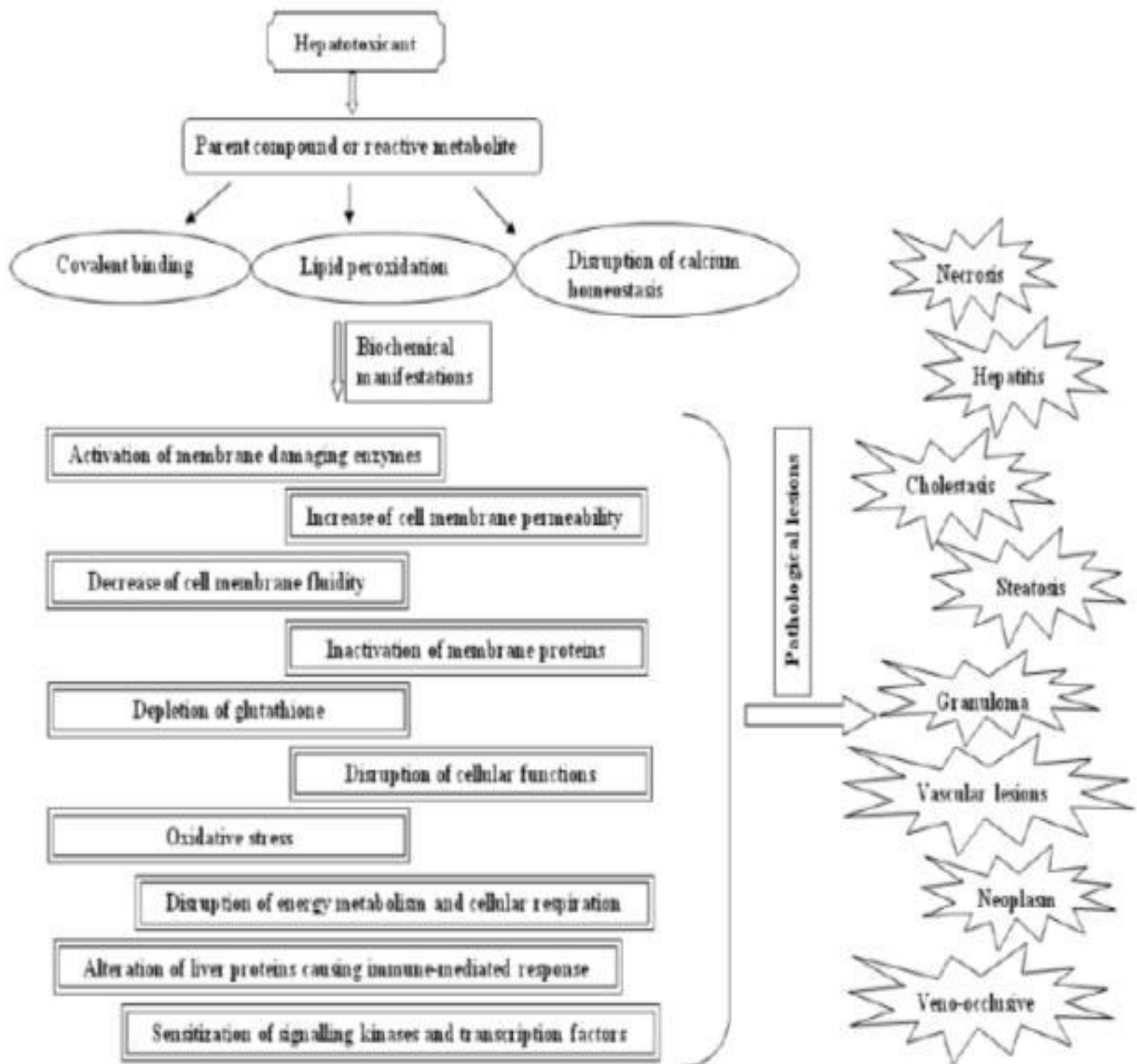


Imagen 8. Manifestaciones de toxicidad hepática <sup>32</sup>

### 2.2.10 Diagnóstico

Los diversos patrones de hepatotoxicidad por fármacos pueden ser reconocidos, cada uno con un diferente mecanismo de injuria. Injuria hepatocelular o citolisis se relaciona con una marcada elevación de aminotransferasas en suero, usualmente con incremento de bilirrubinas totales y moderadamente incrementadas con relación a fosfatasa alcalina. La injuria colestásica se caracteriza por elevación de fosfatasa alcalina tanto o más que el incremento de alaninoaminotransferasa o aspartatoaminotransferasa. La hipersensibilidad o injuria inmunológica está relacionado con la exposición repetida luego de un intervalo, posiblemente asociado con fiebre, rash o eosinofilia.

La aparición de síntomas tanto inespecíficos como anorexia, náuseas y fatiga, como ictericia en la prescripción de medicamentos se debe sospechar de la intoxicación hepática por fármacos. Otras causas de daño hepático deben ser descartadas, incluyendo infección por hepatitis A o B, alcohol o hepatitis autoinmune y desordenes del tracto biliar. Hepatitis viral puede ser evaluada con anticuerpo hepatitis A Ig M, antígeno de superficie de hepatitis B, y hepatitis C por antígeno.

Daño hepático por alcohol debe ser evaluado, ya que los niveles de aspartatoaminotransferasa son mayores que alaninoaminotransferasas en relación 2:1. Se debe sospechar de enfermedad autoinmune si hay presencia anticuerpos de musculo liso y elevados niveles de gamma globulina.

Desordenes metabólicos y genéticos también pueden generar injuria hepática: elevación de ferritina y niveles de hierro sugiere la presencia de hemocromatosis; niveles bajos de alfa anti tripsina y un fenotipo anormal pueden estar asociados a deficiencia de esta proteína y un bajo nivel de

ceruloplasmina con daño hepático está relacionada con la enfermedad de Wilson.

Los síndromes clínicos que más frecuentemente se asocian a toxicidad hepática aguda son la lesión celular aguda y el síndrome colestásico.<sup>37</sup>

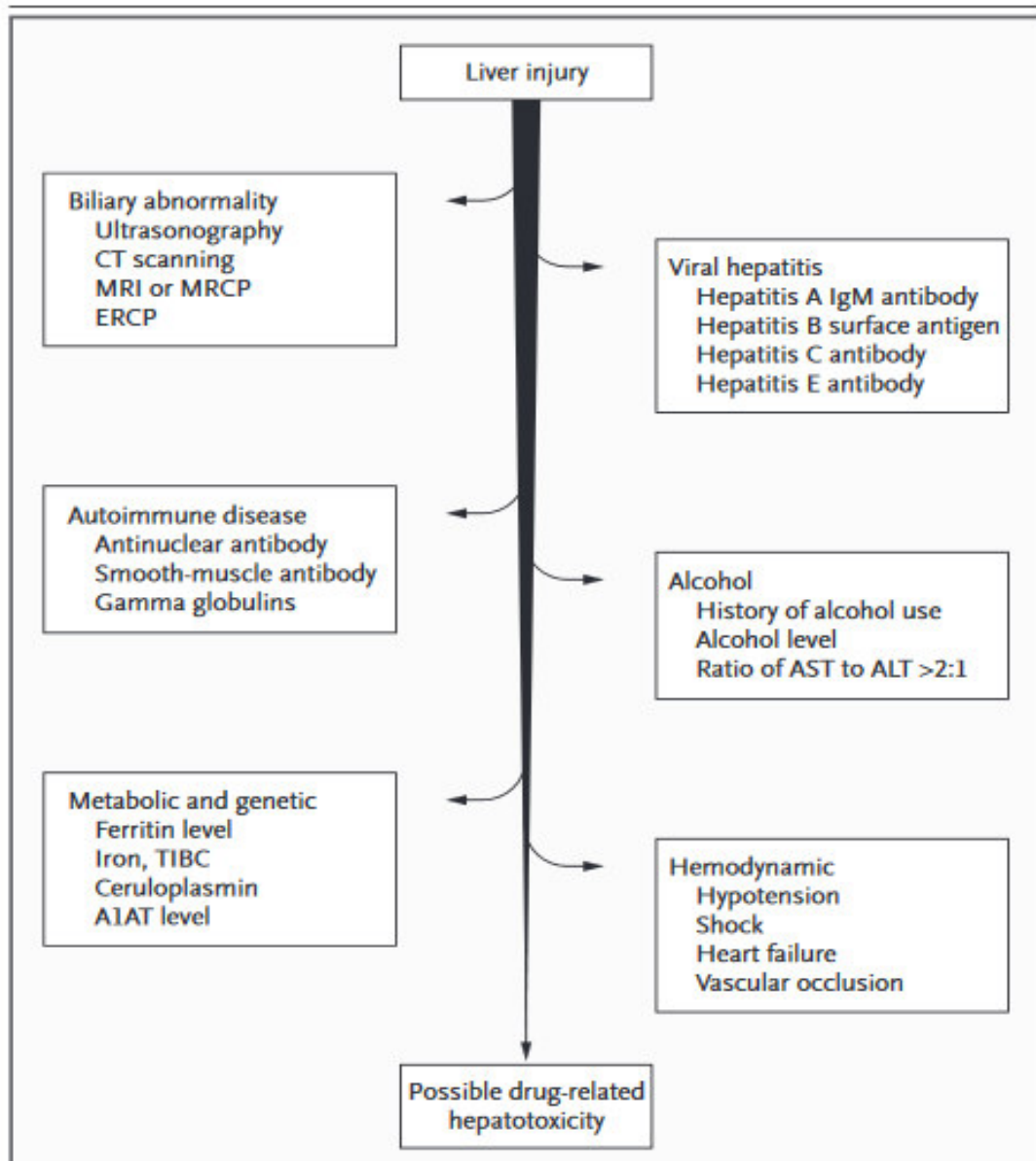


Imagen 9. Causas y diagnóstico de toxicidad hepática <sup>37</sup>



Entre los análisis clínicos en suero para diagnóstico de hepatotoxicidad más usados son:

- **Alaninoaminotransferasa (ALT):** esta enzima cataliza la acción reductora de transferencia de un grupo amino de alanina a alfa cetoglutarato para producir glutamato y piruvato. El nivel elevado de esta enzima se liberan durante daño hepático y detecta necrosis hepatocelular
- **Aspartatoaminotransferasa (AST):** esta enzima cataliza la transferencia reductora de un grupo amino de aspartato a alfa cetoglutarato para producir oxalacetato y glutamato. También ayuda a la detección de necrosis hepatocelular pero es menos específico. La relación entre AST y ALT puede usarse para diferenciar daño hepático de otros órganos.
- **Fosfatasa alcalina (PA):** esta enzima está presente en los conductos biliares del hígado, hidroliza monofosfatos a pH alcalino. Elevación de fosfatasa alcalina y/o bilirrubina con poco o no incremento de ALT es un biomarcador de defectos hepatobiliares y colestasis.
- **Gama glutamil transferasa (GTT):** cataliza la transferencia de grupos gamma glutamil a aminoácidos y péptidos de cadena pequeña. Es un biomarcador específico de lesiones hepatobiliares, especialmente colestasis y defectos biliares.
- **Bilirrubina:** es un anión endógeno derivado de la degradación de hemoglobina de los eritrocitos y excretados por el hígado a la bilis. Cuando las células hepáticas están dañadas pueden no excretar debidamente la bilirrubina. Altos niveles de bilirrubina pueden ser causadas por la deficiencia de depuración hepática y originar ictericia.
- **Urobilinogeno:** es un subproducto de la descomposición de la hemoglobina, que es producido por el tracto intestinal por la acción de bacterias sobre la bilirrubina. El urobilinogeno está aumentado en la enfermedad hepática y bilirrubina en orina puede ser positiva o

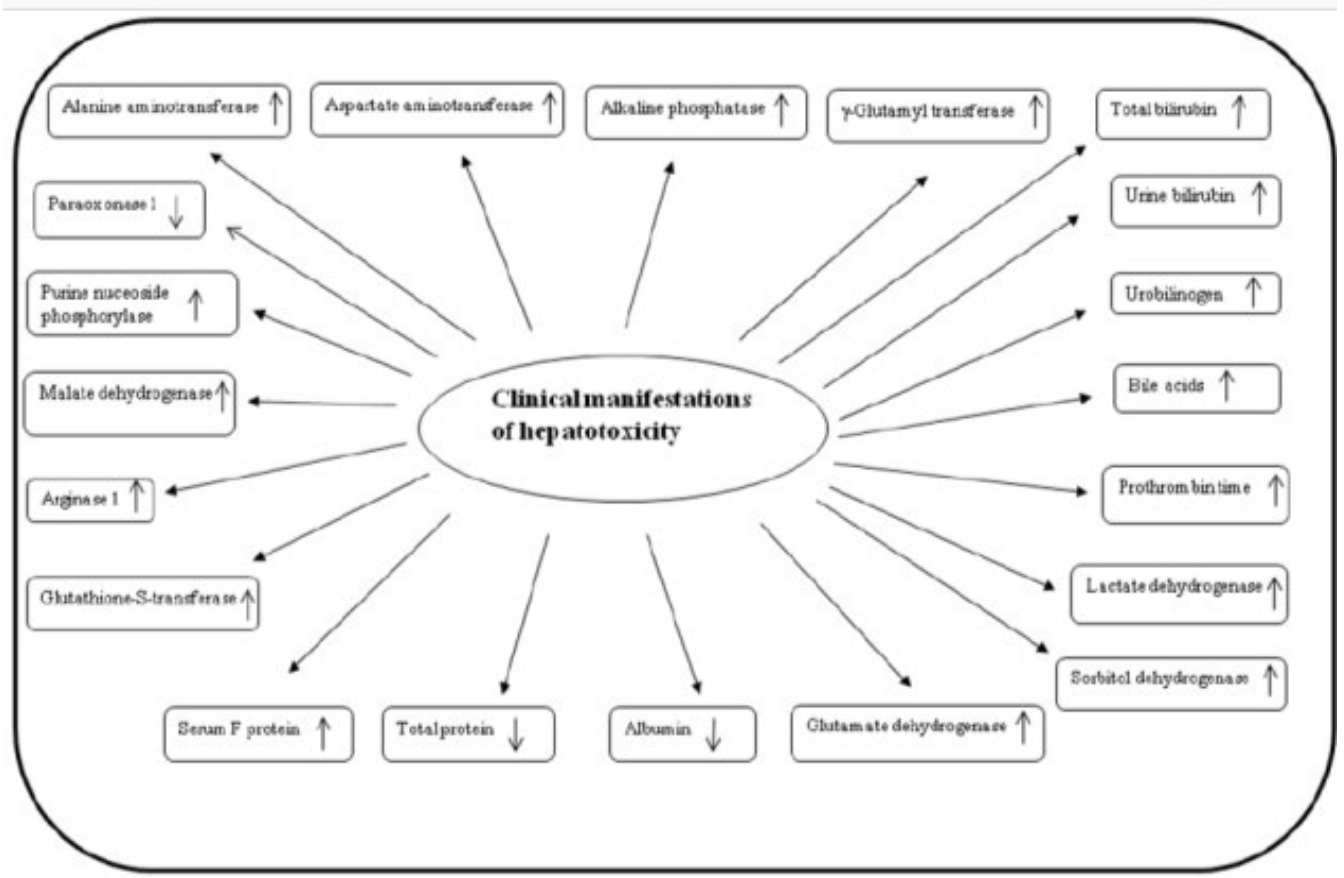
negativa. Los niveles de urobilinogeno en obstrucción biliar con bilirrubina en orina positiva. Esto se observa durante hepatitis viral, daño hepático por alcohol o hemolisis.

- **Lactato deshidrogenasa:** Cataliza la interconversión de piruvato y lactato con interconversión de NADH y NAD<sup>+</sup>. Los niveles elevados de esta enzima se libera cuando hay daño celular, incluso en hígado. Se detecta en necrosis hepatocelular.

- **Glutamato deshidrogenasa:** Está ubicado principalmente en hígado, involucrado en la desaminación oxidativa del glutamato. Su actividad aumenta con el daño hepatocelular.

- **Albumina:** es la principal proteína en sangre y fabricada por el hígado. La hepatotoxicidad conduce a una disminución en su producción. Puede usarse como una prueba suplementaria de función de biosíntesis hepática.

- **Proteínas totales:** La estimación de proteínas totales es útil en la diferenciación entre una función hepática normal y daño de funciones hepáticas, ya que la mayoría de proteínas plasmáticas como albuminas y globulinas son producidas en el hígado. Las proteínas totales se reduce ligeramente, pero la relación de albumina y globulina se muestran disminuidas cuando hay daño hepatocelular.<sup>32</sup>



**Imagen 10. Manifestaciones clínicas de hepatotoxicidad**<sup>32</sup>

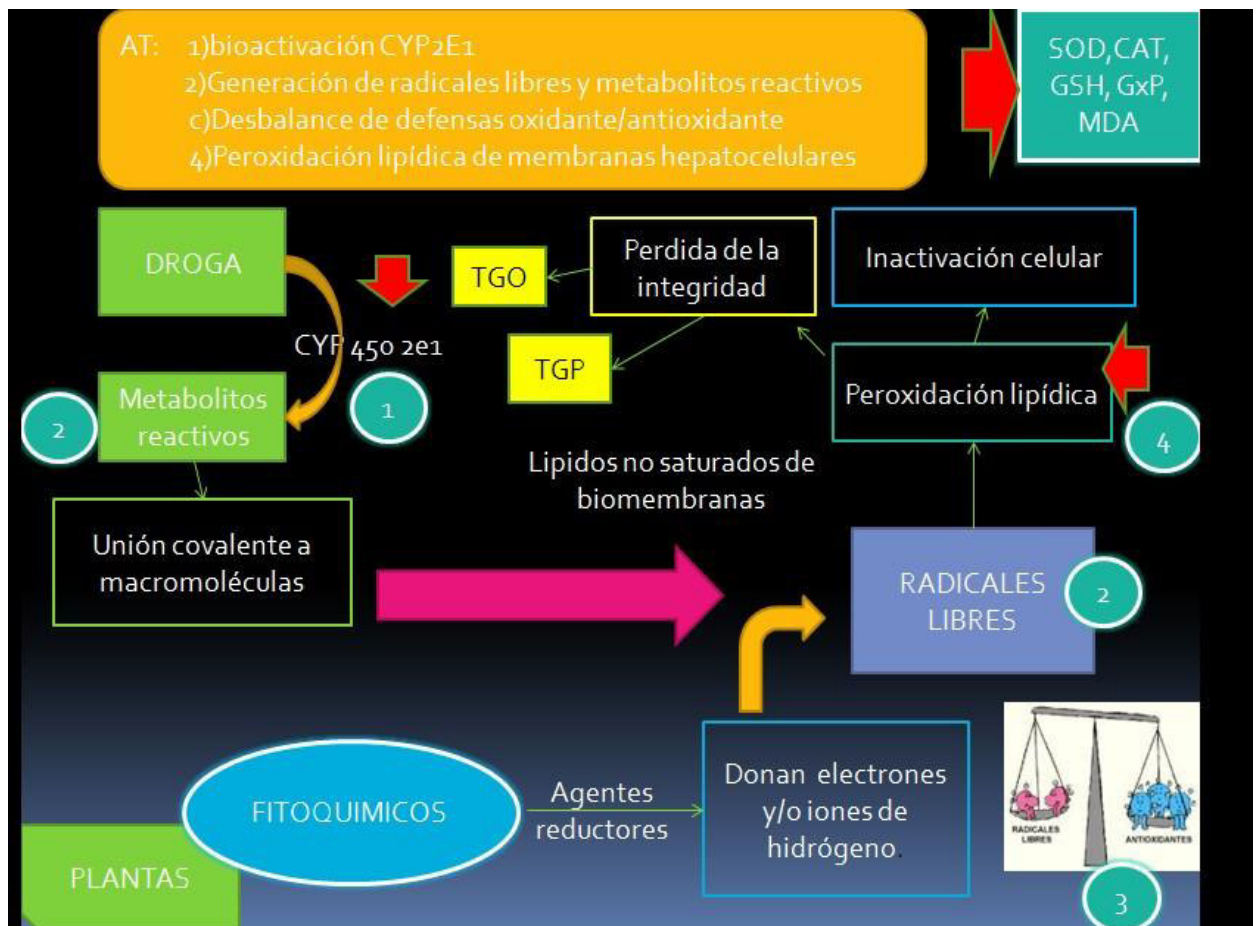
### 2.2.11 Silimarina

Entre los medicamentos a base de hierbas, la silimarina se usa como suplemento dietético para la hepatoprotección durante más de 200 años. La silimarina comercialmente disponible como Milk Thistle es un extracto de las semillas de *Silybum marianum*. Las silibinas (isómeros A y B), isosilinas (A y B), silicristina y silidianina son flavonoides activos presentes en la en el extracto de silimarina. Es segura en modelos animales y no se ha reportado reacciones adversas significativas en estudio con seres humanos.<sup>12</sup>

Eminzade et al. (2008) en estudio realizado en ratas Wistar machos, divididos en 6 grupos de 10 cada uno, grupo 1 (blanco), grupo 2 (silimarina 200mg/Kg vía intragástrica), grupo 3 (isoniacida 50mg/Kg y rifampicina 100 mg/Kg vía intra peritoneal ), grupo 4 (rifampicina 100 mg/Kg, isoniacida 50mg/Kg intraperitoneal y pirazinamida 350mg/Kg vía intragástrica ), grupo 5 y 6 recibieron los mismos fármacos que en el grupo 3 y 4 respectivamente más dosis intragástrica de silimarina 200 mg/Kg. Todos los grupos fueron dosificados por 14 días. Se concluyó que la silimarina tiene una protección significativa contra hepatotoxicidad inducida por drogas usadas para el tratamiento de la tuberculosis.<sup>38</sup>

Se realizó un ensayo controlado aleatorio doble ciego entre enero de 2012 y diciembre de 2012 en la Facultad de Medicina del Hospital Ramathibodi, Universidad de Mahidol, Bangkok, Tailandia. Se iniciaron fármacos antituberculosos con las dosificaciones que se calcularon según el peso corporal del paciente. Los sujetos fueron asignados aleatoriamente a recibir silimarina o placebo (con apariencia similar con el fármaco del estudio) de maneras de asignación ocultas en el primer día de tratamiento antituberculoso. Un comprimido de silimarina (140mg) o placebo se tomó 3 veces al día junto con fármacos antituberculosos. Los pacientes fueron monitoreados por parámetros bioquímicos hepáticos en la semana 2 y 4 después del comienzo del estudio. El ensayo concluyó que la silimarina es eficaz para prevenir la lesión hepática por fármacos antituberculosos sin efectos adversos significativos. La restauración de superóxido dismutasa puede ser uno de los mecanismos que explican el beneficio de la silimarina en la prevención de hepatotoxicidad inducida por medicamentos antituberculosos.<sup>39</sup>

Dicho mecanismo se muestra en el siguiente esquema:



**Imagen 11. Mecanismos de toxicidad por antituberculosos y la acción de silimarina Glutámico oxacélica. TGP: transaminasa glutámico-pirúvica. CAT: catalasa. SOD: superóxido desmutasa. GSH: glutatión. GxP: glutatión peroxidada. MDA: peroxidación lipídica.**

Por otro lado, los productos naturales poseen diversos fitoquímicos capaces de actuar como agentes reductores al ingresar al organismo. Éstos donan electrones y/o iones de hidrógeno a los radicales liberados, estabilizándoles y reduciendo el estrés oxidativo, la peroxidación lipídica de membranas e inactivación celular. Los fitoquímicos pueden también actuar inactivando el citocromo P450 2E1 (disminuyendo la producción de metabolitos reactivos); e incrementando la acción de los sistemas de defensas antioxidantes y hepatoprotectores.



**Imagen 12. Flor y semillas de *Silybum marianum* “Silimarina”**

### **III. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1 Tipo de estudio**

El presente estudio es experimental transversal.

#### **3.2 Muestra**

##### **3.2.1. Identificación**

La clasificación sistemática fue estudiada según el sistema de clasificación de Cronquist (1981), el que se realizó en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. (Anexo 1). El fruto ha sido analizado por la Mg. María La Torre Acuy del Herbario San Marcos, siendo su clasificación taxonómica la siguiente:

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: LILIOPSIDA

SUBCLASE: ZINGIBERIDAE

ORDEN: BROMELIALES

FAMILIA: BROMELIACEAE

GENERO: Ananas

ESPECIE: Ananas comosus (L.) Merr

### **3.2.2. Colecta de la especie.**

El fruto de *Ananas comosus* “piña” se colectó en el distrito de Pichanaqui, Provincia de Chanchamayo, Junín. Chanchamayo, en la selva alta de Junín, la altitud de la provincia varía desde los 700 a 1930 m.s.n.m. en los meses de mayo a junio del 2016. Posteriormente 20 kilos del fruto en buen estado fueron colocados en bolsas de papel y trasladados al laboratorio del Departamento de Bioquímica la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, para su procesamiento.

### **3.3 Conservación de animales de laboratorio.**

Para el ensayo experimental se utilizaron 24 ratas hembras (*Rattus norvegicus*) de 9 semanas de edad con peso promedio 200 a 250 g cepa Holtzmann provenientes del Centro Nacional de Productos Biológicos del Instituto Nacional de Salud, siendo colocadas en jaulas individuales y aclimatados una semana antes de los experimentos en el Bioterio del Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica con una temperatura ambiental controlada que osciló entre 20 y 26 °C, sus alimentos fueron obtenidos del Instituto Nacional de Salud y agua a discreción de los animales (*ad libitum*) y una humedad relativa de 60 a 70 % con 12 horas de luz y oscuridad.

### **3.4 Material Farmacológico**

#### **3.4.1 Tabletas de Isoniacida.**

Se adquirió tabletas de isoniacida 100 mg adquiridas de un establecimiento farmacéutico del mercado local. Para administración oral se molió en mortero 1 tableta y diluida en 10 mL de suero fisiológico para obtener una concentración de 10 mg/mL.

#### **3.4.2 Silimarina**

La suspensión de silimarina se obtuvo a partir de las capsulas de gelatina de Milk Thistle (80 capsulas de 250 mg). Para su preparación, se vertió el contenido de 4 cápsulas en un beaker y se diluyó en 25 mL de suero fisiológico para obtener una concentración de 40 mg/mL.

### **3.5 Materiales en general**

#### **3.5.1 Material de vidrio**

Tubos de ensayos de vidrio

Embudos de vidrio

Beaker 250 mL Fiola de 100 mL

Probeta 250 mL

Gradilla de metal

Frascos de vidrio color ámbar

Cánulas para administración oral a ratas

#### **3.5.2. Equipos**

- Balanza analítica al 0.001g (Mettler Zurich)
- Balanza 0.1 g
- Estufa (Memmert)



- Refrigerador
- Espectrofotómetro
- Equipo de disección

### **3.5.3 Reactivos**

- Kit de diagnóstico de Transaminasa TGO/TGP (Wiener lab)
- Kit de diagnóstico de Bilirrubina (Valtek)
- Kit de diagnóstico de Albúmina y Proteínas totales, reactivo líquido (Far diagnostics)
- Kit de diagnóstico de Gamma Glutamil transferasa (Wiener Lab)
- Alcohol al 96%
- Albúmina sérica de origen bovino, reactivo líquido (Wiener lab)
- Caseína en polvo (Sigma chemical company)

## **3.6 Procedimientos**

### **3.6.1 Obtención del Extracto Etanólico**

De dos kilogramos del fruto de *Ananas comusus* se obtuvo el extracto (500 ml) y luego macerado con 2.5 L de etanol durante siete días con agitación diaria, se repitió el proceso por dos veces.<sup>18</sup> El filtrado se concentró en un evaporador rotatorio (rotavapor) para obtener el extracto etanólico, con el cual se realizó los ensayos químicos (solubilidad, marcha fitoquímica, ensayos cromatográficos) así mismo el extracto se conservó en un frasco ámbar tapado herméticamente en refrigeración.

### **3.6.2 Determinación de la prueba de solubilidad**

Se realizó en solventes de diferente polaridad: n-Hexano, Éter Etilico, Cloroformo, Diclorometano, Acetato de Etilo, Acetona, Butanol, Etanol,

Metanol y Agua. Para el ensayo se pesó 10 mg de extracto al que se agregó 1 mL de solvente.

### **3.6.3 Marcha fitoquímica**

Se pesó 100 mg de extracto etanolico y se realizó las reacciones de identificación de metabolitos secundarios, mediante las técnicas de (Miranda, et al., 1992; Lock de Ugaz, 1994), para reconocer los metabolitos secundarios presentes en el extracto mediante las siguientes reacciones:

Azucares:

Reacción de Molish: A 1 mL de extracto se añadió gotas de reactivo alfa naftol al 1% mezclar bien, luego dejó caer por las paredes del tubo 0.5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, la formación de un anillo coloreado indica presencia de carbohidratos.

Reacción de Benedict: En un tubo de ensayo se colocó 2 mL de reactivo de benedict hervir por 3 minutos y luego agregar 1 mL del extracto mezclar y volver a calentar a ebullición, un precipitado rojo indica presencia de carbohidratos reductores.

Alcaloides:

Dragendorff: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, se agregó gotas de reactivo, un precipitado de color naranja marrón es positivo.

Mayer: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, se agregó gotas de reactivo, un precipitado de color blanco crema es positivo.

Popof: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, se agregó gotas de reactivo, un precipitado de color amarillo es positivo.

Taninos:

Gelatina: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, se agregó gotas de solución de gelatina al 1%, un precipitado de color blanco denso es positivo.

Agua de Bromo: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, se agregó gotas de solución agua de bromo, un precipitado de color blanco denso es positivo.

Aminoácidos libres:

Ninhidrina: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, se agregó gotas de reactivo al 0.1%, un color violáceo es positivo para aminoácidos libres y grupos amino, si la reacción es negativa calentar.

Flavonoides:

Shinoda: en un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, se agregó 1 mg de Mg metálico más gotas de HCl concentrado, un color rojo es positivo para flavonoides, chalconas, auronas.

Compuestos fenólicos:

En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, se agregó gotas de solución de  $\text{FeCl}_3$  al 1%, un color verde o azul es positivo.

Saponinas:

Ensayo de espuma: en un tubo de ensayo se colocó 2 mL de extracto, se agregó 8 mL de agua destilada, agitar fuertemente, la producción de espuma por 15 minutos de 0.5 a 1 cm. es positivo para saponinas

Triterpenos y esteroides:

Lieberman-Burchart: en un tubo de ensayo se colocó 100 mg del extracto se disuelve en 2 mL de cloroformo y se le añadió gotas del reactivo, un color verde, azul o naranja es positivo para triterpenos y esteroides.

Lactonas:

Bajlet: en un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, se agregó gotas de reactivo, una coloración naranja es positivo.

Antronas y naftoquinonas:

Borntrager: en un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, se agregó gotas de reactivo, un precipitado de color rojo es positivo.

En la marcha fitoquímica realizada se encontraron componentes como: azúcares, flavonoides, aminoácidos, compuestos fenólicos, taninos, saponinas y alcaloides; estos coinciden con la literatura.<sup>40</sup>

La enzima bromelina fue analizada para obtener los siguientes datos:

- Curva de calibración: albumina
- Temperatura utilizada: 37°C
- Cantidad probable de bromelina: 4.385 mg/mL de extracto<sup>41,42</sup>

### 3.6.4 Curva de calibración

Se pesaron 4mg de albúmina sérica bovina (BSA) en balanza analítica y se disolvió en 4mL de agua destilada, homogenizando la solución. Se realizó la curva de calibración a partir de diferentes concentraciones de 1- 10 mg/ mL, empleando BSA y agua destilada (buffer), llevándolos a un volumen final de 10mL.

<b>Tabla 1. Disoluciones de BSA</b>		
<b>CONCENTRACION BSA (mg/ mL)</b>	<b>CANTIDAD DE BSA (mL)</b>	<b>CANTIDAD DE BUFFER (mL)</b>
0	0	10
1	1	9
2	2	8
4	4	6
6	6	4
8	8	2
10	10	0

Esta curva se realizó bajo el método de Biuret, donde se añadió el reactivo correspondiente y se dejó actuar por 20 min, originando las siguientes absorbancias a 540 nm en espectrofotómetro:

<b>Tabla 2. Concentración y absorbancias a 540 nm</b>	
<b>CONCENTRACION (mg/mL)</b>	<b>ABSORBANCIA</b>
0	0
1	0.098
2	0.182
4	0.368
6	0.555
8	0.743
10	0.902

De la curva de calibración se obtuvo la ecuación de la recta

$$A = m \times C + b$$

Dónde:

A: Absorbancia

M: pendiente curva de calibración

C: concentración (mg/mL)

B: intersección del valor de absorbancia o del eje “y”

El valor R indica el 99.4% de variabilidad de los datos, el cual es mayor al 70%, por lo tanto el modelo planteado para describir la curva de regresión es robusto. (Anexo N°4)

La concentración de proteínas presente en el extracto crudo se determinó promediando la lectura de 2 muestras, el cual fue 4.385 mg/mL

<b>ABSORBANCIA (nm)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/mL)</b>
<b>0.398</b>	<b>4.29</b>
<b>0.413</b>	<b>4.48</b>
<b>Promedio</b>	<b>4.385</b>

### 3.7 Obtención del extracto acuoso de piña

Se pela el fruto de la piña y fracciona en licuadora, se pasa por tamiz 40 para separar partículas grandes. Luego se vierte en un frasco de vidrio con cierre hermético, se agrega benzoato de sodio como conservante en relación de 0.5g por litro obtenido y se lleva a refrigeración por 7 días. Después se centrifuga a 4000 rpm por 15 minutos, obteniéndose un precipitado color amarillo y se lleva a estufa a 50 °C por 2 días. Finalmente se pesa 4 gramos y se disuelve en 100 mL, obteniendo una concentración de 40mg/mL. (Anexo N°3)

### 3.8 Determinación de la actividad hepatoprotectora

Según Olivares (2015), en primer lugar, se separan un grupo de ratas que no reciban ningún xenobiótico, llamado grupo blanco. En otro grupo, se les administró 50mg/Kg de isoniacida para inducir las a hepatotoxicidad debido a los metabolitos tóxicos de este medicamento. A un tercer grupo además de isoniacida, se administró silimarina por su actividad hepatoprotectora. Y en el último grupo se administró isoniacida y extracto acuoso de piña para comparar cuan efectivo fue el efecto hepatoprotector basándose en los marcadores hepáticos.<sup>61</sup>

**Tabla 3: diseño experimental**

Grupo A	6 ratas que se les administró una dosis diaria de solución salina(1mL) vía cánula gástrica
Grupo B	6 ratas que se les administró una dosis diaria de isoniacida (50 mg/Kg) vía cánula gástrica
Grupo C	6 ratas que se les administró una dosis diaria de silimarina (200mg /Kg) y una hora después recibieron una dosis diaria de isoniacida (50mg/Kg), ambos por vía cánula gástrica
Grupo D	6 ratas que se les administró una dosis diaria de extracto acuoso de <i>piña - Ananas comosus</i> (400mg /Kg) y una hora después recibieron una dosis diaria de isoniacida (50mg/Kg), ambos por vía cánula gástrica

**Tabla 4: esquema de tratamiento de los grupos experimentales**

GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	GRUPO D
Suero fisiológico (1mL)	*H (50mg/Kg)	*H (50mg/Kg)	*H (50mg/Kg)
DESPUES DE 1 HORA			
	Suero fisiológico (1mL)	Silimarina (200 mg/Kg)	*EAP (400 mg/Kg)
* H = isoniacida ** EAP = extracto acuoso de piña			

Al finalizar el experimento, se extrajo 5 mL de sangre arterial por punción cardíaca para el análisis control de gamma glutamil transferasa, alaninoaminotransferasa (ALT) aspartatoaminotransferasa (AST), bilirrubinas totales y fraccionadas; y proteínas totales y albumina.

La sangre obtenida del grupo A se tomará como la medida basal, ya que no estuvo bajo influencia de xenobióticos.

Los animales fueron sacrificados por el método de degollamiento en cámara saturada con **cloroformo**, previo ayuno de 12 horas y se obtuvieron los hígados intactos para el análisis histopatológico.

### 3.8.1 Variables y análisis estadístico

Las variables en este estudio son:

3.8.1.1 Peso de las ratas

3.8.1.2 Pruebas bioquímicas: se midieron los niveles de gamma glutamil transferasa, alanino y aspartatoaminotransferasas (ALT y AST), albumina, proteínas totales y bilirrubina totales.



3.8.1.3 Pruebas histopatológicas: los tejidos hepáticos de los animales serán analizados por los siguientes criterios:

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

3.8.1.3.2. Microscopia: se valoraron a partir del puntaje necroinflamatorio propuesta por Dalaklioglu et al. (2013)<sup>43</sup> que es una escala semicuantitativa con los parámetros: 1) núcleos picnóticos y vacuolización perinuclear, 2) congestión vascular en sinusoides y dilatación sinusoidal y 3) 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.

Se empleó para el análisis de datos el programa SPSS versión 20. Los datos que pertenecen a los criterios clínicos e histopatológicos se analizaron por la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, mientras que los criterios bioquímicos se analizaron por la prueba no paramétrica de Wilcoxon.

#### IV. RESULTADOS

El estudio se llevó a cabo con 24 ratas Holtzman hembras. Se determinó el efecto hepatoprotector de *Ananas comosus* ("Piña") mediante los parámetros: clínico (variación de peso), bioquímicos (perfil hepático) y morfológicos (macroscopía y microscopía)

##### 4.1 Peso de las ratas

No se observó diferencia significativa ( $p= 0.085$ ) en la variación de peso entre los grupos experimentales analizado por la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

PESO (g)	Grupo A (solución salina)	Grupo B H (50)**	Grupo C H (50) + SIL (200)**	Grupo D H (50) + EAP (400)**	P
Basal	223,5 ±15,8	235,5±14,5	215,7±12,8	224,2±15,1	0,284
Final	225,9 ±16,5	215,6±10,3	218,3±12,5	223,4±12	0,145
Diferencia	2,4 ±1,3	-19,9 ±7,5	2,6 ±1,2	-0,8 ±5,6	0,085

\*H= isoniacida, SIL = silimarina, EAP = extracto acuoso de piña  
\*\*\*P valor, se considera significativo  $P<0.05$

##### 4.2 Pruebas bioquímicas

Los análisis bioquímicos de perfil hepático que se realizaron son: albumina, proteínas totales, bilirrubina directa, bilirrubina total, alaninoaminotransferasa (ALT), aspartatoaminotransferasa (AST), gamma glutamiltranspeptidasa (GGT).

#### 4.2.1 Albúmina

Comparando el grupo blanco con los grupos B y C existe una diferencia significativa (P. Wilcoxon  $p=0.028$  para ambos) contrariamente con el grupo D (P. Wilcoxon  $p=0.173$ )

Tabla 6. Efecto del extracto acuoso de piña en los niveles de albúmina sérica de los animales en la toxicidad hepática inducida por isoniacida				
Albumina (g/dL)	Grupo A (solución salina)	Grupo B H (50)**	Grupo C H (50) + SIL (200)**	Grupo D H (50) + EAP (400)
Resultado	8,2±1,5	3,8 ±0,3	4,5±0,6	9,7 ±1,3
Diferencia (blanco)	-	4,5±1,37	3,7 ±1,1	-1,5±2,4
Wilcoxon	-	0,028	0,028	0,173

\*H= isoniacida, SIL = silimarina, EAP = extracto acuoso de piña  
\*\*P valor, se considera significativo  $P<0.05$

#### 4.2.2 Proteínas totales

La medición de proteínas totales fue parecida entre los grupos A y D. En comparación del grupo blanco con los grupos B y C, éstos disminuyeron sus valores, hallándose una diferencia significativa (P. Wilcoxon  $p=0.046$  para ambos) y no existe una diferencia significativa con el grupo D (P. Wilcoxon  $p=0.917$ )

Proteínas totales (g/dL)	Grupo A (solución salina)	Grupo B H (50)**	Grupo C H (50) + SIL (200)**	Grupo D H (50) + EAP (400)
Resultado	9,4±2,6	6,7±1	7,1±2	9,4±1,1
Diferencia (blanco)	-	2,7 ±2,2	2,2±2	-0,03±2,1
Wilcoxon	-	0,046	0,046	0,917

\*H= isoniacida, SIL = silimarina, EAP = extracto acuoso de piña  
 \*\*P valor, se considera significativo P<0.05

#### 4.2.3 Bilirrubina directa

Las medias en los grupos A y D son similares, con un ligero aumento en el grupo C. No se observó diferencia significativa entre los grupos (P. Wilcoxon p=0.075, p=0.116 y p=0.753.

Bilirrubina directa (mg/dL)	Grupo A (solución salina)	Grupo B H (50)	Grupo C H (50) + SIL (200)	Grupo D H (50) + EAP (400)
Resultado	0,3±0,2	0,9±0,7	0,5±0,3	0,4±0,3
Diferencia (blanco)	-	0,5±0,6	0,2±0,3	0,1 ±0,4
Wilcoxon	-	0,075	0,116	0,753

\*H= isoniacida, SIL = silimarina, EAP = extracto acuoso de piña  
 \*\*P valor, se considera significativo P<0.05

#### 4.2.4 Bilirrubina total

Las medias de los grupos C y D son similares, con un aumento significativo en el grupo B. Comparando el grupo control, se obtuvo una diferencia significativa con los grupos B y C (P. Wilcoxon  $p= 0.028$  y  $0.046$  respectivamente), pero no se observó una diferencia significativa con el grupo D P. Wilcoxon  $p= 0.345$ ).

Tabla 9. Efecto del extracto acuoso de piña en los niveles de bilirrubina total sérica de los animales en la toxicidad hepática inducida por isoniacida				
Bilirrubina total (mg/dL)	Grupo A (solución salina)	Grupo B H (50)**	Grupo C H (50) + SIL (200)**	Grupo D H (50) + EAP (400)
Resultado	0,6±0,5	2,5±0,9	1,2±0,5	1,4±1,2
Diferencia (blanco)	-	1,9±1	0,7±0,6	0,8±1,6
Wilcoxon	-	0,028	0,045	0,046

\*H= isoniacida, SIL = silimarina, EAP = extracto acuoso de piña  
 \*\*P valor, se considera significativo  $P<0.05$

#### 4.2.5 Gamma glutamil transpeptidasa (GGT)

Las medias de los grupos A y D fueron similares, ligeramente aumentadas en el grupo B. Al comparar el grupo control con los grupos B, C y D no se determinaron diferencias significativas (P. Wilcoxon  $p= 0.46$ ,  $p= 0.115$  y  $p=0.916$  respectivamente)

Tabla 10. Efecto del extracto acuoso de piña en los niveles de gamma glutamiltranspeptidasa sérica de los animales en la toxicidad hepática inducida por isoniacida				
Gamma glutamil transpeptidasa (U/L)	Grupo A (solución salina)	Grupo B H (50)	Grupo C H (50) + SIL (200)	Grupo D H (50) + EAP (400)
Resultado	3,2±1,8	5,5±2,5	4,1±1,3	3,1±1,2
Diferencia (blanco)	-	2,3±1,5	0,9±1,3	-0,05±1,4
Wilcoxon	-	0,46	0,115	0,916

\*H= isoniacida, SIL = silimarina, EAP = extracto acuoso de piña  
 \*\*P valor, se considera significativo  $P<0.05$

#### 4.2.6 Aspartatoaminotransferasa (AST)

Se halló diferencia significativa del grupo B (P. Wilcoxon,  $p=0,046$ ) y en el grupo C (P. Wilcoxon,  $p=0,046$ ) con el grupo blanco. Sin embargo, la concentración de AST en el grupo D no fue significativa (P. Wilcoxon  $p=0,893$ ). Comparando los grupos B y D existe una diferencia significativa ( $p$  Wilcoxon,  $p= 0,046$ ), evidenciando una disminución aproximadamente a nivel del grupo blanco.

Tabla 11. Efecto del extracto acuoso de piña en los niveles aspartatoaminotransferasa (AST) sérica de los animales en la toxicidad hepática inducida por isoniacida				
Aspartatoaminotransferasa (U/L)	Grupo A (solución salina)	Grupo B H (50)**	Grupo C H (50) + SIL (200)**	Grupo D H (50) + EAP (400)**
Resultado	228,2± 101,6	495,17± 205,5	357,2 ± 63,7	225,2± 56,1
Diferencia (blanco)	-	263,54±1 2,5	131± 17,8	3± 21,4
Wilcoxon	-	0,046	0,046	0,893
Vs Grupo D	-	0,046	0,046	-
*H= isoniacida, SIL = silimarina, EAP = extracto acuoso de piña **P valor, se considera significativo $P<0.05$				

#### 4.2.7 Alaninoaminotransferasa (ALT)

Las concentraciones de ALT en los grupos C y D, fueron similares. Hubo diferencia significativa en los grupos B y C y D ( $p$ . Wilcoxon  $p= 0.025$  y  $p= 0.043$  respectivamente) lo cual demuestra la reducción de ALT aproximadamente a la concentración del grupo blanco

Tabla 12. Efecto del extracto acuoso de piña en los niveles de alaninoaminotrasferasa (ALT) sérica de los animales en la toxicidad hepática inducida por isoniacida

transaminasa glutámico pirúvica (U/L)	Grupo A (solución salina)	Grupo B H (50)**	Grupo C H (50) + SIL (200)**	Grupo D H (50) + EAP (400)
Resultado	44,4± 5,3	89,5±10,3	58,4± 7,9	57± 6,9
Diferencia (blanco)	-	32,2±17,5	9,8± 15,2	10,7± 28,3
Wilcoxon	-	0,020	0,043	0,079

\*H= isoniacida, SIL = silimarina, EAP = extracto acuoso de piña  
 \*\*P valor, se considera significativo P<0.05

### 4.3 Macroscopia hepática

#### 4.3.1 Aspecto

Grupo A: los hígados mostraron un color rojo vinoso, aspecto normal y sin lesiones aparentes

Grupo B: los hígados mostraron un aspecto moderadamente congestivo y un color rojo pálido con áreas moteadas y algunas azul violetas

Grupo C: los hígados mostraron aspecto similar al normal y un color rojo pálido

Grupo D: los hígados mostraron un aspecto similar al normal y un color rojo pálido con áreas moteadas



figura A



figura B



figura C



figura D

**Figura 13. Hígados extraídos**

#### 4.3.2 Peso

Las medias del grupo control fue de 6 g  $\pm$ 0.89, en el grupo B 7.83 g  $\pm$ 0.75, en el grupo C 7.83 g  $\pm$  0.98 y en el grupo D fue 7 g  $\pm$  0.89. Se encontró una diferencia significativa en los grupos experimentales (P. Kruskall Wallis p= 0.016)

Tabla 13. Efecto del extracto acuoso de piña en el peso de los hígados en la toxicidad hepática inducida por isoniacida

	Grupo A (solución salina)	Grupo B H (50)**	Grupo C H (50) + SIL (200)**	Grupo D H (50) + EAP (400)**
Peso (g)	6 $\pm$ 0,9	7,8 $\pm$ 0,8	7,8 $\pm$ 1	7 $\pm$ 0,9

Kruskall Wallis 0,016

\*H= isoniacida, SIL = silimarina, EAP = extracto acuoso de piña

\*\*P valor, se considera significativo P<0.05



### 4.3.3 Largo

Se determinó una media en el grupo A de 4.81cm  $\pm$ 0.58, el grupo B 5.36 cm  $\pm$ 0.29, en el grupo C 4.8 cm  $\pm$  0.4 y en el grupo D 4.41 cm  $\pm$ 0.49. Se halló una diferencia significativa entre los grupos (P. Kruskall Wallis  $p=$  0.037)

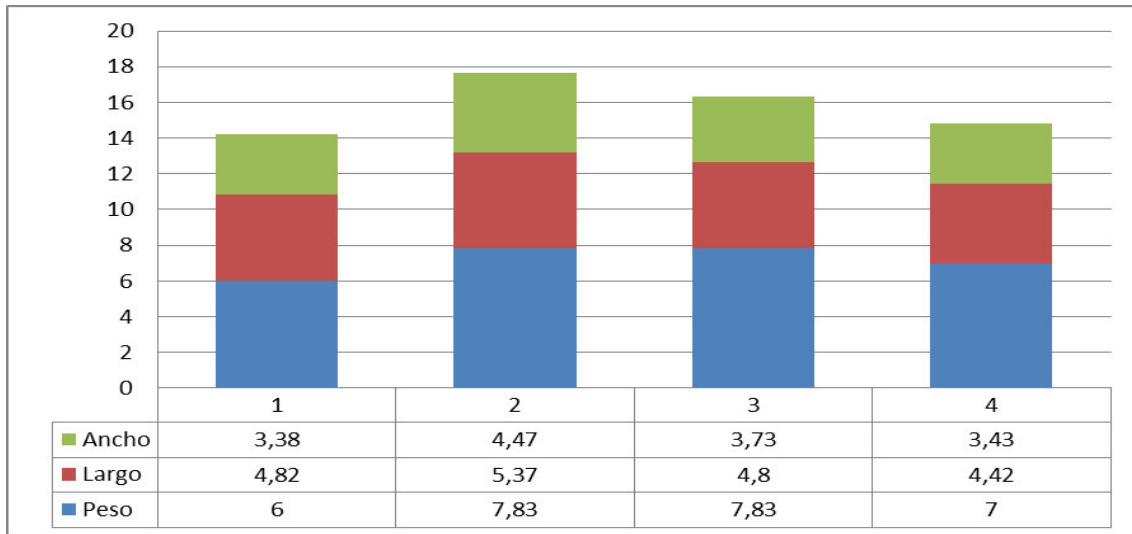
Tabla 14. Efecto del extracto acuoso de piña en el largo de los hígados en la toxicidad hepática inducida por isoniacida				
	Grupo A (solución salina)	Grupo B H (50)**	Grupo C H (50) + SIL (200)**	Grupo D H (50) + EAP (400)**
Largo (cm)	4,8 $\pm$ 0,6	5,4 $\pm$ 0,3	4,8 $\pm$ 0,4	4,4 $\pm$ 0,5
Kruskall Wallis	0,02			
*H= isoniacida, SIL = silimarina, EAP = extracto acuoso de piña **P valor, se considera significativo $P<0.05$				

### 4.3.4 Ancho

Se observó en el grupo A una media de 3.38 cm  $\pm$  0.77, en el grupo B 4.46 cm  $\pm$  0.49, grupo C 3.73 cm  $\pm$  0.41 y en el grupo D 3.43 cm  $\pm$  0.71. Se halló una diferencia significativa entre los grupos experimentales (P. Kruskall Wallis  $p=$  0.037)

Tabla 15. Efecto del extracto acuoso de piña en el ancho de los hígados en la toxicidad hepática inducida por isoniacida				
	Grupo A control (solución salina)	Grupo B H (50)**	Grupo C H (50) + SIL (200)**	Grupo D H (50) + EAP (400)**
Ancho(cm)	3,4 $\pm$ 0,8	4,5 $\pm$ 0,5	3,7 $\pm$ 0,4	3,4 $\pm$ 0,7
Kruskall Wallis	0,037			
*H= isoniacida, SIL = silimarina, EAP = extracto acuoso de piña **P valor, se considera significativo $P<0.05$				

**Gráfico 1. Comparación de los promedios de peso, largo y ancho de los hígados entre los grupos experimentales**



#### 4.4 Microscopia hepática

Los hígados fueron analizados con la ayuda del Dr. Carlos Gonzalez Muller, realizados en Instituto de Patología Ciencia S.A.C., en microscopio Olympus CX41 objetivo x40 ocular WHB 10X-H/20.

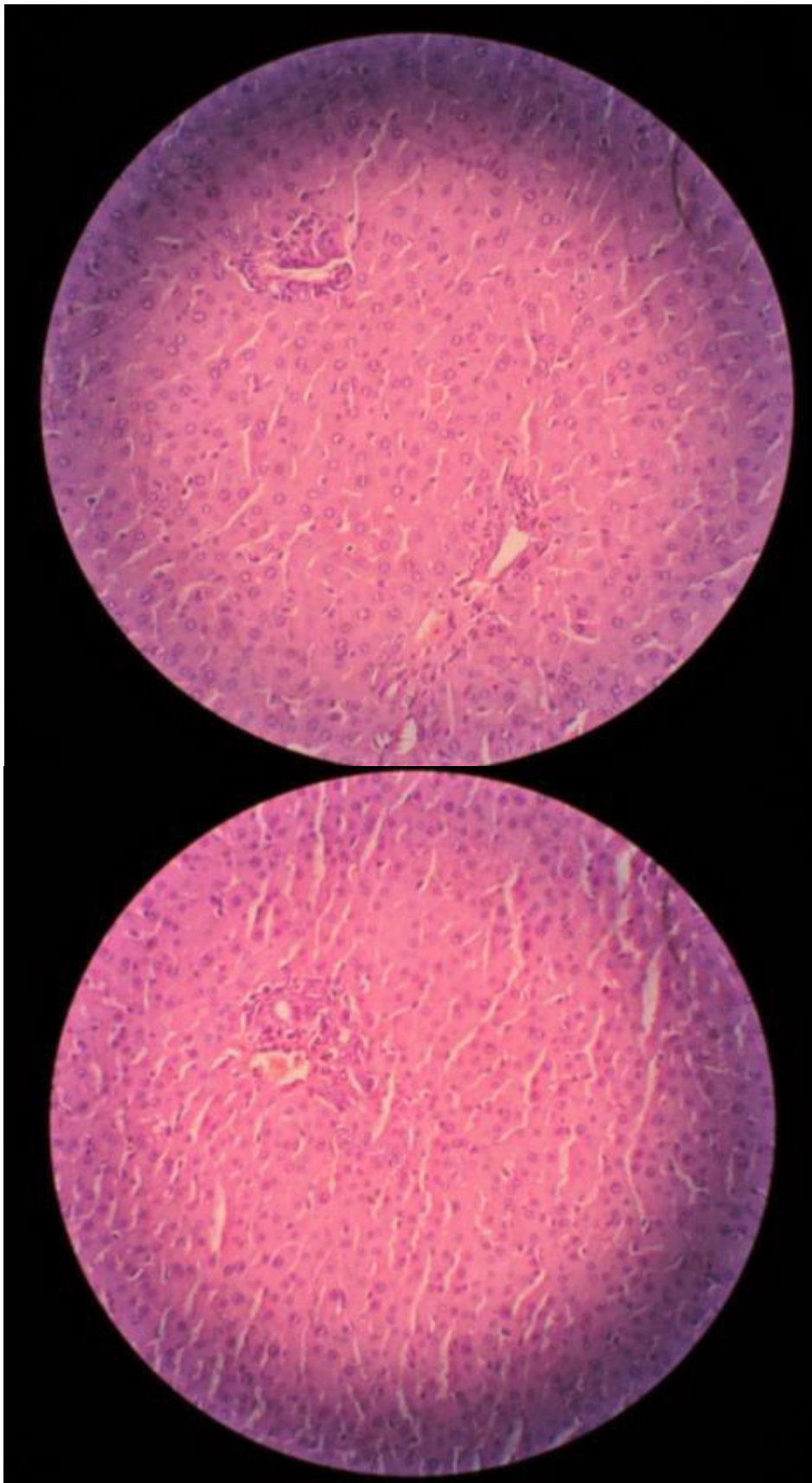
Grupo A: el tejido hepático presentó arquitectura y espacio porta normal (Figura 40x)

Grupo B: Se halló marcada vacuolización perilobulillar que altera la arquitectura normal del hepatocito, congestión vascular sinusoidal, dilatación sinusoidal e inflamación centrolobulillar (40x) y espacio porta con abundantes células de Kupffer activadas (40x)

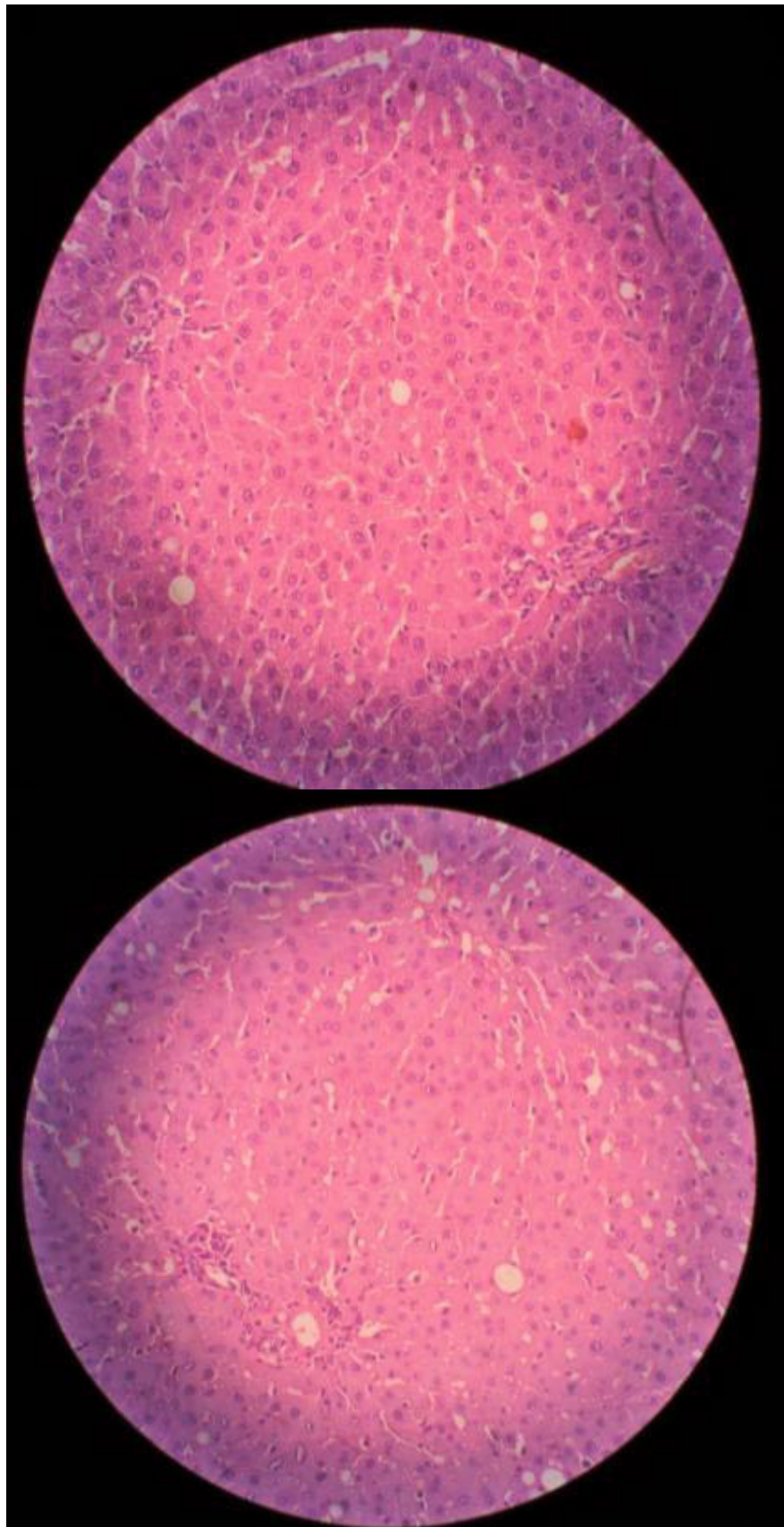
Grupo C: Se halló moderada congestión vascular sinusoidal, dilatación sinusoidal y conservación de la arquitectura normal hepática. (40x) y espacio porta normales (40x).

Grupo D: los hallazgos fueron comparables con los del grupo C y A, encontrándose estructura hepática conservada (Figura 40x) y espacio porta normal (40x)

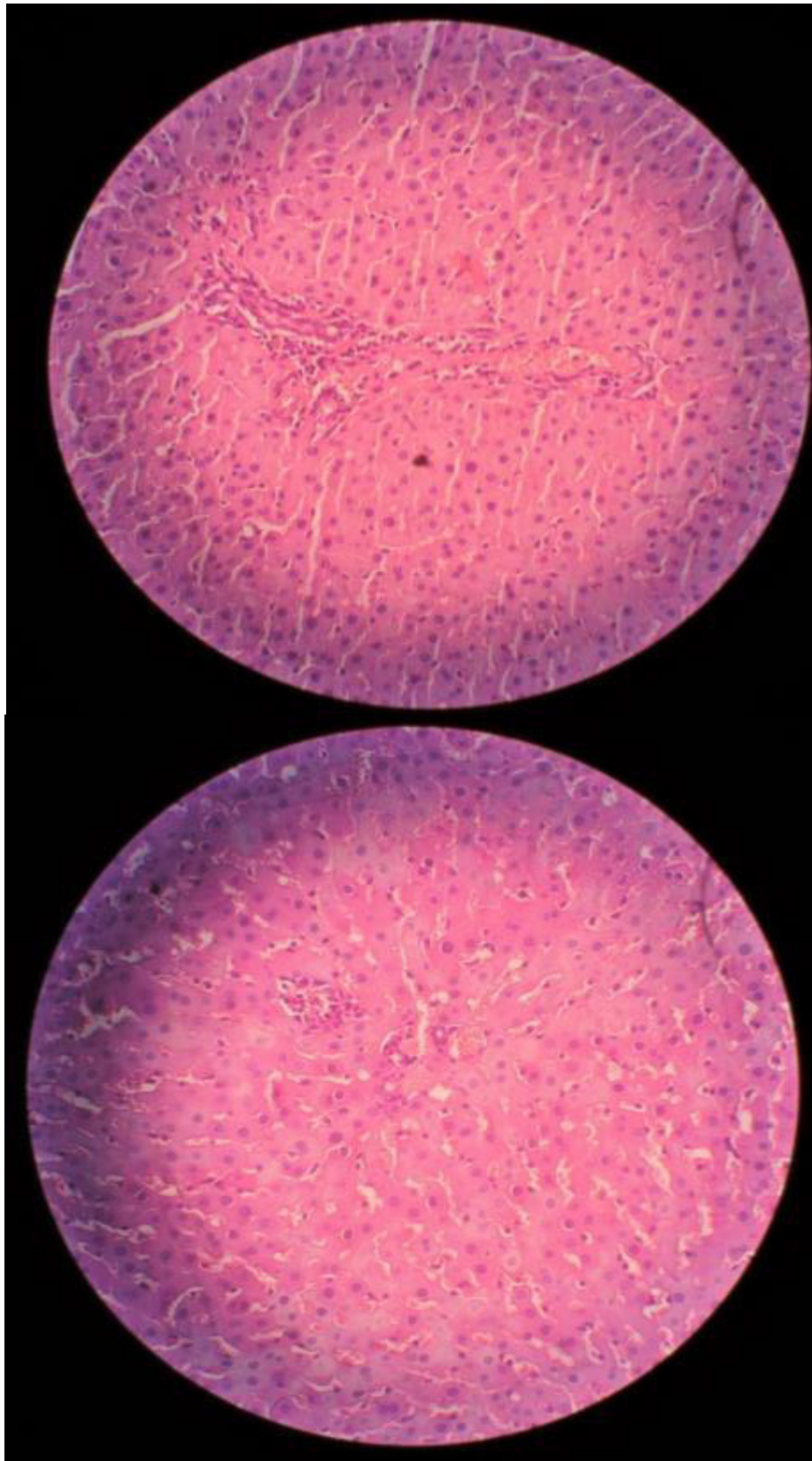
**Figuras 14 y 15. Análisis histológico de hígados del grupo control (40x)**



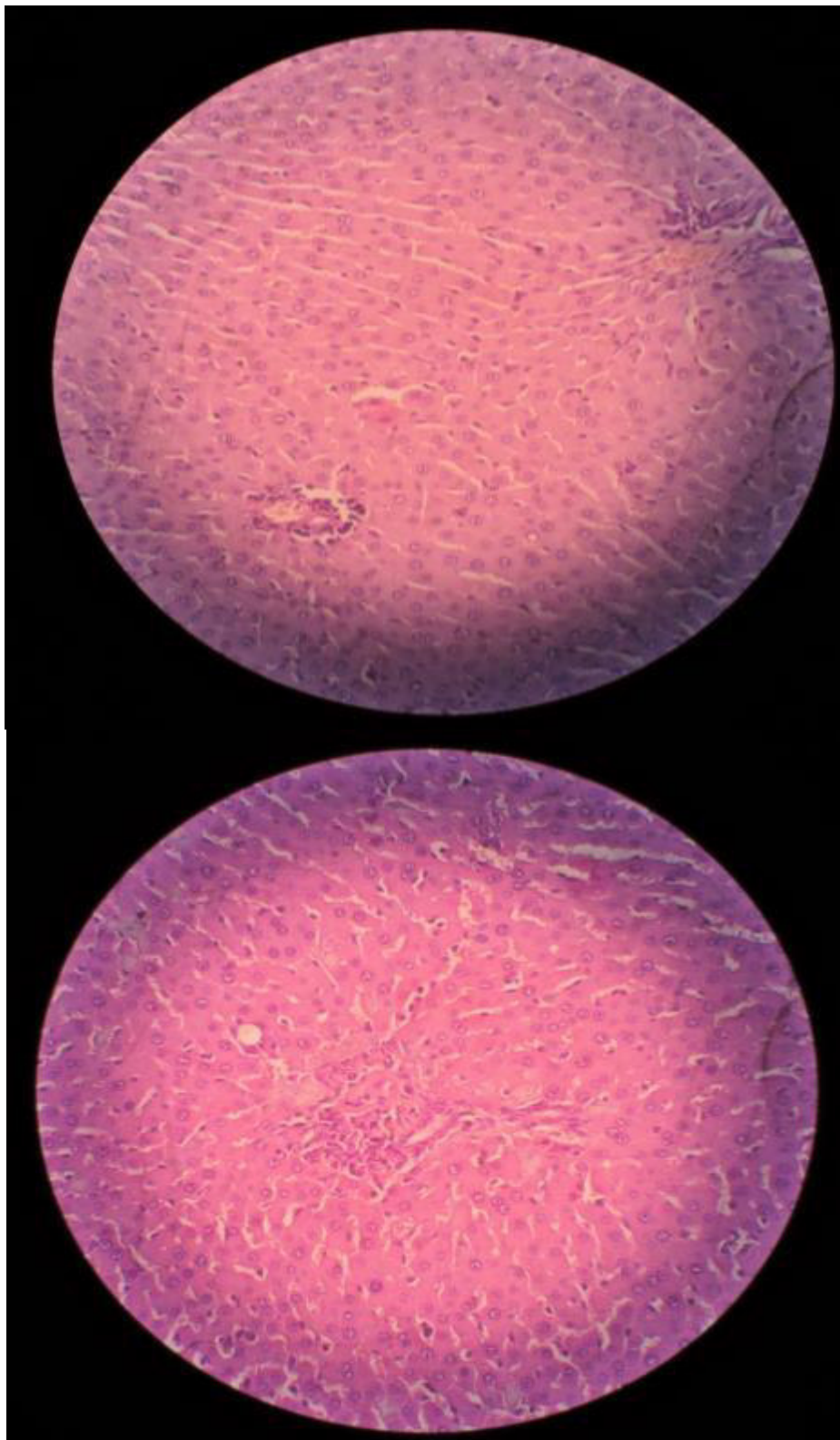
**Figuras 16 y 17. Análisis histológico de hígados del grupo tratado con isoniacida (40x)**



**Figuras 18 y 19. Análisis histológico de hígados del grupo tratado con isoniacida más silimarina (40x)**



**Figuras 20 y 21. Análisis histológico de hígados del grupo tratado con isoniacida más extracto de piña (40x)**



#### 4.4.1 Puntaje necroinflamatorio

Se asignó un puntaje necro inflamatorio a cada lámina en escala semicuantitativa previamente descrita, se halló una media de  $0.67 \pm 0.81$  para el grupo A;  $0.47 \pm 1.33$  para el grupo B; de  $3.33 \pm 1.37$  para el grupo C y de  $1.67 \pm 0.51$  para el grupo D.

Se observó diferencia significativa en los grupos experimentales (P. Kruskall Wallis,  $p= 0.001$ )

	Grupo A control (solución salina)	Grupo B H (50)**	Grupo C H (50) + SIL (200)**	Grupo D H (50) + EAP (400)**
Puntaje	$0,7 \pm 0,8$	$4,2 \pm 1,3$	$3,3 \pm 1,4$	$1,7 \pm 0,5$
Kruskall Wallis	0,001			
*H= isoniacida, SIL = silimarina, EAP = extracto acuoso de piña				
**P valor, se considera significativo $P < 0.05$				

## V. DISCUSION

En la presente investigación se buscó determinar el efecto hepatoprotector del extracto acuoso de piña en la toxicidad hepática inducida por isoniacida en ratas Holtzman hembra.

Para efectos terapéuticos del extracto acuoso de piña, sin llegar a efectos tóxicos, se estableció emplear la dosis de 400 mg por kilogramo de peso ya que se encontró que la dosis letal media es de 1gramo por kilogramo en peso.<sup>19</sup>

Se utilizó un extracto acuoso y no uno alcohólico por el riesgo de éste de producir hepatotoxicidad.<sup>52</sup>

La mayoría de estudios de toxicidad de antituberculosos se realizaron en ratas, como en el estudio de Sude et al.<sup>9</sup>, ya que han logrado reproducir el proceso hepatotóxico. Sin embargo, algunos autores como Hassan et al<sup>54</sup>, °dieron a conocer a los conejos como mejores modelos experimentales, debido a su alta sensibilidad de daño hepático inducido por isoniacida.

Se eligió la administración del esquema de experimentación por vía intragástrica, porque emula los procesos de absorción y hacer lo más real posible el proceso de toxicidad hepática y pueda ser comparada en humanos. No se empleó la vía intraperitoneal con tabletas molidas y diluidas debido a los excipientes que podrían interactuar de forma negativa, porque no es la vía de administración adecuada.<sup>11</sup>

En la presente investigación se administró una dosis de isoniacida 50 mg/Kg de peso para inducir hepatotoxicidad, ya que en la biotransformación de este fármaco en fase I se producen metabolitos como: acetilisoniacida, ácido isonicotínico, hidracina y acetilhidrazina, siendo estos 2 últimos los responsables de esta patología.<sup>35</sup>



Nuestros resultados con respecto al peso de las ratas, en los grupos A y C los animales aumentaron ligeramente en peso y en grupo B disminuyeron por falta de apetito. Sin embargo, no hubo diferencia significativa (P. Kruskal Wallis  $p= 0.085$ ) con referencia en la tabla 5.

En el análisis del perfil hepático, se observó en albúmina y proteínas totales menor cantidad a comparación de los grupos A, C y D. (tablas 6 y 7). En estos parámetros, existe una diferencia significativa, que infiere un mayor daño hepático en el grupo B que en los demás grupos, porque el daño hepático genera una disminución en su producción, como en la hepatitis inducida por medicamentos.

Se demuestra la hepatotoxicidad a nivel celular en el grupo B, como se describe en la literatura, aspartato y alaninoaminotransferasas (AST y ALT respectivamente) son indicadores de daño hepatocelular, siendo este último el más específico, debido a que se localiza casi exclusivamente en el citosol del hepatocito, mientras que la AST, además del citosol y mitocondria, se encuentra en el corazón, músculo esquelético, riñones, cerebro, páncreas, pulmón, eritrocitos y leucocitos.<sup>58</sup>

El La ALT se encuentra elevado dos veces por encima del valor normal, pero la literatura indica que la toxicidad hepática por isoniacida el valor es tres veces más. Esta variación pudo haber ocurrido por una rápida depuración de los metabolitos tóxicos, dosis insuficiente de isoniacida o falta de mayor tiempo de administración (mayor de 14 días) lo cual no llegó a estresar adecuadamente el hígado.

En contraste, la bilirrubina directa y gamma glutamil transpeptidasa mostraron una ligera elevación pero no significativa del grupo B a comparación del resto de grupos, por el poco efecto que tuvo la

intoxicación hepática con isoniacida sobre conductos biliares, ya que ambos son indicadores de daño biliar/conducto biliar/colestasis mas no de daño hepático en sí.<sup>62</sup>

La macroscopía hepática del grupo B, tuvieron aspecto congestivo, color rojo pálido con áreas moteadas y su tamaño y peso fueron superiores a los demás grupos. 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.<sup>55</sup>

La toxicidad hepática inducida por isoniazida se evidencia, generalmente, como degeneración balonada, necrosis focal y mínimos cambios colestásicos; pudiendo encontrarse también degeneración grasa microvesicular. Ello fue corroborado por el trabajo realizado por Kalra et al.<sup>56</sup>

En la presente investigación, los cambios histopatológicos hallados fueron: vacuolización perinuclear, congestión vascular sinusoidal, dilatación sinusoidal, 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 determinado a cada grupo experimental fue mayor en el grupo B en comparación con los grupos A, C y D, en consecuencia a la mayor cantidad de alteraciones en la morfología hepática. (Tabla 16)

El efecto hepatoprotector de la piña fue evaluado en otros estudios, como Okafor et al.<sup>59</sup>, donde se observó que el tratamiento de ratas

inducidas a estrés oxidativo con alcohol etílico por 28 días y tratadas con extracto de cáscara de piña a 2,5 ml / kg pc causó una disminución significativa en los niveles de AST (99,8%). Además se observó que el nivel de ALT aumentaba con el tratamiento con extracto de cáscara de piña a 2,5 ml / kg pc. Sin embargo, el tratamiento con una dosis doble (5,0 ml / kg pc) causó una disminución de 10,06%.<sup>59</sup> Comparando con esta tesis, hubo también una disminución significativa de aminotransferasas, lo que reafirma su actividad hepatoprotectora

Los niveles de AST y ALT en los grupos experimentales A y D fueron aproximados. Esto demuestra que el extracto de piña posee propiedades moduladoras sobre los marcadores hepáticos. (Tablas 11 y 12)

Mohamad et al.<sup>60</sup>, investigaron el cambio o la pérdida de la integridad estructural por paracetamol en hepatocitos de ratas causan que las enzimas residuales, como ALT y AST, escapen y aumentaran sus concentraciones en la sangre. La administración de vinagre de piña causó disminución en los niveles de triglicéridos y transaminasas, por tanto mostró un efecto hepatoprotector y restableció la estructura de los hepatocitos, disminuyendo así los niveles de triglicéridos en sangre y reduciendo el desarrollo de esteatosis microvesicular y vacuolización en los tejidos hepático, al igual que los resultados obtenidos en microscopía.

La actividad hepatoprotectora frente a la toxicidad por isoniacida se evaluó en un estudio hecho por Busto Bea y Herrero Quirós<sup>62</sup> sobre los efectos del resveratrol (RSV) en la hepatotoxicidad causada por INH y RIF en ratones, donde se indujo una lesión hepática aguda (3 días) o crónica (28 días) en ratones BALB / c machos co-administrando isoniacida (INH) y rifampicina (RIF). El RSV se dosificó 30 minutos antes de INH-RIF. Las pruebas bioquímicas en suero, el examen histopatológico del hígado, el estrés oxidativo, la actividad de MPO, la

producción de citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-12p70 e IL-10) y la expresión de RNA de CYP2E1, SIRT1-1 y 7 y PPAR- $\gamma$  / PGC1- $\alpha$  fueron evaluados. Los resultados indican que el tratamiento agudo o crónico con INH más RIF indujo hepatotoxicidad en ratones. El RSV disminuyó significativamente los niveles de ALT y AST, la actividad de MPO y los niveles de citoquinas. Además, el RSV revertió la disminución de las actividades de catalasa y glutatión, y mejoró las alteraciones histopatológicas asociadas a los fármacos antituberculosos. Los datos muestran que el RSV fue capaz de prevenir en gran medida la hepatotoxicidad inducida por INH y RIF en ratones, principalmente mediante la modulación de la expresión de mRNA SIRT1, SIRT7 y CYP2E1.

Yogeeta et al.<sup>63</sup> administraron isoniacida y rifampicina (cada una a dosis de 50 mg/Kg de peso corporal, por vía intraperitoneal) en ratas Wistar durante 15 días, lo que causó lesión hepática en ratas, manifestándose por elevación significativa en el nivel de peróxidos lipídicos, enzimas marcadoras hepáticas séricas (glutamato oxaloacetato transaminasa, glutamato piruvato transaminasa, lactato deshidrogenasa, fosfatasa alcalina) y por una disminución significativa de los antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión S-transferasa, glutatión peroxidasa). El tratamiento conjunto con 70% de extracto de acetona de los frutos de *Punica granatum* impidieron significativamente estas alteraciones y restauraron las actividades enzimáticas y los peróxidos lipídicos casi a la normalidad.

El efecto hepatoprotector del extracto acuoso de piña se debe a vitamina C, betacaroteno y compuestos fenólicos que poseen capacidad antioxidante, evaluado por comparación entre plátano, mango y papaya.

<sup>67</sup>.

Se evidencia que el plasminógeno, que es activado a la plasmina por la administración oral de bromelina, inhibe la liberación de ácido araquidónico a partir de las membranas celulares, dando como resultado una disminución de la agregación plaquetaria y la modulación de las prostaglandinas de la serie 2. También se hipotetiza que la terapia con bromelina conduce a un aumento relativo de las prostaglandinas endógenas, PGI<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub> sobre tromboxano A<sub>2</sub>.<sup>66</sup>

Se ha demostrado que la bromelaína elimina las moléculas CD44 de las células T de los linfocitos y afecta la activación de las células T. La proteasa F9 de bromelina altamente purificada se ensayó en la adhesión de linfocitos de sangre periférica (PBL) a células endoteliales de venas umbilicales humanas (HUVEC). Tanto la bromelaína como la proteasa F9 reducían la expresión de CD44, pero F9 era aproximadamente 10 veces más activa que la bromelina; teniendo aproximadamente un 97% de inhibición de la expresión de CD44. Los resultados indican que F9 disminuye selectivamente la unión mediada por CD44 de PBL a HUVEC.

64

Además la bromelina actúa inhibiendo la síntesis las citoquinas IL-2, IL-4 e IL-8 e interferón gamma (INF-). Por lo tanto previene el proceso inflamatorio y la migración de leucocitos.<sup>3,8</sup>

## VI. CONCLUSIONES

1. El extracto acuoso de *Ananas comosus* (piña) posee efecto hepatoprotector en la toxicidad hepática inducida por isoniácida en ratas Holtzman hembra, según pruebas bioquímicas e histopatológicas.
2. El grupo tratado con isoniácida y silimarina presentó injuria hepática moderada, que fue amortiguada por la acción de la silimarina como hepatoprotector reflejado en la diferencia significativa de bilirrubina total ( $p=0.046$ ), alaninoaminotransferasa ( $p=0.043$ ); albúmina ( $p=0.028$ ) y proteínas totales ( $p=0.046$ ).
3. El grupo tratado con isoniácida y extracto acuoso de piña presentó daños hepáticos menores debido a la acción del extracto acuoso de piña, ya que existe diferencia significativa en albúmina ( $p=0.028$ ), proteínas totales ( $p=0.046$ ), aspartatoaminotransferasa ( $p=0.046$ ) y alaninoaminotransferasa ( $P=0.02$ ) comparando con el grupo tratado con isoniácida.
4. Los análisis macroscópicos y microscópicos hepáticos en el grupo tratado con isoniácida y extracto acuoso de piña indican una regeneración de la estructura del hepatocito.

## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Realizar estudios de eficacia y seguridad del extracto acuoso de piña a diferentes dosis.
2. Realizar análisis bioquímicos complementarios para un mejor entendimiento de la toxicidad hepática, determinando lactato deshidrogenasa, superóxido dismutasa y glutatión reducido.
3. Usar extracto etanólico y adicionalmente emplear acetona refrigerada para obtener un rendimiento máximo en la extracción de bromelina en las pruebas in vitro.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OMS. Global Tuberculosis Report 20th edition. WHO. 2015. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>
2. Ley de Prevención y Control De La Tuberculosis en el Perú, 2014. [http://www2.congreso.gob.pe/Sicr/RelatAgenda/proapro20112016.nsf/ProyectosAprobadosPortal/CEDED676DF4252E105257D970077620E/\\$FILE/AU01151211114.pdf](http://www2.congreso.gob.pe/Sicr/RelatAgenda/proapro20112016.nsf/ProyectosAprobadosPortal/CEDED676DF4252E105257D970077620E/$FILE/AU01151211114.pdf)
3. García Rodríguez José Francisco. Manejo de los efectos adversos del tratamiento antituberculoso. Galicia Clin [artículo en la internet] 2008 [citado 2015 Sep 29]; 69 (1): 21-28. Disponible en: <http://galiciaclinica.info/PDF/1/11.pdf>
4. American Thoracic Society Documents. An official ATS statement: hepatotoxicity of antituberculosis therapy. Am J Respir Crit Care Med. 2006;174:935-52.
5. Page KR, Sifakis F, Montes de Oca R, Cronin WA, Doherty MC, Federline L, et al. Improved adherence and less toxicity with rifampin vs isoniazid for treatment of latent tuberculosis. Arch Intern Med. 2006;166:1863-70.
6. Bitange Nipa Tochi, Zhang Wang1, Shi - Ying Xu and Wenbin Zhang. Therapeutic Application of Pineapple Protease (Bromelain): A Review. Pakistan Journal of Nutrition 2008; (4): 513 520
7. Braun, JM, Schneider, B., & Beuth, HJ (2005), therapeutic use, efficiency and safety of the proteolytic pineapple enzyme Bromelain-POS® in children with acute sinusitis in Germany. in vivo , 19 (2), 417-421
8. Fitzhugh, D. J., Shan, S., Dewhirst, M. W., & Hale, L. P. (2008). Bromelain treatment decreases neutrophil migration to sites of inflammation. Clinical immunology, 128(1), 66-74.



9. Inchingolo, F., Tatullo, M., Marrelli, M., Inchingolo, A. M., Picciariello, V., Inchingolo, A. D.,... & Cagiano, R. (2010). Clinical trial with bromelain in third molar exodontia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 14(9), 771-774
10. Secor Jr, E. R., Shah, S. J., Guernsey, L. A., & Schramm, C. M. (2012). Bromelain limits airway inflammation in an ovalbumin-induced murine model of established asthma. *Alternative therapies in health and medicine*, 18(5), 9.
11. 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
12. Maryam, S., Bhatti, A. S. A., & Shahzad, A. W. (2010). Protective effects of silymarin in isoniazid induced hepatotoxicity in rabbits. *Annals of King Edward Medical University*, 16(1).
13. 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: 10.1177/09603271111433901.
14. García, M. D., & Serrano, H. (2005). La piña, *Ananas comosus* (L.) Merr. (Bromeliaceae), algo más que un fruto dulce y jugoso. *ContactoS*, 56, 55-61.
15. Prasenjit Debnath, Prasanta Dey, Abhijit Chanda, Tejendra Bhakta. A Survey on Pineapple and its medicinal value. *Scholars Academic Journal of Pharmacy* [artículo en la Internet]. 2012 Nov [citado 2015 Sep 29]; 1(1) 24-29. Disponible en: <http://saspublisher.com/wp-content/uploads/2013/02/SASP11-24-29.pdf>.
16. Lluquín, S., Viviana, N., & Quinde Fuentes, C. S. (2015). Extracción, purificación parcial y secado de la enzima bromelina obtenida a partir del corazón de la piña (*Ananas comosus*).

17. Lago, I. L., Varela, J. D., & de Cáceres, F. M. (1996). La bromelina: una proteasa de interés comercial. *CYTA-Journal of Food*, 1(2), 17-22.
18. Dalgo V. Obtencion de un concentrado con bromelina a partir de piña (*Ananas comosus*), y determinación de su actividad enzimática en sustratos proteínicos. [Tesis] Ambato: Universidad Técnica de Ambato. Facultad de ciencia y tecnología en alimentos; 2012.
19. Toxicidad de extracto acuoso de piña. Disponible en : <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=pi%C3%B1a&id=7920> [ citado el 08/01/2017]
20. Tejada Cifuentes, Francisco. Hepatotxicidad por fármacos. *Revista Clínica de Medicina de Familia* 3.3 (2010): 177-191.
21. Calzada, U. E. G., Berruecos, Y. A., Mejía, M. C. B., & Toledo, I. E. E. (2008). Toxicidad hepática por medicamentos antituberculosos. *latreia*, 21(1), 41 48.
22. Gülbay BE, Gürkan OU, Yildiz OA, Onen ZP, Erkeköl FO. Side effects due to primary antituberculosis drugs during the initial phase of therapy in 1149 hospitalized patients for tuberculosis. *Respir Med* 2006; 100: 1834-1842
23. TSAGAROPOULOU-STINGA, H. E. I. A. U. L. I. A., et al. "Hepatotoxic reactions in children with severe tuberculosis treated with isoniazid-rifampin." *The Pediatric Infectious Disease Journal* 4.3 (1985): 270-273.
24. AGUAYO C MIGUEL, RODRÍGUEZ D JUAN CARLOS. Hígado y terapia antituberculosa. *Rev. chil. enferm. respir.* [Internet]. 2011 Mar [citado 2016 Nov 15]; 27(1): 53-57. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-73482011000100010&lng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-73482011000100010&lng=es). <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-73482011000100010>.

25. Hassen AA. , Belachew T, Yami A, Ayen WY. Antituberculosis 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.006462
26. Warmelink, Ina, et al. "Weight loss during tuberculosis treatment is an important risk factor for drug-induced hepatotoxicity." *British Journal of Nutrition* 105.03 (2011): 400-408.
27. 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.
28. Huang, Y. S., Chern, H. D., Su, W. J., Wu, J. C., Lai, S. L., Yang, S. Y., ... & Lee, S. D. (2002). Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology*, 35(4), 883-889.
29. Mahmoud, L. Ben, et al. "Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Tunisian patients with tuberculosis." *Pathologie Biologie* 60.5 (2012): 324-330.
30. Goodman y Gilman.Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.11ma ed. McGraw-Hill Interamericana; 2006
31. Equipo de redacción de IQB. Isoniazida en vademécum. España; 2012 [consultado del 15 de noviembre de 2016]. Disponible en <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/i023.htm>
32. Singh A., Bhat T. & Sharma O. Clinical Biochemistry of Hepatotoxicity. *Singh, J Clinic Toxicol* 2011. S4:001. doi:10.4172/2161-0495.S4-001

33. NUÑEZ, HUGO. "EL CITOCROMO P450 Y SU ROL EN LA HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA POR LAS DROGAS." *Enfermedades del Aparato Digestivo* 2.2 (1999). Tayal, V., Kalra, B. S., Agarwal, S.,
34. Mitchell JR, Zimmerman HJ, Ishak KG, Thorgeirsson UP, Timbrell JA, Snodgrass WR et al. Isoniazid liver injury: clinical spectrum, pathology, and probable pathogenesis. *Annals of Internal Medicine*. 1976;84(2):181-192.
35. Wang, Pengcheng et al. "Isoniazid Metabolism and Hepatotoxicity." *Acta Pharmaceutica Sinica*. B 6.5 (2016): 384–392. PMC. Web. 26 Oct. 2016
36. 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.
37. Navarro VJ, Senior JR. Drug – related Hepatotoxicity. *N Engl J Med* 2006; 354:731-739. DOI: 10.1056/NEJMra052270.
38. Eminzade, S., Uras, F., & Izzettin, F. V. (2008). Silymarin protects liver against toxic effects of anti-tuberculosis drugs in experimental animals. *Nutrition & Metabolism*, 5(1), 18
39. Luangchosiri, Chote, et al. "A double-blinded randomized controlled trial of silymarin for the prevention of antituberculosis drug-induced liver injury." *BMC complementary and alternative medicine* 15.1 (2015): 1.
40. Uribe-Clavijo, Mélany, Álvarez-Gómez, Ángela M., Arango, Víctor, Cortes-Mancera, Fabian M., Cadavid-Jaramillo, Ángela P., & Cardona-Maya, Walter D.. (2012). Efecto In Vitro del Extracto Vegetal de Ananas Comosus sobre Espermatozoides Humanos. *Tecno Lógicas*, (28), 55-70. Consultado el 3 de diciembre 2016. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-77992012000100004&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-77992012000100004&lng=en&tlng=es)

41. Clavijo, Diego, Maghdriel Portilla, and Alfonso Quijano Parra. "Cinética y extracción de la bromelina obtenida a partir de la piña (ananas comosus) proveniente de Lebrija-Santander." @ limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria 10.1 (2011).
42. H. GIL, V. OTEROS, S. CONTRERAS, L. PETIT Y N. JOSHI. Consecuencias funcionales y cambios espectroscópicos en proteínas nativas, inhibidas y glucadas no enzimáticamente VOL. 8 (3), 31-42 (1997). Universidad de Los Andes, Departamento de Química, La Hechicera, Mérida 5251, Venezuela.
43. Dalaklioglu S, Genc GE, Aksoy NH, Akcit F , Gumuslu S. Resveratrol ameliorate s methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of lipid peroxidation. Hum Exp Toxicol. 2013;32 (6) 662-671. DOI: 10.1177/0960327112468178
44. Linda Gallardo, Alfredo Sánchez, Claudia Montalvo y Alejandro Alonso. "Extracción de bromelina a partir de residuos de piña" Universidad Politécnica de Puebla. Ciencia y Tecnología de Alimentos Vol. 18, 2008
45. Rowan, A. D., Buttle, D. J., & Barrett, A. J. (1990). The cysteine proteinases of the pineapple plant. Biochemical Journal, 266(3), 869.
46. Shoshi, O. T. A., KATAHIRA, Y., & OKAMOTO, Y. (1985). Reinvestigation of fractionation and some properties of the proteolytically active components of stem and fruit bromelains. Journal of biochemistry, 98(1), 219-228.
47. Yamada, F., Takahashi, N., & Murachi, T. (1976). Purification and characterization of a proteinase from pineapple fruit, fruit bromelain FA2. Journal of Biochemistry, 79(6), 1223-1234.
48. Maurer HR. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS. 2001 Aug 1;58(9):1234-45.

49. Ko BS, Hwang YI, Lee SC. Simple purification of bromelain from pineapple. *Journal of Food Science and Nutrition*. 1996 Jun;1(1):106-10.
50. Dubey R, Reddy S. Extraction and Purification of Bromelain. *Asian Journal of Chemistry*. 2012 Apr 1;24(4):1435.
51. Bromelain; MSDS No. B1144 [document en línea]. Consultado el 3 de diciembre 2016. Disponible en: <https://www.msds-online.com/msds-search>.
52. Thurman, R. G., et al. "Mechanisms of alcohol-induced hepatotoxicity: studies in rats." *Front Biosci* 4.1 (1999): 42.
53. Gunde MC, Amnerkar ND. *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND MEDICAL RESEARCH*.
54. 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.
55. 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
56. 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.
57. De Nutrición, E. D. L. E., de León, L. C. L., & de Nutrición, D. D. L. E. Efecto de una bebida desintoxicante en el peso, porcentaje de grasa corporal y porcentaje de agua en universitarios con sobrepeso entre 20 y 30 años.
58. Martín, M. G., & Molina, A. Z. (2010). *Transaminasas: Valoración y significación clínica. Protocolos diagnóstico-terapéuticos de*

Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNPAEP, 267-275.

59. Okafor, O. Y., Erukainure, O. L., Ajiboye, J. A., Adejobi, R. O., Owolabi, F. O., & Kosoko, S. B. (2011). Modulatory effect of pineapple peel extract on lipid peroxidation, catalase activity and hepatic biomarker levels in blood plasma of alcohol-induced oxidative stressed rats. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 1(1), 12-14.

60. Mohamad, N. E., Yeap, S. K., Lim, K. L., Yusof, H. M., Beh, B. K., Tan, S. W., ... Alitheen, N. B. (2015). Antioxidant effects of pineapple vinegar in reversing of paracetamol-induced liver damage in mice. *Chinese Medicine*, 10, 3. <http://doi.org/10.1186/s13020-015-0030-4>

61. Olivares, Jorge. Efecto protector del extracto acuoso de las hojas de *Peumus Boldus* (boldo) en la toxicidad hepática inducida por Rifampicina en ratas Holtzman hembra. [Tesis] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina; 2015.

62. Busto Bea, V., & Herrero Quirós, C. (2015). Pruebas de función hepática: B, AST, ALT, FA y GGT. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 107(10), 648-648.

63. Yogeeta, S., Ragavender, H. R. B., & Devaki, T. (2007). Antihepatotoxic effect of *Punica granatum*. acetone extract against isoniazid-and rifampicin-induced hepatotoxicity. *Pharmaceutical biology*, 45(8), 631-637.

64. Munzig E, Eckert K, Harrach T, et al. Bromelain protease F9 reduces the CD44 mediated adhesion of human peripheral blood lymphocytes to human umbilical vein endothelial cells. *FEBS Lett* 1995;351:215-218.

65. Taussig SJ, Batkin S. Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application. An update. *J Ethnopharmacol* 1988;22:191-203.



66. Schafer A, Adelman B. Plasmin inhibition of platelet function and of arachidonic acid metabolism. *J Clin Invest* 1985;75:456-461.
67. Robles-Sánchez, R. M., Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Astiazarán-García, H., González-Aguilar, G., & Cruz-Valenzuela, R. (2007). Frutos tropicales mínimamente procesados: potencial antioxidante y su impacto en la salud. *Interciencia*, 32(4).



## **IX. ANEXOS**

- **Anexo N°1:** Certificado sanitario de los animales de experimentación (Instituto Nacional de Salud)
- **Anexo N°2:** Certificado de autenticidad del fruto de Ananas comosus (Museo de Historia Natural)
- **Anexo N°3:** Obtención del extracto acuoso de Ananas comosus
- **Anexo N°4** Separación en grupos de animales de experimentación
- **Anexo N°5:** Dosificación intragástrica a ratas de experimentación
- **Anexo N°6:** Obtención de muestra sanguínea mediante punción cardiaca

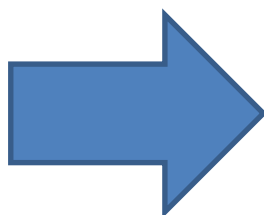
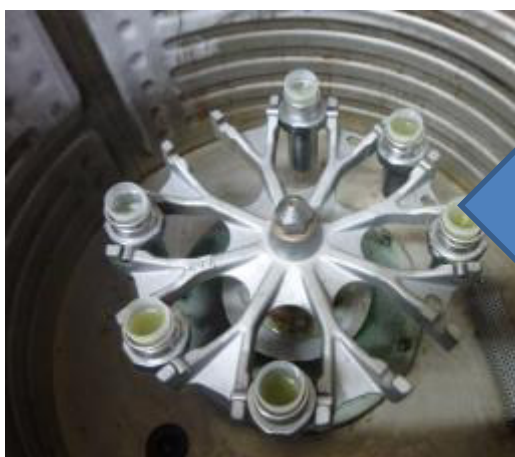
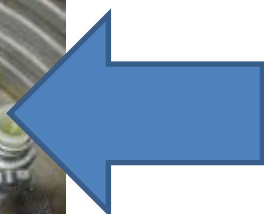
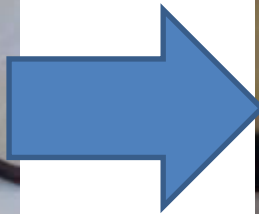
**Anexo N°1:** Certificado sanitario de los animales de experimentación (Instituto Nacional de Salud de

		INSTITUTO NACIONAL DE SALUD CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS COORDINACIÓN DE BIOTERIO	
<b>CERTIFICADO SANITARIO N°</b>		113-2016	
Producto	: Rata Albina	Lote N°	: R - 05 - 2016
Especie	: <i>Rattus norvegicus</i>	Cantidad	: 25
Cepa	: Holtzman	Edad	: 3 meses
Peso	: 200 a 250 gr.	Sexo	: Hembras
G.R.	: 032719	Destino	: Rey Vidal, Oliver Alberto Carabayillo
Lima	: 10-05-2016		
<p>El Médico Veterinario, que suscribe, <b>Arturo Rosales Fernández</b>, Coordinador de Bioterio Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias*.</p> <p>*Referencia: P.R.T.-CNPB-153, Procedimiento para el ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para Animales de Experimentación.</p> <p>Chorrillos; 10 de Mayo del 2016 (Fecha de emisión del certificado)</p> <p style="text-align: right;"> M.V. Arturo Rosales Fernández C.M.V.P. 1586</p> <p><b>NOTA:</b> El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.</p>			

**Anexo N°2:** Certificado de autenticidad del fruto de *Ananas comosus* (Museo de Historia Natural)

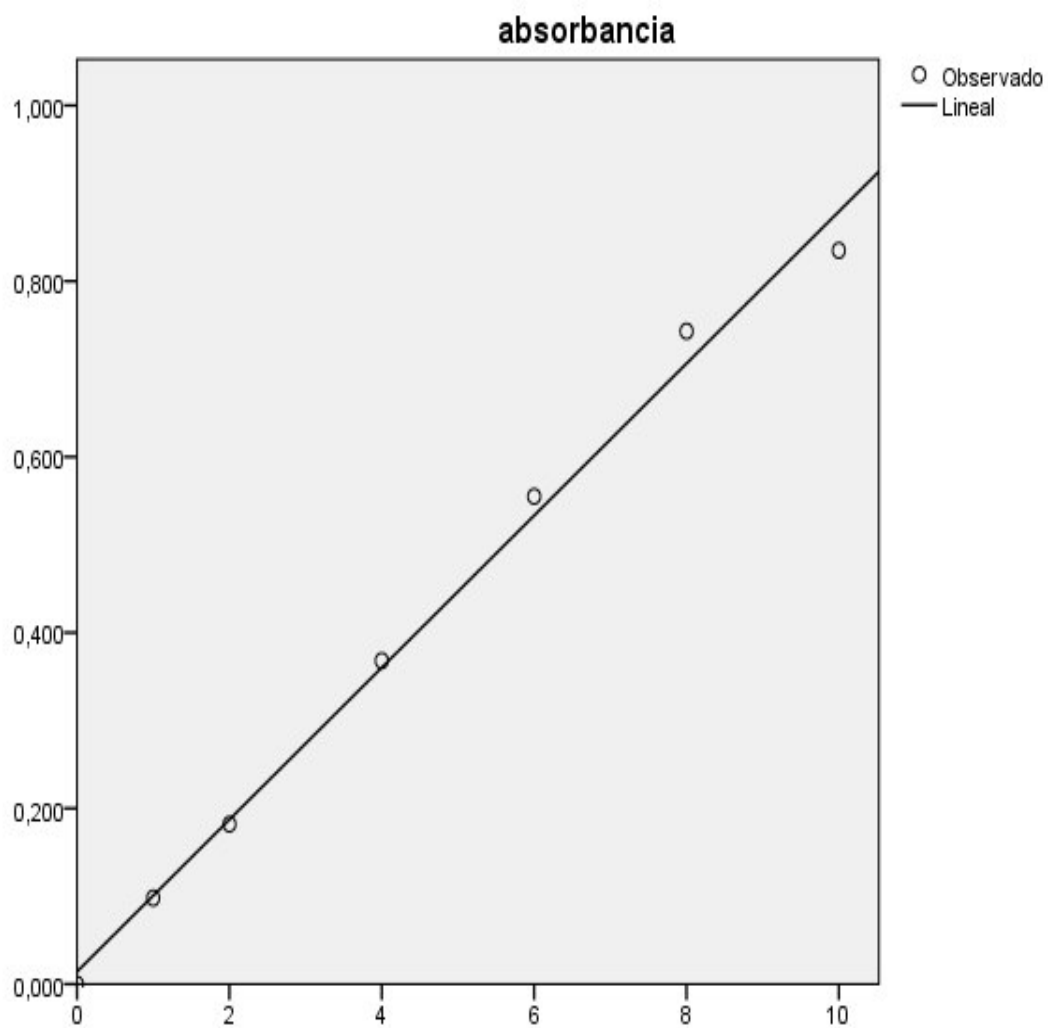
	<p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS</b> Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA <b>MUSEO DE HISTORIA NATURAL</b></p>	
<p><i>"Año de la Consolidación del Mar de Grau"</i></p>		
<p><b>CONSTANCIA N° 169-USM-2016</b></p>		
<p>LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:</p>		
<p>La muestra vegetal (fruto) recibida de <b>Oliver Alberto REY VIDAL</b>, estudiante de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica; ha sido estudiada y clasificada como: <b><i>Ananas comosus</i></b> (L.) Merr y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).</p>		
<p><b>DIVISION: MAGNOLIOPHYTA</b></p>		
<p><b>CLASE: LILIOPSIDA</b></p>		
<p><b>SUBCLASE: ZINGIBERIDAE</b></p>		
<p><b>ORDEN: BROMELIALES</b></p>		
<p><b>FAMILIA: BROMELIACEAE</b></p>		
<p><b>GENERO: <i>Ananas</i></b></p>		
<p><b>ESPECIE: <i>Ananas comosus</i> (L.) Merr</b></p>		
<p>Nombre vulgar: "piña golden" Determinado por Mg. María I. La Torre Acuy</p>		
<p>Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.</p>		
<p>Fecha, 21 de julio de 2016</p>		
<p>  <b>Dra. Haydee Montoya Terreros</b> JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)</p>		
<p>DDB</p>		

**Anexo N°3:** Obtención del extracto acuoso de Ananas comosus



### Anexo N°4: Curva de calibración para bromelina

Ecuación	Resumen del modelo					Estimaciones de parámetro	
	R cuadrado	F	df1	df2	Sig.	Constante	b1
Lineal	,994	767,809	1	5	,000	,014	,087



**Anexo N°5 Separación en grupos de animales de experimentación**



**Anexo N°6:** Dosificación intragástrica a ratas de experimentación



**Anexo N°7:** Obtención de muestra sanguínea mediante punción cardiaca

